

## 受賞対象論文

Hirai K, Ousaka D, Fukushima Y, Kondo M, Eitoku T, Shigemitsu Y, Hara M, Baba K, Iwasaki T, Kasahara S, Ohtsuki S, Oh H : Cardiosphere-derived exosomal microRNAs for myocardial repair in pediatric dilated cardiomyopathy. *Sci Transl Med* (2020) 12, eabb3336.

## ハイライト

- ・新規ブタ拡張型心筋症モデルを開発し、冠動脈注入法による心臓内幹細胞移植の治療効果を確認した。
- ・小児拡張型心筋症5例において心臓内幹細胞移植の第1相臨床研究を実施し、安全性と有効性を評価した。
- ・本細胞治療の組織修復機序として、エクソソームから分泌される miR-146a-5p の関与が示唆された。

## 平井 健太

Kenta Hirai



## 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 小児医科学

Department of Pediatrics, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

## &lt;プロフィール&gt;

平成22年3月 岡山大学医学部医学科卒業  
 平成22年4月 岡山大学病院 初期研修医  
 平成23年5月 広島市立広島市民病院 初期研修医  
 平成24年4月 広島市立広島市民病院 後期研修医  
 平成26年4月 岡山大学病院 小児科 医員  
 現在に至る

## 研究の背景と経緯

岡山大学病院小児循環器科では、心臓血管外科、新医療研究開発センターとの共同研究で、2011年から小児心不全に対する心臓内幹細胞(cardiosphere-derived cells: CDCs)自家移植療法の臨床研究を行っており、左心低形成症候群に対する第1相臨床研究(TICAP試験)<sup>1,2)</sup>や単心室症に対する第2相臨床研究(PERSEUS試験)<sup>3)</sup>において、その安全性や有効性を確認してきた。上記臨床研究においてCDCs移植を行った合計41症例における移植後2年の追跡調査では、調査期間中に全例で腫瘍形成を認めず、CDCs移植群は非移植群と比較して術後合併症を有意に回避でき、CDCs移植前に駆出率が低下していた群で移植後の心機能改善率がより高いことが示された<sup>4)</sup>。現在はCDCs移植療法の保険適応化を目指し、企業主導で計40症例の小児単心室症に対するCDCs移植の第3相施設共同臨床治験(APOLLON試験:NCT02781922)を登録実施中である。

一方、拡張型心筋症(dilated cardiomyopathy: DCM)は最も多い小児心筋症疾患であり、臨床診断後

5年以内に心臓死や心臓移植を回避できる頻度は約50~60%と極めて予後不良である<sup>5)</sup>。2010年7月に家族の承諾による脳死臓器移植や15歳未満の小児の臓器提供を可能にした改正臓器移植法が施行され、日本でも10歳未満の小児に心臓移植が可能となり、2019年12月末までで18歳未満の脳死臓器提供からの小児心臓移植は累計50例、10歳未満の症例は18例となった。2019年に入り徐々に増加傾向にあるが、心臓移植を受けた小児患者の待機期間は平均691日、補助人工心臓装着期間は平均644日と非常に長く、DCMにおいても革新的な治療法の開発や早期の臨床実用化が切望される。本研究では、小児DCMに対するCDCs移植の適応拡大に向けて、大型動物による前臨床研究からヒト第1相臨床研究までのトランスレーショナル・リサーチを実施した。

## 研究成果の内容

## 1. ブタ拡張型心筋症モデルに対する心臓内幹細胞移植と治療効果機序の解明

これまで再現性が高く治療評価が可能な大型動物の

DCM モデルが存在しなかったため、微小塞栓物質（長径：100~300 $\mu$ m,  $1.0 \times 10^4$ 個）を冠動脈3枝に分けて投与することで、新規のブタ DCM モデルを開発した。合計48頭中40頭（83.3%）で DCM 様のびまん性左室壁運動低下が得られ、大型動物の心臓研究で一般的に使用されるブタ心筋梗塞モデルとほぼ同等の高いモデル作成効率となった。モデル作成前後で左室駆出率は  $61.8 \pm 3.5\%$  から  $37.6 \pm 3.1\%$  ( $P < 0.001$ ) に低下し、左室拡張末期径の拡大も認めた。また病理組織では塞栓子周囲の間質で心筋全体にまだらな線維化を確認した。

上記モデルを用いて CDCs 移植の安全性試験、有効性試験、また治療効果機序の検証試験を実施した。当院の単心室症患者に対する CDCs 移植の臨床研究では、バルーンカテーテルを用いて冠動脈の血流を一時的に遮断し、カテーテルの先端から細胞を投与する方法（stop-flow 法）を採用していたが、近年海外では虚血性心疾患において冠血流を遮断せず投与する方法（nonocclusive 法）が効果は同等でより安全性が高いとの報告があり<sup>6)</sup>、ブタ DCM モデルにおける CDCs 移植の安全性試験として stop-flow 法と nonocclusive 法とを比較した。stop-flow 法は nonocclusive 法と比較して CDCs 移植中に心電図での虚血性変化や心室期外収縮が有意に増加したため、以後の検討では冠血流を遮断しない nonocclusive 法を採用した。

次に有効性評価として、900万個の CDCs, 1,800万個の CDCs もしくはプラセボを冠動脈3枝に分けて移植し、4週間後に評価を行った。900万個と1,800万個の CDCs を移植したいずれの群においても、プラセボ群と比較して心臓超音波検査、心臓 MRI において左室駆出率が有意に改善した。また移植群では心臓 MRI の遅延造影と病理組織のピクロシリウスレッド染色において、心筋線維化領域の縮小を認めた。さらに移植群において von Willebrand 因子の発現による血管新生の亢進や、Ki67とリン酸化ヒストン H3 の発現による新規心筋細胞の増加を確認した。

上記の治療効果機序の検証として、CDCs が分泌する細胞外小胞（エクソソーム）を解析したところ、心筋保護や血管新生に関わるマイクロ RNA が豊富に含まれていることを確認した。エクソソーム分泌抑制物質である GW4869 で

CDCs を前処置すると、CDCs が分泌するエクソソーム粒子数が用量依存的に減少し、またエクソソームに含まれるマイクロ RNA も著明に減少していた。そこで GW4869 で前処置した CDCs をブタに移植すると、心機能改善や心筋線維化抑制といった治療効果を示さず、CDCs が分泌するエクソソームが上記治療効果に寄与している可能性が示唆された（図1）。しかし、GW4869 で前処置した CDCs と別に抽出した CDCs 由来エクソソームを同時に冠動脈から投与しても治療効果は得られなかった。エクソソームの長径は約100nm と毛細血管よりも小さく、エクソソームを冠動脈から投与しても心臓組織内に留まらず毛細血管を介して全身に拡散したため、治療効果を示さなかった可能性が考えられた。

## 2. 小児拡張型心筋症に対する心臓内幹細胞自家移植療法の第1相臨床研究

前臨床研究の結果をもとに、2017年から当院にて小児 DCM に対する CDCs 自家移植療法の第1相臨床研究（TICAP-DCM 試験：NCT03129568）を開始した。第1a相において計5例の小児 DCM 患者に対して心筋生検で採取した右室組織をもとに CDCs の分離・培養を行い、自家移植を施行し、移植後1年までの安全性を評価した。移植前の左室駆出率が12%と最も低値であった1例において、移植後に一時的に心不全が悪化し、計9日間の体外式膜型人工肺（ECMO）の装着を要したが、その後状態改善を認めた。それ以外の4例では有害事象を認めなかった。移植後1年の時点で、心臓超音波検査における左室駆出率の有意な改善

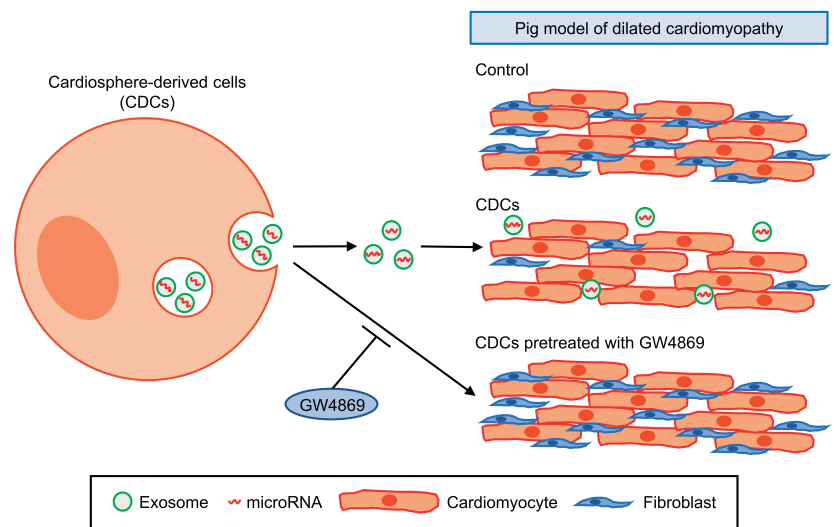


図1 心臓内幹細胞が分泌するエクソソームを介した心筋組織修復

や、心臓 MRI において心筋線維化を反映する Native T1 値の有意な低下といった有効性を示唆する結果が得られた。

患者由来の CDCs が分泌するエクソソームを解析したところ、ブタ CDCs と同様にマイクロ RNA が豊富に含まれており、特に microRNA (miR)-146a-5p の発現量と CDCs 移植前後の線維化抑制度との間に有意な相関があることを見出した。miR-146a-5p は NF- $\kappa$ B の下位経路において発現し、ネガティブフィードバックにより炎症鎮静化に働くことが知られているが<sup>7)</sup>、ヒト心筋培養細胞に miR-146a-5p を実験的に過剰発現させると、IL-6, TRAF6, FOS, SMAD4 といった炎症・線維化マーカーが有意に低下し、逆に miR-146a-5p を発現低下させると上記マーカーが有意に上昇した。さらに、miR-146a-5p を過剰発現させると TNF- $\alpha$  刺激による心筋培養細胞のアポトーシスが有意に抑制されることを確認した。

## 研究成果の意義

幹細胞移植による心臓再生治療の臨床研究は、成人の虚血性心疾患に対するものが大半であり、小児心疾患では疾患の希少性や high volume center が少ないなどの理由により、多くが症例報告に留まっている。また DCM に関しては、これまで再現性が高く治療評価が可能な大型動物の DCM モデルが存在せず、大型動物による前臨床研究が進んでいなかった。

本研究では、微小塞栓物質を用いた新規ブタ DCM モデルを開発し、前臨床研究から世界初の小児 DCM に対する CDCs 自家移植療法の臨床研究を実施した。また CDCs の治療効果機序として、CDCs が分泌するエクソソームやその中に含まれるマイクロ RNA が関与している可能性が示された (図 1)。

## 今後の展開や展望

近年、幹細胞移植の治療効果機序として、本研究と同様に幹細胞が分泌するエクソソームやその中に含まれるマイクロ RNA によるパラクライン効果が示唆されており、エクソソームやマイクロ RNA を用いた心筋再生医療の研究も徐々に進んでいる<sup>8,9)</sup>。今後は小児

DCM に対する CDCs 移植の有効性評価試験である第 1 b 相臨床研究を進めていくとともに、エクソソームやマイクロ RNA による cell free therapy の臨床応用に向けての研究も続けていきたい。

## 文 献

- 1) Ishigami S, Ohtsuki S, Tarui S, Ousaka D, Eitoku T, et al. : Intracoronary autologous cardiac progenitor cell transfer in patients with hypoplastic left heart syndrome : the TICAP prospective phase 1 controlled trial. *Circ Res* (2015) 116, 653-664.
- 2) Tarui S, Ishigami S, Ousaka D, Kasahara S, Ohtsuki S, et al. : Transcoronary infusion of cardiac progenitor cells in hypoplastic left heart syndrome : Three-year follow-up of the Transcoronary Infusion of Cardiac Progenitor Cells in Patients With Single-Ventricle Physiology (TICAP) trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* (2015) 150, 1198-1207.
- 3) Ishigami S, Ohtsuki S, Eitoku T, Ousaka D, Kondo M, et al. : Intracoronary Cardiac Progenitor Cells in Single Ventricle Physiology : The PERSEUS (Cardiac Progenitor Cell Infusion to Treat Univentricular Heart Disease) Randomized Phase 2 Trial. *Circ Res* (2017) 31, 62-73.
- 4) Sano T, Ousaka D, Goto T, Ishigami S, Hirai K, et al. : Impact of Cardiac Progenitor Cells on Heart Failure and Survival in Single Ventricle Congenital Heart Disease. *Circ Res* (2018) 122, 994-1005.
- 5) Lipshultz SE, Law YM, Asante-Korang A, Austin ED, Dipchand AI, et al. : Cardiomyopathy in Children : Classification and Diagnosis : A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* (2019) 140, e9-e68.
- 6) Tseliou E, Kanazawa H, Dawkins J, Gallet R, Kreke M, et al. : Widespread Myocardial Delivery of Heart-Derived Stem Cells by Nonocclusive Triple-Vessel Intracoronary Infusion in Porcine Ischemic Cardiomyopathy : Superior Attenuation of Adverse Remodeling Documented by Magnetic Resonance Imaging and Histology. *PLoS One* (2016) 19, e0144523.
- 7) Mann M, Mehta A, Zhao JL, Lee K, Marinov GK, et al. : An NF- $\kappa$ B-microRNA regulatory network tunes macrophage inflammatory responses. *Nat Commun* (2017) 8, 851.
- 8) Barile L, Moccetti T, Marbán E, Vassalli G : Roles of exosomes in cardioprotection. *Eur Heart J* (2017) 38, 1372-1379.
- 9) Lucas T, Bonauer A, Dimmeler S : RNA Therapeutics in Cardiovascular Disease. *Circ Res* (2018) 123, 205-220.

令和 3 年 4 月 7 日受稿  
〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1  
電話 : 086-235-7249 FAX : 086-221-4745  
E-mail : k-hirai@s.okayama-u.ac.jp