

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10216

研究課題名(和文) エクスプラント心由来の自己幹細胞移植による拒絶緩和と膜組織作成法の開発

研究課題名(英文) Development of alleviation of rejection by autologous cardiogenic stem cell from explanted heart

研究代表者

新井 禎彦 (Arai, Sadahiko)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：50345617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：純系ラットを用いた異所性心移植慢性期生存モデルによる自己幹細胞移植評価を実施した。その結果細胞投与群は細胞非投与群と比較してグラフト生着期間の延長と心機能の改善傾向がみられ現在統計学的解析などの評価を行っている。さらに移植心内の細胞由来を追跡調査した。これにより、心機能の改善が幹細胞由来細胞生着と増殖によるものか、いわゆるパラクリン作用による移植心の細胞の増殖、機能改善によるものかを特定することを目指している。現状ではその混在の割合が圧倒的優位性を持っている状態とは言い難いため、作用機序特定のためには多様な内分泌、化学的伝達物質などの評価を要する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We evaluated effect of autologous cardiogenic stem cell by heterotopic cardiac transplantation model in rat. We observed tendency of prolongation of graft survival and improved cardiac function in data. Further evaluation and statistic analysis are on-going. We analyzed origin of cardiac cell in myocardium. We found mixed existence of myocardial cell and cardiogenic stem cell. At this moment we cannot conclude whether the effect of cardiogenic stem cell is based on regeneration and proliferation of myocardium from stem cell or paracrine function from stem cell by endocrine hormone and chemical mediators and so on. Thus we continue further morphological evaluation of myocardial tissue of transplanted graft, we also considering further evaluations based on hormone/ chemical mediator analysis.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：再生医療 心臓移植 心臓血管外科

1. 研究開始当初の背景

重症心不全に対する治療として心臓移植は我が国においても漸く確立された治療として行われるようになってきた。しかしドナー心の提供は今も少なく我が国での心臓移植患者が重篤な拒絶反応を来した場合の治療法としての再移植を受けることができる機会は極めて限られており、諸外国以上に拒絶反応に対する新たな治療法が強く求められている。

一方、申請者らが開発した心臓内幹細胞の自家移植は、再生医療の手法として確立され臨床応用への展開を見せている。この心臓内幹細胞は心臓移植におけるレシピエント心においても、継続して存在しており、移植時に摘出されるレシピエント心は、心臓すべてが摘出され大量の心筋組織を得ることができるため、十分な量の心筋内幹細胞の確保が可能であると考えられ、その有効な臨床応用としてこの方法が考えられる。今回の研究では、移植心に対するレシピエント由来の心筋内幹細胞投与による急性および慢性拒絶反応への効果を評価し、臨床治療への応用の可能性を検討する世界で初の研究であり極めて有用性が高いと考えられる。

自己幹細胞移植は、骨髄幹細胞を主として、临床上多くの血液や自己免疫疾患に応用されているが、同じ自己組織由来の幹細胞である心臓内幹細胞においては、申請者の連携研究者をはじめ、これまで既に心筋再生医療への応用に向けて、世界からいくつかの前臨床試験が報告されている。また最近、犬の心筋梗塞モデルを用いた検討では、エクスプラント心由来の心臓内 c-kit 陽性幹細胞を心臓移植後にドナー心臓内に移植することで、心臓移植時の急性拒絶反応に対する局所的な緩和効果があることが報告された。しかしながら、申請者が計画しているより簡便な心臓内幹細胞の精製法を用いた c-kit 陰性心臓内幹細胞移植による移植後心臓拒絶緩和作用に対する検討はこれまで報告されていない。

このように心筋内幹細胞の再生医療への応用はすでに確立され進展しているが、心臓移植領域への応用の検討は過去にほとんどされていない。しかし申請者によるラット異所性心臓移植モデルを用いた検討では、心臓移植における急性拒絶反応は冠動脈周囲の炎症から心筋障害に至る心筋破壊であり、慢性拒絶反応は冠動脈狭窄を来す血管病変である。

移植後の急性および慢性拒絶反応に対し、心筋、血管いずれにも分化する能力を有し、免疫学的には拒絶反応の皆無なレシピエント由来の心筋内幹細胞を投与することにより、心臓移植後死亡の主たる原因である2種類の拒絶反応を治療できる可能性が高いと考えたのが今回の研究の着想である。

今日まで移植医療と再生医療の研究は心不全治療の分野においては対極をなすものとして、各個の研究が進んできており、両者を統合して新たなアプローチをする研究は今

日まで無く独創的である。この研究においては移植心においても心臓内幹細胞が器官再生に有用であり、免疫抑制によるドナー心機能の維持のみに明け暮れていた移植後術後管理に機能回復あるいは改善がさらに加わることが予想される。またこの治療法が有効であった場合、長期間にわたり心筋内幹細胞投与を続けることで、ドナー心の心血管細胞の多くがレシピエント心筋内幹細胞由来のものに置換される可能性も考えられ、副作用の多い免疫抑制療法の軽減ないしは中止に至ることができれば、移植成績の大きな改善が期待できる。

2. 研究の目的

先天性心疾患に対する外科治療の内、現在も治療が困難な疾患として心筋に由来する重症心不全と外科治療の弁膜疾患による重症心不全がある。これらの重症心不全に対する治療として心臓移植があるが、小児に対する本邦での実施は極めて稀で、移植されても拒絶反応が術後死亡の主たる原因である。本研究では、移植時に摘出されるレシピエント心由来の心臓内幹細胞の投与によるドナー心臓拒絶反応への治療有効性を動物実験で検証する。また脱細胞化した組織骨格への幹細胞播種による再生医療による弁形成材料の開発の可能性を検証する。本研究により移植心におけるレシピエント由来の心筋内幹細胞の生物学的態度が明らかになる。さらに心筋内幹細胞の急性および慢性拒絶反応への治療効果が評価される。これにより今までの免疫抑制療法とは全く異なった拒絶反応への治療法として臨床応用可能かを評価する。これにより、特に急性拒絶反応によって低下した移植心の心機能の回復や慢性拒絶反応の冠動脈病変の進行の抑制あるいは狭窄の回復を達成する新たな治療法の開発を目指す。また心筋由来幹細胞からより機能が単純な弁膜組織を作成する事が可能となり弁膜症治療に利用可能かを検討する。

3. 研究の方法

純系ラットを用いた異所性心臓移植を Ono-Lindsey 法(上行大動脈・腹部大動脈端側吻合および肺動脈・下大静脈端側吻合)により実施し連携研究者が開発した方法で自己心臓内幹細胞の純化精製及び培養を行ってきた。この実験で用いた純型ラットの組み合わせでは Major Histocompatibility の minor mismatch により、比較的軽度の急性拒絶反応と慢性期にグラフト冠動脈病変(慢性拒絶反応)を来すことが知られており慢性期生存例による評価を実施する。さらに、レシピエントおよび心筋内幹細胞をオスとすることにより Y 染色体の免疫染色により、細胞由来を追跡調査することにより心筋細胞が移植心由来か幹細胞由来かを特定することにより、心機能の改善が幹細胞由来細胞生着と増殖によるものか、いわゆるパラクリン作

用による移植心の細胞の増殖、機能改善によるものを特定する。

具体的には純系ラットを用いた異所性心移植を Ono-Lindsey 法により腹腔内に移植する。また同時にレシピエント株由来の心筋内幹細胞を培養する。免疫抑制剤 FK506(0.32 mg/kg/day)の投与により、非投与モデル、持続投与急性期モデル、急性拒絶反応モデル、慢性拒絶反応モデルの4モデルを作成し、モデルでは心筋内幹細胞投与、非投与群間で、では心筋内幹細胞投与時期を変えた群間での比較検討を行う。比較検討項目は拍動触知による生着日数、心エコーによる心機能の継続的評価、またグラフト脱落時ないしは病理標本解析により、International Society of Heart and Lung Transplantation 基準による心拒絶反応の病理学診断グレードの比較、冠動脈狭窄の画像処理による評価、免疫組織染色によるY染色体追跡による心筋細胞の起源解析を行い、移植心における心臓内幹細胞生着による効果を評価する。

レシピエントには Fisher rat (F344)のオスをドナーとして Lewis rat のメスを用いる。また同時に Fisher rat より、連携研究者が開発した方法で自己心臓内幹細胞の純化精製及び培養を行う(J Cell Sci. 2007;120:1791)。この組み合わせ Major Histocompatibility の minor mismatch により、比較的軽度の急性拒絶反応と慢性期にグラフト冠動脈病変(慢性拒絶反応)を来すことが申請者らにより報告してきた(J Heart Lung Transplant. 1992;11:757)。さらに、レシピエントおよび心筋内幹細胞をオスとすることによりY染色体の免疫染色により、細胞由来を追跡調査することが可能である

培養した心筋内幹細胞は各群の定められた投与時期に、大腿動脈より微小カニューレを下行大動脈まで挿入し、腹部大動脈に移植した心臓の上行大動脈からグラフト心冠動脈に到達させる。免疫抑制剤の投与方法および心筋内幹細胞の投与時期により以下の4群に分けて比較検討する。

免疫抑制剤非投与群 1.心移植後7日目に心筋内幹細胞投与する群 (n=7)。2.心筋内幹細胞非投与群 (n=7)。

免疫抑制剤 (FK506 : 0.32 mg/kg/day) 投与群 (移植後連日投与) a) 心移植後7日目に心筋内幹細胞投与する群 (n=7)。b) 心筋内幹細胞非投与群 (n=7)。

各群においては、触診による拍動触知によるグラフト生着日数、心エコーによる心機能の隔日評価、International Society of Heart & Lung Transplantation 基準による急性拒絶反応、画像処理によるグラフト冠動脈狭窄度評価、Y染色体蛍光免疫染色法による心筋内幹細胞由来細胞の追跡調査を行う。

4. 研究成果

純系ラットを用いた異所性心移植慢性期生

存モデルによる自己幹細胞移植評価を実施した。その結果免疫抑制剤非投与群では細胞投与群は細胞非投与群に比較してグラフト生着期間の延長と拒絶前の心グラフト拍動中の心機能の改善傾向がみられ現在統計学的解析などの評価を行っている。この結果より自己心筋由来幹細胞の投与により急性拒絶反応での心グラフトの心機能改善の可能性が示唆された。さらに移植心内の細胞由来を追跡調査した。これにより、心機能の改善が幹細胞由来細胞生着と増殖によるものか、いわゆるパラクリン作用による移植心の細胞の増殖、機能改善によるものを特定することを目指した。しかし免疫抑制剤非投与群のエンドポイントはグラフト機能廃絶時点であったので幹細胞の作用機序に対する解析は困難であった。

免疫抑制剤投与群では免疫抑制剤投与群、非投与群ともに心グラフトの拍動は保たれていた。心機能は幹細胞投与群での改善傾向が認められ現在データ解析中である。

幹細胞の追跡調査の現状ではその混在の割合が細胞投与群と非細胞投与群の間で細胞分布の明らかな有意差を持っている状態とは言い難いため、作用機序特定のためには多様な内分泌、化学的伝達物質などの評価を要する可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Arai S, Fujii Y, Kotani Y, Kuroko Y, Kasahara S, Sano S Surgical outcome of hypoplastic left heart syndrome with intact atrial septum Asian Cardiovasc Thoac Ann.23,2015,1034-38

査読有

Ishigami S, Ohtsuki S, Tarui S, Ousaka D, Kondo M, Okuyama M, Kobayashi J, Baba K, Arai S, Kawabata T, Yoshihizumi K, Tateishi A, Kuroko Y, Iwasaki T, Sato S, Kasahara S, Sano S, Oh H Intracoronary autologous cardiac progenitor cell transfer in patient with hypoplastic left heart syndrome: the TICAP prospective phase 1 controlled trial Circulation Research 116, 2015, 116 653-64

査読有

S Ishigami, S Ohtsuk, T Eitoku, D Ousaka, M Kondo, Y Kurita, K Hirai, Y Fukushima, K Baba, T Goto, N Horio, J Kobayashi, Y Kuroko, Y Kotani, S Arai, T Iwasaki, S Sato, S Kasahara, S Sano, H Oh Intracoronary cardiac progenitor cells in single ventricle physiology The PERSEUS (Cardiac progenitor cell infusion to treat univentricular heart disease) randomized phase 2 trial Circulation Research 120, 2017, 1162-1173 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

新井禎彦、石神修大、小林純子、後藤拓
弥、佐野俊和、大月審一、王 英正、小谷恭
弘、黒子洋介、笠原真悟、佐野俊二、単心室
症における自己心臓内幹細胞治療の臨床と
先天性心疾患における iPS 細胞の研究の現況
と展望 2017 年 7 月 8 日 第 53 回日本小児
循環器学会 アクトシティ浜松 静岡県浜
松市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 禎彦 (ARAI, Sadahiko)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号：50345617

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

王英正 (OH, Hidemasa)
岡山大学病院・新医療研究開発センター・
教授
研究者番号：50372579

(4) 研究協力者

()