

令和元年6月7日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10076

研究課題名(和文) 小児重症心不全に対する細胞シート移植による再生環境細胞治療の確立

研究課題名(英文) Establishment of regenerative microenvironment therapy using cell sheet transplantation for childhood severe heart failure.

研究代表者

関根 佳織 (SEKINE, Kaori)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：70408011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血液中単核球を無血清培地生体外増幅培養法(quantity and quality control; QQ)培養で増幅したQQ細胞(再生環境細胞)は、移植後の組織で血管再生・抗炎症・抗線維化・免疫寛容作用を發揮することが示唆されている。そこで、劇症型心筋炎後心不全モデルラットをQQ細胞シート及び線維芽細胞シート移植群、コントロール群の3群に分類、QQ細胞移植効果を検討した。圧容積解析により心臓拡張機能の有意な改善と、組織学的評価として有意な繊維化抑制作用を認めた。これはQQ細胞の抗炎症作用によるものと推測され、重症心不全に対する再生環境細胞シート移植治療の有効性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓再生医療の主な細胞ソースは、幹細胞や心筋細胞、筋芽細胞などが用いられているが、その効果はパラクライン効果が主であり、再生組織内における血管網構築能や組織生着能が不十分であるため置換可能な再生心臓組織は実現していない。先行研究において申請者らは、末梢血液中の単核球を無血清培地生増幅培養し、感染源となる不要な蛋白質を含まず、移植先組織で血管再生と再生組織環境を調節する新しい概念の細胞群を獲得した。本研究では、その細胞群をシート化し重症心不全モデルに移植した。その結果、心臓拡張能の改善と血管数増加を認めた。これは、移植細胞の抗炎症作用と血管再生作用によるものと推察されその有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The Opsonic effect of the host tissue regeneration after transplantation has been suggested to the cells, which was obtained by the quantity and quality control (QQ) expansion culture of peripheral blood mononuclear cells, due to their capacities of vascular regeneration, anti-inflammatory, antifibrotic action, and immune tolerance. We examined the effects of QQ cell transplantation using 3 groups of the QQ cell sheet and fibroblast sheet group, and control group to the fulminant myocarditis heart failure model rats. A significant improvement of cardiac diastolic function was observed in the QQ group. The histologic evaluation also showed significant inhibitory effects of fibrosis probably by the anti-inflammatory action. These results showed that the QQ cell sheet transplantation may be a favorable treatment for severe heart failure.

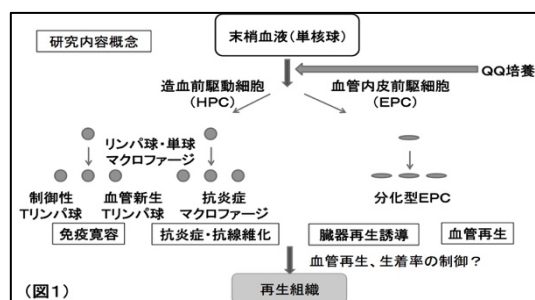
研究分野：循環器

キーワード：再生環境細胞 血管内皮前駆細胞 抗炎症作用 血管再生 無血清培地生体外増幅培養法 細胞シート 心不全

1. 研究開始当初の背景

内科的・外科的治療が奏功しない重症心不全では、移植治療が唯一の望みとなるが、ドナー数が絶対的に不足しているのが現状である。そこで、新たな心臓再生医療技術の開発が期待されている。その主な手法として、(1) 細胞注入療法と (2) 組織工学を用いた手法の2つが考えられている。細胞注入療法には、移植細胞の流出・拡散や壊死による細胞の損失、さらに広範囲な欠損部位の治療には不向きであるという問題点がある。一方、臨床応用されている筋芽細胞シートなどに代表される組織工学的手法を用いた心筋再生医療は、主として移植細胞の分泌する血管新生因子などの増殖因子を介したホストとの相互作用（パラクライン効果）による局所部位の血流改善や、組織の線維化、細胞死の抑制等の効果と考えられている。したがって、「置換可能かつ機能的な心筋再生組織の開発」は実現されていないのが現状である。再生心臓組織獲得のためには、(1) 再生組織内部に血管網を伴う厚みのある再生組織を構築すること、(2) 再生組織をドナーの組織に生着させること、が課題として挙げられる。他方、血管構築を補助する細胞群として血管内皮前駆細胞（endothelial progenitor cell：EPC）が報告されている。EPCは、骨髓造血幹細胞分画（CD34・133陽性）由来の細胞として末梢血液単核球中に存在し、末梢血へ動員、血管形成部位への生着・分化・増殖を経て「血管新生」に関与する。しかし臨床応用に際して、重症心不全患者は糖尿病、高血圧症などの酸化ストレスを惹起する基礎疾患を有していることが多く、そのため患者自身のEPCは健常人に比較して増幅／分化能が劣り、血管形成能が低下している。この点を改善すべく申請者らは、移植EPCの数・質を確保する方法として、「無血清培地生体外増幅培養法（quantity and quality control culture；QQ培養）」を確立した。さらに、末梢血液中の単核球をQQ培養した細胞群

（QQ細胞すなわち再生環境細胞（図1）は、血管再生作用以外に抗炎症作用/抗線維化作用、免疫寛容作用を持つ細胞群であることが明らかにした。上記の研究結果より、現在、「血管構築能（EPC）を伴い、かつ細胞環境調節細胞（QQ細胞）による生着率の向上した組織移植治療法」の実現に向けた研究を進めている。



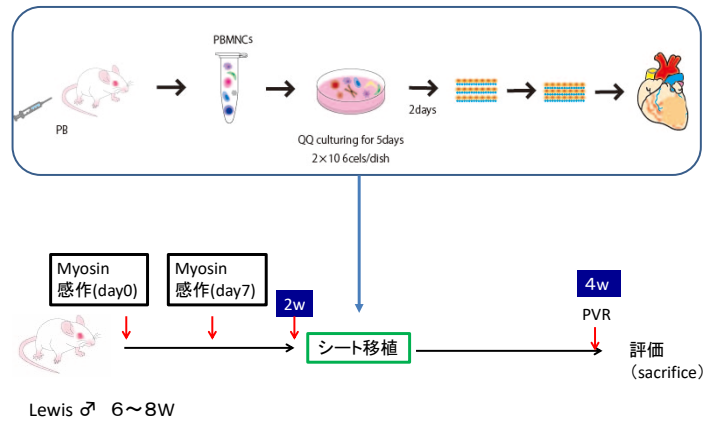
2. 研究の目的

重症小児心不全においてもドナー不足の理由から、成人患者以上に再生医療の臨床応用が期待されている。本研究ではEPCを含むQQ細胞をシート化して移植し、重症心不全に対する治療効果について検討した。

3. 研究の方法

- (1) 心筋ミオシンを等量の完全フロイドアジュバントと混合し、6週齢のLewisラットにday0、day7に皮下投与を行い、自己免疫性劇症型心筋炎による心不全モデルラットを作製した。
- (2) 8週齢のLewisラットの末梢血液から単核球を回収し、QQ培養を行った。QQ細胞のみでは細胞シートが作製困難なことから、Lewisラットの皮膚の線維芽細胞と共培養により細胞シートを作製した。治療効果を明確にする目的で、線維芽細胞のみの細胞シートも作製した。
- (3) ミオシン感作2週間後（心筋炎極期）心不全モデルラットに対し、以下の3群を作成し、QQ細胞シート移植効果について比較検討を行った；①QQ細胞シート（QQ細胞+線維芽細胞：

QQ 群)、②線維芽細胞シート(線維芽細胞のみ:F 群)、③開胸のみを施行したコントロール群(sham 群)。治療の効果検討のため、血液検査・心臓超音波検査を施行した。さらに、移植後2週間後に、心臓カテーテルによる圧容積解析・組織標本作製を行った。

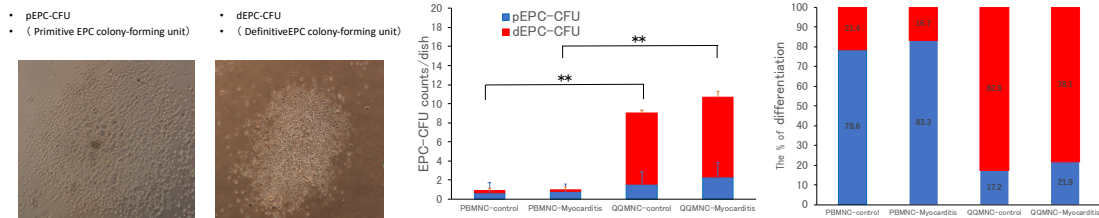


4. 研究成果

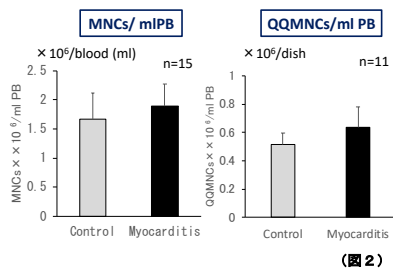
(1) ラットにおけるQQ培養の確立(コントロールと心筋炎モデルの比較)

従来のQQ培養法はマウスとヒトのみで確立されてきた。そのため、①ラットにおいても同様な細胞群が獲得可能であるか、また②基礎疾患を持つ患者では、末梢単核球中のEPC数やその増殖能や機能が低下することが報告されているが、本研究で用いる「心筋炎モデルラット」においても同様にQQ培養がそれらの点の改善に有効であるかを検討した。その結果、末梢血液からの単核球の回収率、培養細胞数とも既存の研究データと同様に問題なく回収、培養できることを確認した(図2)。この細胞群をColony-Forming Assayで評価したところ、コロニー形成も良好であり、その形態もヒト、マウスと同等の結果を示した(図3)。さらに、フローサイトメトリー、qPCRの細胞機能解析においても抗炎症性マクロファージ(CD206等)や血管再生因子(KDR, VEGF-A, VEGF-B等)の優位な上昇を認め、先行研究(Masuda et al. J Am Heart Assoc 2014)同様の機能を持つ細胞群を獲得できることを確認した(図4)。以上のことから、「ラット細胞に対するQQ培養の有効性」が確認された。

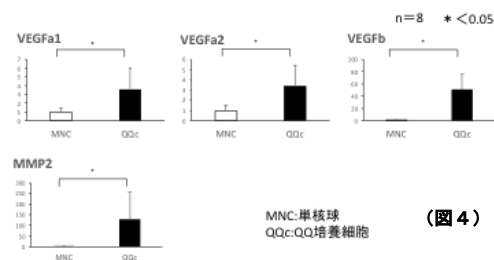
ラットQQ細胞のColony-Forming Assay



1dishあたりのQQ培養後の細胞回収率



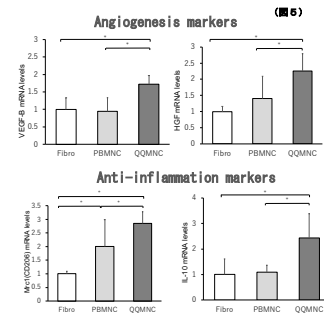
qPCRによる心筋炎ラットのQQ細胞解析



(2) 細胞シートの機能の qPCR 解析

移植細胞シートの機能を評価するために qPCR 解析を行った。QQ 細胞シートでは IL-10, CD206, VEGF の各 mRNA 発現が優位に高いことが示され (n=5~6, P<0.05)、「M2 マクロファージ由来の IL-10 増加」による抗炎症作用や VEGF による血管形成促進効果が示唆された (図 5)。この結果は、細胞シート化後も QQ 細胞機能が保たれることを示していた。

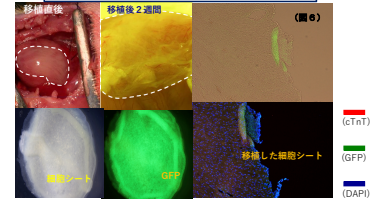
qPCRによる細胞シート解析



(3) 劇症化心筋炎後の心不全モデルラットにおける QQ 細胞シート移植の有効性検討

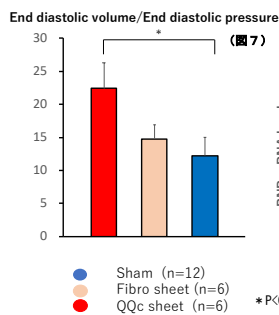
①QQ 細胞シートの組織着床能を検討する目的で、GFP 陽性線維芽細胞と QQ 細胞の共培養シートをラットの心臓に移植し、2 週間後に組織評価を行った。その結果、良好な組織着床能が確認された (図 6)。

Q細胞シートの組織着床能を検討

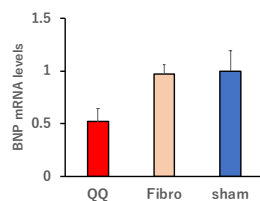


②3 群間比較 (QQ 群、F 群、sham 群) により QQ シート移植効果を検討した。圧容積関係解析では、QQ 群において心臓拡張能の有意な改善を認めた (図 7)。また、シート着床後の心臓組織を qPCR で解析した結果、心不全の重症度を表す BNP (brain natriuretic peptide) が低い傾向を認めた (図 8)。さらに、組織学的評価において QQ 群で有意な繊維化抑制効果 (P<0.05) が認められたことから (図 9)。これらの結果は、QQ 細胞の抗炎症作用による線維化抑制作用が働いたものと推察された。さらに、QQ 群において血管数の優位な増加も認めた (P<0.05, 図 10)。以上の結果から、重症心不全に対する QQ 細胞シート移植治療の有効性が示唆された。

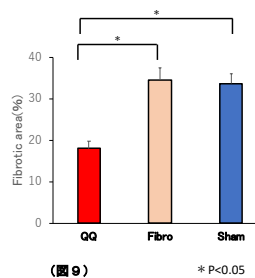
心臓機能解析



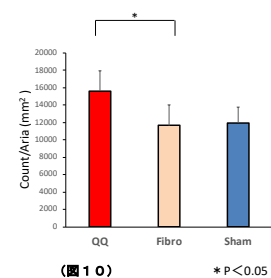
BNP発現解析



抗線維化作用解析



血管再生評価



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1: PEGylated carboxyhemoglobin bovine (SANGUINATE) ameliorates myocardial infarction in a rat model.

Kawaguchi AT, Salybekov AA, Yamano M, Kitagishi H, Sekine K, Tamaki T.

Artif Organs. 2018 Dec;42(12):1174-1184. doi: 10.1111/aor.13384. PMID: 30375680,

査読有

2: The vital prognosis of elderly adults living in a group home in their mid-eighties. Todoroki K, Ikeya Y, Fukui S, Tanaka C, Sekine K, Imazeki R, Shizuma T, Fukuyama N, Mori H. J Physiol Sci. 2017 Sep;67(5):561-568. doi: 10.1007/s12576-016-0485-9.

査読有

3: Losartan attenuates the coronary perivasculitis through its local and systemic anti-inflammatory properties in a murine model of Kawasaki disease.

Suganuma E, Niimura F, Matsuda S, Ukawa T, Nakamura H, Sekine K, Kato M, Aiba Y, Koga Y, Hayashi K, Takahashi O, Mochizuki H. Pediatr Res. 2017 Apr;81(4):593-600. doi: 10.1038/pr.2016.266. Epub 2016 Dec 20.

PMID: 27997528

査読有

4: Nutrition-dependent eicosapentaenoic acid deficiency in care house residents.

Todoroki K, Ikeya Y, Fukui S, Tanaka C, Sekine K, Shizuma T, Fukuyama N, Mori H. Nutrition. 2016 Jul-Aug;32(7-8):806-10. doi: 10.1016/j.nut.2016.01.025.

Epub 2016 Feb 19. PMID: 27134206

査読有

[学会発表] (計2件)

1 : 発表演題 : 重症心不全に対する再生環境細胞シート移植による治療法の確立

発表者 : 関根 佳織

学会名 : 第40回日本炎症・再生医学会

2019年7月16日

2 : 発表演題 : 重症心不全に対する再生環境細胞シート移植による治療法の確立

発表者 : 関根 佳織

学会名 : 第55回日本小児循環器学会総会・学術集会

2019年6月28日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

1 : 東海大学総合医学研究所ホームページ <http://ims.med.u-tokai.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：増田 治史

ローマ字氏名：MASUDA Haruchika

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：50278496

(2)研究協力者

研究協力者氏名：玉木 哲朗

ローマ字氏名：TAMAKI Tetsuro

研究協力者氏名：浅原 孝之

ローマ字氏名：ASAHARA Takayuki

研究協力者氏名：川口 章

ローマ字氏名：KAWAGUCHI Akira

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。