

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2021

課題番号：16K10635

研究課題名(和文)細胞生着人工心膜シートを用いた心不全に対する新たな再生医療の開発

研究課題名(英文)The development of the novel regenerative medicine to utilize the cell-engrafted artificial pericardial sheet

研究代表者

岡村 吉隆 (Okamura, Yoshitaka)

和歌山県立医科大学・医学部・学長特命教授

研究者番号：80245076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子導入技術を利用して、低下した心機能の改善効果を持つ線維芽細胞株の培養系を確立し、その線維芽細胞を臨床で用いられている人工心膜シートに生着させて、心不全ラットに移植することで、細胞治療効果が表れるかどうかを移植前後の心機能の改善の程度から評価し、臨床応用できる新たな心筋再生医療の開発を目的とした研究であったが、心機能の改善効果を持つ幹細胞の培養系を確立することができず、当初の研究目的を果たすことができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、移植細胞を人工心膜シートに生着させる方法として、最終的には温度応答性細胞培養ディッシュ上で作成した細胞シートを人工心膜シートに生着させることで、移植細胞接着人工心膜シートを作成しようとした。この細胞シートを人工心膜シートに生着させる方法は、新たな細胞治療法のアプローチとしての人工心膜移植法を確立させる可能性があったが、生着し、心不全モデルラットに移植した後の細胞生存数などの評価は、研究期間内に終わることができなかった。そのため、当初の研究目的は達成できなかった。

研究成果の概要(英文)：Our purpose was to assess the novel method in the cardiac cell therapy that expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) sheet engrafted the stem cells which improved the failed cardiac function was transplanted to the heart failure model rats. But we could not establish the stem cell line to be able to improve the cardiac function. Therefore, we could not achieve the our aim.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：心不全 再生医療 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性心不全は、虚血性心疾患、弁膜症、そして心筋症などの心疾患の臨床的末期像として、先進国の死因の上位を占めている。慢性心不全に対する治療としては、薬物療法、カテーテル治療、そして心臓手術などがあるが、慢性心不全では長年にわたる心筋に対する負荷により心筋そのものが障害を受けているため、どれも根本的治療とは言い難い。唯一の末期的心不全に対する根治的治療としては心臓移植があるが、donor 数の絶対的不足という問題が、これを標準的治療にするのを難しくしている。

心不全に対する幹細胞移植療法は現在脚光を浴びている新しい治療法である。以前は、移植された幹細胞が心筋細胞に分化することによって、低下した心機能が改善されると考えられていたが、現在の概念としては、移植された細胞が成長因子、サイトカインなどを含む様々な因子を分泌することによって、障害を受けている心筋がさらなるダメージから保護され、回復する手助けとなると考えられている (paracrine effect) (Williams AR and et al., *Circ Res* 109: 923-940, 2011)

しかしながら、臨床試験の結果は、この新しい治療法は有望であるが、臨床に応用されるにはまだ色々な面での改良が必要であることが示唆されている。改良すべきである点の一つは、細胞移植の delivery method である。既存の移植方法として、静脈注入、冠動脈注入、そして心筋直接注入などがあるが、低い移植細胞の生着率などの原因から、治療効果はそれほど高くなかった (Cambell N and et al., *J Cardiovasc Transl Res* 5: 713-726, 2012) が、近年細胞シート法が開発され、それによって移植された幹細胞は既存の移植法よりも高い移植細胞の生着率および治療効果が、急性心筋梗塞モデルと慢性虚血性心不全モデルの両方で示された (Narita T and et al., *Mol The* 4: 860-867, 2013, Tano N and et al., *Mol The* 10: 1864-1871, 2014)。

この細胞シート法の現在の主流な移植法は心筋表面、すなわち心外膜に直接添付する方法であるが、拍動した心臓表面に効果的な治療効果を得られるように細胞シートを添付するには技術の習熟が必要であると考えられる。また治療に用いる細胞ソースとしては、現在は骨髄由来間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell (MSC))、胚性幹細胞 (embryonic stem cell (ESC))、iPS 細胞、また心筋細胞そのものがあるが、どれも倫理的な面や、細胞を培養して治療効果が得られるまでに増やすという面でまだまだ改良の余地がある。線維芽細胞 (fibroblast: Fb) は、人体のあらゆる部位から簡単に採取でき、かつ容易に初期培養して必要な数だけ増やす方法が確立している。また paracrine effect は、分泌因子が心膜腔を経由しても十分心筋細胞に作用すると考えられる。

2. 研究の目的

我々は心不全に対する細胞移植療法の key mechanism である paracrine 効果を効率よく発揮する delivery route として心膜への細胞移植を考案した。本研究では、まず準備段階として、過去様々な発表により何らかのダメージを負った障害心筋に対して、機能低下の改善効果があるといわれている分泌因子である血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth

factor : VEGF) の遺伝子を、簡便に採取できる皮下線維芽細胞に過剰発現するように遺伝子導入を行い、心筋保護効果を発揮するような VEGF 過剰発現線維芽細胞の培養系を確立し、それを本研究での移植細胞とする。

VEGF 過剰発現線維芽細胞をすでに心臓血管手術に臨床応用されている人工物 (ダクロンまたは expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE)) に生着させることによって作成した細胞シートを心膜に移植するという新規の心臓再生医療の開発を目的とした。

また障害心筋の機能低下改善効果を期待できる分泌因子は VEGF の他にも内皮型一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase : eNOS) も発表されており、eNOS 過剰発現線維芽細胞の培養系も確立も目標とする。その eNOS 過剰発現線維芽細胞も人工心膜シートに生着させて、虚血性心不全モデルラットの心臓に移植して、実際に低下した心機能の改善効果があるかどうかを評価する。

3 . 研究の方法

本実験における、線維芽細胞はラットの皮下組織から採取し、継代培養を行ったものを用いる。線維芽細胞が移植されるのは同系交配ラットの左冠動脈 (LCA) を結紮することによって作成した虚血性心不全モデルを使って行う。平成 28 年度には、線維芽細胞をダクロンもしくは ePTFE シートに生着させる方法を確立する。平成 29 年度には、ある特定の paracrine 因子を、遺伝子導入技術を応用して強制発現を可能にした線維芽細胞株の樹立方法を確立する。平成 30 年度には、前年度で確立した遺伝子導入技術を用いて確立した VEGF 過剰発現線維芽細胞-ダクロン (もしくは ePTFE) シートを心膜に移植された虚血性心不全モデルラットの心機能改善効果を調べる。令和元年度には、VEGF 以外の eNOS を過剰発現させた線維芽細胞を生着させた人工心膜シートを、平成 30 年度と同様に虚血性心不全モデルラットに移植し、その心機能改善効果を評価する。

4 . 研究成果

本研究を進めていく上で、ある特定の paracrine 因子を、遺伝子導入技術を応用して強制発現を可能にした線維芽細胞株の樹立方法を確立が必要不可欠であった。しかしながらその移植細胞株の確立が困難であった。また、当初は移植細胞を人工心膜シートに生着させる方法を、ゼラチンを細胞の足場として生着させることを細胞濃度や、ゼラチンの濃度を変えることによって、さらには細胞培養用人工基底膜マトリクスである Matrigel®を添加するなどの方法を試みたが、ゼラチンを足場としての方法では、移植細胞を人工心膜シートに生着することは困難であった。そこで我々は移植細胞を、温度応答性細胞培養ディッシュ上で培養することにより、細胞外マトリクスを保持したままの状態をシート状に回収することができ、シートには細胞本来の接着機能を保持していると考えられ、その細胞本来の接着機能を利用して人工心膜シートに生着させることで、移植細胞接着人工心膜シートを作成しようとした。この細胞シートを人工心膜シートに生着させる方法は可能性があったが、生

着し、心不全モデルラットに移植した後の細胞生存数などの評価は、研究期間内に終えることができなかつた。そのため、当初の研究目的は達成できなかつた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	金子 政弘 (Kaneko Masahiro) (40433346)	和歌山県立医科大学・医学部・助教 (24701)	
研究分担者	吉増 達也 (Yoshimasu Tatsuya) (60316099)	和歌山県立医科大学・医学部・講師 (24701)	
研究分担者	畑田 充俊 (Hatada Atsutoshi) (70508027)	和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員 (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関