

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08757

研究課題名(和文)重症心不全に対する脂肪細胞由来再生細胞シートを用いた心筋再生療法の開発

研究課題名(英文) Experimental study of cardiac regeneration therapy using adipose-derived stem cell sheets

研究代表者

西村 元延 (NISHIMURA, Motonobu)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：90291442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪細胞由来再生細胞シートを作成し、心筋梗塞後の虚血性心不全に対するその心機能改善効果についてラットを用いて検討した。まず現在、保険適用となっている骨格筋芽細胞シートと血管新生因子分泌能について比較検討した。その結果、骨格筋芽細胞シートよりも多くの血管新生因子を分泌することが判明した。次に、ラット心筋梗塞モデルを用いて、再生細胞シートの心機能改善効果について検討した。その結果、脂肪細胞由来再生細胞シートは、骨格筋芽細胞シートと同等の心機能改善効果を示した。脂肪細胞由来幹細胞は、腹部の脂肪などから低侵襲で採取することが可能であり、臨床応用も期待できると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会の高齢化に伴い、心筋梗塞による虚血性心不全の患者数は増加傾向にある。しかしながら、その治療法は限られている。この脂肪細胞由来幹細胞を用いた再生細胞シートは、腹部などの脂肪から作成することが可能であり、低侵襲かつ比較的簡単に作成可能である。これを用いた再生細胞シートは、現在、保険適用となっている骨格筋芽細胞シートよりも、簡便に作成できる可能性があり、臨床応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Adipose-derived stem cells (ADSC) are a source of regenerative cells available for autologous transplantation to hearts. We compared protective actions of ADSC sheets on rat myocardial infarction (MI) in comparison with those of skeletal myoblast cell sheets. ADSC sheets secreted higher concentrations of angiogenic factors (HGF, VEGF, and bFGF) than those of myoblast cell sheets. Like myoblast cell sheets, ADSC sheets improved cardiac function and decreased the plasma level of ANP in rat MI hearts. ADSC sheets restored cardiac remodeling characterized by fibrosis, cardiac hypertrophy and impaired angiogenesis, which was associated with increased in angiogenic factors. These results indicated that ADSC sheets improved cardiac function and remodeling of MI Hearts mediated by their paracrine action and this improvement was comparable to those by myoblast cell sheets.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：心不全 虚血性心筋症 細胞シート 脂肪細胞由来幹細胞 再生治療

## 1. 研究開始当初の背景

現在、心筋梗塞後の重症心不全、すなわち最大限の内科的治療でも十分に心不全がコントロールできないような、いわゆる虚血性心筋症に対する確立された治療法はないのが現状である。左室形成術や僧帽弁に対する外科的介入は症例によっては有効との報告もあるが、大規模な randomized trial では negative な結果も報告されている。また補助人工心臓や心臓移植は、現段階では、補助人工心臓については耐久性や血栓症・感染症などの合併症、また心臓移植については脳死ドナー不足などの問題があり、治療を必要とするすべての患者にいきわたる治療とは言い難い。またいずれの治療も適応年齢が 65 歳未満とされており、65 歳から 75 歳といった比較的高齢の患者に多い本疾患の治療法としてはカバーする年齢層も不十分と言わざるを得ない。

最近、遺伝子工学や細胞組織工学、再生医療等を駆使した再生型治療が、移植や人工臓器による置換型治療にかわる新しい治療法として注目されている。なかでも、心筋に対する細胞移植の研究は数多く行われており、種々の細胞が試みられ、その多くでは細胞移植により心機能が向上することが報告されている。

この効果の大部分は、移植された細胞から血管新生因子等が分泌されること(パラクライン効果)によるものであることが報告されており、これにより壊死範囲の縮小、心筋リモデリングの抑制につながる事が知られている。特に、細胞シートを用いた心筋再生治療では、細胞外マトリックスを維持したまま心筋に貼付することができるため、血管新生因子等の分泌が多く、長く続き、心筋内への細胞注入よりも効果的であることが報告されており[1]、骨格筋芽細胞を用いた細胞シートは、先進医療、臨床治験とすすめられ、ハートシートとして保険適用された。

しかしながら、骨格筋芽細胞シートを使った治療は、細胞を患者の骨格筋より採取する必要があり、患者への負担が大きいという欠点がある。骨格筋芽細胞と同程度以上で、より低侵襲で採取可能な細胞があれば、患者への負担は軽減し、治療選択の幅が広がると考えられる。また、期待を集める iPS 細胞も allograft であることや癌化など臨床応用へ向けて解決されるべき問題点も多い。細胞シートをもちいた心筋梗塞後心不全に対する治療は、その細胞ソースがさまざまに模索されているのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は**脂肪細胞由来再生細胞 (Adipose Derived Regenerative Cells : ADRC)**を用いた細胞シートの虚血性心筋症に対する有用性を示し、臨床応用の可能性を探ることである。本研究で我々が用いる ADRC は、脂肪組織中に大量に存在する間葉系幹細胞で、高い分化能を有し、間葉系幹細胞源として期待されている細胞であり、心筋梗塞や重症虚血肢など様々な治療分野での利用が研究されている[2, 3]。また我々の連携研究者である久留らは、GFP とルシフェラーゼが恒常的に発現する遺伝子改変ラットを用いた実験において、このラットの脂肪組織から作成した脂肪細胞由来幹細胞シートをラット心筋梗塞モデルに応用し、その結果、シート貼付した近傍の血管に GFP 陽性細胞が取り込まれていた。このことは ADRC を用いた細胞シートはパラクライン効果だけではなく血管への分化を介して心筋梗塞時の心不全を改善する効果を発揮する可能性も考えられる。しかし ADRC を用いた治療報告は少なく、骨格筋芽細胞と比較している報告も少ない。ADRC を心筋シートに応用することができれば、治療効果という面でもまた細胞ソースという面でも新たな虚血性心筋症に対する治療の選択肢となるのではないかと考えている。本研究では、ラット心筋梗塞モデルを用いて ADRC を用いた細胞シートと骨格筋芽細胞を用いた

細胞シート、それぞれの心機能に及ぼす効果を比較検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ADRC シートと骨格筋芽細胞シートは、それぞれ原田らによる方法、関谷らによる方法で作成した。

#### 実験 1：血管新生因子の分泌能の比較

In vitro で、それぞれのシートを incubate し、HGF、VEGF、bFGF の発現を RT-PCR で定量比較した。

実験 2：ラット虚血性心不全モデルをラット心の左冠状動脈前下行枝を結紮することで作成した。これを ADRC シート、骨格筋芽細胞シート、コントロールの 3 群に分け、心筋梗塞作成後 7 日目に、もう一度開胸し、心筋梗塞部を中心にシートを貼付した。シート貼付 2 週間後、4 週間後に心臓超音波検査を行い、新機能を評価した。

### 4. 研究成果

#### 実験 1：

図 1

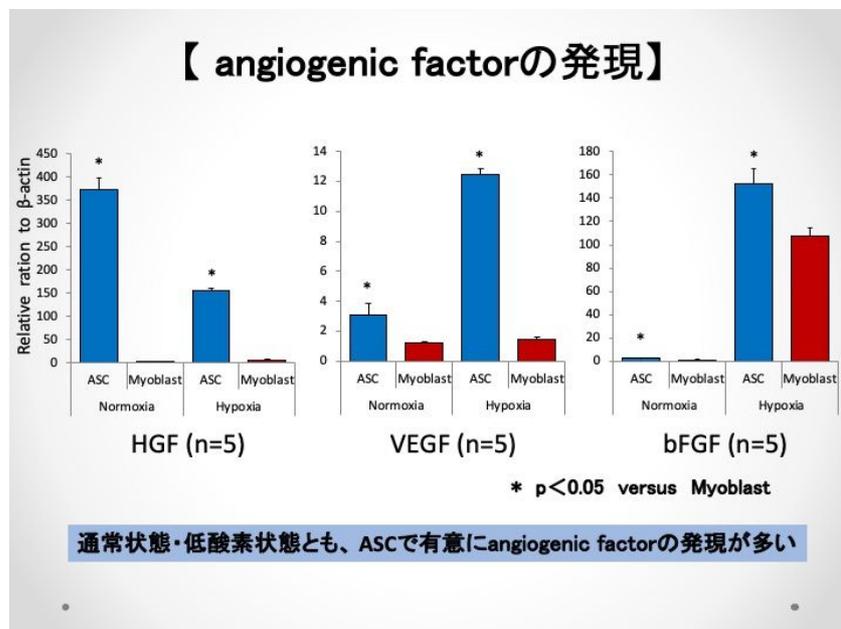


図 1 に示す HGF, VEGF, 3 種類の

angiogenic factor の発現は、通常状態、低酸素状態とも骨格筋芽細胞(Myoblast)よりも ADRC(adipose stem cell (ASC))で多かった。

ように、bFGF の

#### 実験 2：

図 2

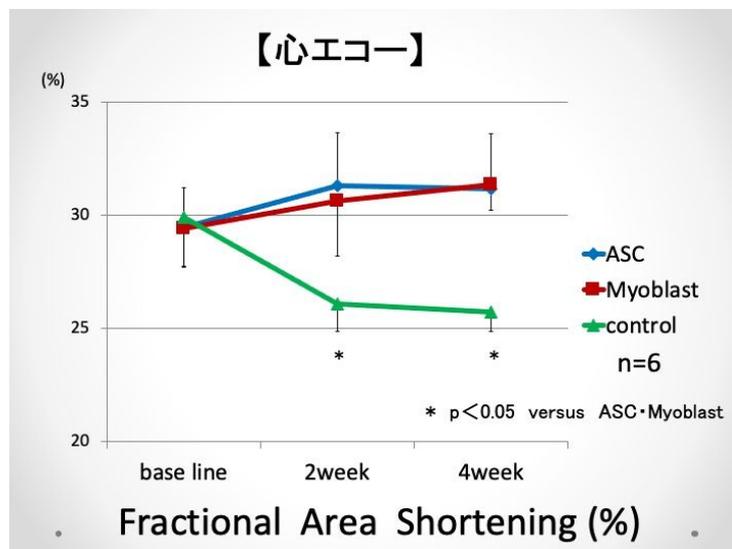


図2に示すように、心臓超音波検査で fractional area shortening を計測し、評価した心機能は、base line (シート治療前)と比較して、control 群では低下する傾向であったのに対し、ADRCシート貼付群(ASC)、骨格筋芽細胞シート貼付群(Myoblast)では、改善傾向を示し、いずれの群も control 群に比し有意に高値であった。

#### 引用文献

1. Memon IA, Sawa Y, Fukushima N, Matsumiya G, Miyagawa S, Taketani S, Sakakida SK, Kondoh H, Aleshin AN, Shimizu T *et al*: **Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005, **130**(5):1333-1341.
2. Madonna R, Delli Pizzi S, Di Donato L, Mariotti A, Di Carlo L, D'Ugo E, Teberino MA, Merla A, Tartaro A, De Caterina R: **Non-invasive in vivo detection of peripheral limb ischemia improvement in the rat after adipose tissue-derived stromal cell transplantation.** *Circ J* 2012, **76**(6):1517-1525.
3. Mazo M, Cemborain A, Gavira JJ, Abizanda G, Araña M, Casado M, Soriano M, Hernández S, Moreno C, Ecay M *et al*: **Adipose stromal vascular fraction improves cardiac function in chronic myocardial infarction through differentiation and paracrine activity.** *Cell Transplant* 2012, **21**(5):1023-1037.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Watanabe M, Horie H, Kurata Y, Inoue Y, Wakimizu T, Adachi M, Yamamoto K, Morikawa K, Kuwabara M, Sakaguchi T, Morisaki T, Miake J, Nishimura M, Tusneto M, Shirayoshi Y, Ito S, Kitakaze M, Ninimiya H, Yamamoto K, Hisatome I	4. 巻 85
2. 論文標題 Esm1 and Stc1 as angiogenic factors responsible for protective actions of adipose-derived stem cell sheets on chronic heart failure after rat myocardial infarction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 657-666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-20-0877	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Adachi M, Watanabe M, Kurata Y, Inoue Y, Notsu T, Tamamoto K, Horie H, Tanno S, Morita M, Miake J, Hamada, T, Kuwabara M, Nakasone N, Ninomiya H, Tsuneto M, Shirayoshi Y, Yoshida A, Nishimura M, Yamamoto K, Hisatome I	4. 巻 83
2. 論文標題 -adrenergic blocker, Carvedilol, abolished ameliorating actions of adipose-derived stem cell sheets on cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 2282-2291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-19-0261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto K, Kurata Y, Inoue Y, Adachi M, Tsuneto M, Miake J, Ogino K, Ninomiya H, Yoshida A, Shirayoshi Y, Suyama Y, Yagi S, Nishimura M, Yamamoto K, Hisatome I	4. 巻 9
2. 論文標題 Pretreatment with an angiotensin II receptor blocker abolished ameliorating actions of adipose-derived stem cell sheets on cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Regeneration Therapy	6. 最初と最後の頁 79-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2018.08.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔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	中村 嘉伸  (NAKAMURA Yoshinobu)  (80335538)	鳥取大学・医学部・准教授   (15101)	
研究分担者	原田 真吾  (HARADA Shingo)  (80529420)	鳥取大学・医学部・助教   (15101)	
研究分担者	岸本 祐一郎  (KISHIMOTO Yuichiro)  (20623911)	鳥取大学・医学部・助教   (15101)	

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
---------	---------