

令和 4 年 5 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15839

研究課題名(和文) 陳旧性心筋梗塞に対する脂肪間葉系幹細胞を用いた自家移植治療に関する研究

研究課題名(英文) autologous transplantation of adipose tissue derived mesenchymal stromal cells to the old myocardial infarction heart

研究代表者

近藤 尚通(kondo, naomichi)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70797000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：最も効果的な細胞移植方法は免疫拒絶反応がない自家移植であると仮定し、脂肪由来間葉系幹細胞を心筋梗塞マウスの心嚢腔内に移植することで、自家移植モデルを確立した。従来の同系移植、他家移植モデルと比較することで移植治療効果を解析した。

自家移植群で移植片がより長期生着することが確認された。移植片へのリンパ球浸潤は自家移植群が最も少なく他家移植群が最も多かった。心エコー検査で移植治療による心拡大抑制効果を確認した。脂肪由来間葉系幹細胞は培養皿上で自律拍動する筋細胞、血管内皮細胞などに増殖分化するが、先に凍結保存してから後日解凍し培養皿上で増殖分化させても同じく自立拍動する筋細胞と血管細胞になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓領域における従来の細胞移植研究では、細胞移植効果は実臨床レベルでは不明である。その原因だが、我々は移植した細胞が免疫拒絶され長期生着しない問題に着目した。脂肪由来間葉系幹細胞は自己の脂肪組織から採取可能であり、安全性、倫理性に優れ最も実用的な移植細胞ソースである。それをを用いたマウス自家移植モデルを確立することによって、自家移植が免疫拒絶反応を軽減し移植片を長期生着させることを確認した。また心筋内に細胞を針で注射することなく心外膜で心嚢腔内に移植片を覆い封じ込めることにより、非侵襲的な細胞移植方法も同時に確立した。

研究成果の概要(英文)：Assuming that the most effective cell transplantation (TX) method is autologous TX without immune rejection, we established an autologous TX model by transplanting adipose-derived mesenchymal stem cells into the pericardial space of mice with myocardial infarction. The TX treatment effect was compared with conventional syngeneic and allogeneic TX models.

The autologous TX group showed the most prolonged graft survival. Lymphocytic infiltration into the graft was lowest in the autologous TX group and highest in the allogeneic TX group. Echocardiography showed the autologous TX prevented cardiac enlargement. Adipose-derived mesenchymal stem cells could proliferate and differentiate into self-beating myocytes and vascular endothelial cells on culture dishes after being frozen and thawed on culture dishes.

研究分野：心筋再生

キーワード：心筋再生 脂肪間葉系幹細胞 心筋梗塞 心外膜

1. 研究開始当初の背景

心臓領域において細胞移植に関する基礎研究は多くあるが、動物実験で示唆された細胞移植によるパラクライン効果が実臨床で証明されていないという問題がある。そこで我々はパラクライン効果だけではなく心筋梗塞で失われた組織に外的な細胞を補充、長期生着させる新たな移植方法開発の研究の動機に至った。

移植細胞の長期生着に必要な要素として、移植細胞への栄養供給、足場、そして免疫拒絶をうけないことが重要であると考えた。我々は細胞を *in vitro* で 3 次元培養するための足場研究を行ってきたが、自己集合ペプチドを人工足場として最適な素材と考え、急性期心筋梗塞モデルマウスにおいて、心筋前駆細胞を人工足場と共に心筋内に注射し心機能を改善させたという研究結果を報告した(*1)。手術手技の向上により陳旧性心筋梗塞モデルでの移植実験手技が確立したこともあり、自己集合ペプチドを足場として体外で増殖分化させた自己の脂肪由来間葉系幹細胞(MSC)をマウスの心嚢腔内に自家移植し、心筋梗塞で失われた組織に補充、長期生着させようとする具体的な研究の着想に至った。

2. 研究の目的

パラクライン効果だけではなく、心筋梗塞によって失われた組織に外的な細胞を補充、長期生着させることで細胞移植治療効果の向上を狙う。自家移植を他の移植方法(同系移植、他家移植)と比較することにより、自家移植による心機能改善効果と免疫拒絶反応の有無を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)移植片の作成

C57BL6 マウス背部にある褐色脂肪組織から脂肪由来 MSC を採取。体外特殊培養環境下にて自立拍動する筋細胞、血管内皮細胞、壁細胞からなる細胞集団に増殖分化させる。それらの細胞集団を人工足場である自己集合ペプチドと混ぜてゲル化させることで十分な細胞数をもつゲル状移植片(細胞数 $5 \times 10^5 / 100 \mu l$)を作成する。同系移植モデルの場合は別の C57BL6 マウスに移植する。他家移植モデルの場合は BALB/c 由来の移植片を C57BL6 マウスに移植する。

(2)心筋梗塞モデルマウスの作成

全身麻酔下にて肋骨切開せずに左肋間筋を切開、心外膜の上から左冠動脈を永久結紮して閉胸する。

(3)陳旧性心筋梗塞モデルマウスへの細胞移植

上記(2)で作成した心筋梗塞 2 週間後のマウスを全身麻酔し胸骨正中切開で開胸。心外膜を部分切開し菲薄化した梗塞巣表面に移植片を乗せ心外膜を結紮することで心嚢腔内に移植片を封入する。

(4)移植治療効果と免疫拒絶反応の解析

移植 2 週間後、4 週間後に心臓超音波を施行し、移植部位の壁厚を経時的に測定する。移植 4 週間後に病理解剖し、免疫染色で移植片の厚み、性状を評価する。移植片へのリンパ球浸潤を評価する。心臓超音波で心収縮力、左室径を経時的に測定することで移植による心機能改善効果を解析する。

4. 研究成果

自家移植群で移植片がより長期生着することが確認された。移植片へのリンパ球浸潤は自家移植群が最も少なく他家移植群が最も多かった。心エコー検査で移植治療による心拡大抑制効果を確認した。脂肪由来 MSC は培養皿上で自律拍動する筋細胞、血管内皮細胞などに増殖分化するが、先に凍結保存してから後日解凍し培養皿上で増殖分化させても同じく自立拍動する筋細胞と血管内皮細胞になった。これは自己由来の移植細胞を一旦保存しておき後日都合がよいときに移植細胞を使用できる可能性を示した。

<引用文献>

*1 Tokunaga, Kondo J Mol Cell Cardiol. 2010;49(6):972

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kondo N, Nagai T, Aoki I, Kanda M, Takahashi T, Kobayashi Y.
2. 発表標題 Transplantation of Adipose-Derived Stromal Cells with Self-Assembling Peptide Scaffolds into the Pericardial Space Prevents Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction
3. 学会等名 日本循環器学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kondo N, Nagai T, Aoki I, Takahashi T, Kanda M, Kobayashi Y
2. 発表標題 Pericardial transplantation of adipose-derived stromal cells with self-assembling peptides scaffold prevents cardiac remodeling after myocardial infarction in mice
3. 学会等名 European Society of Cardiology (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Kondo N
2. 発表標題 Transplantation of Brown Adipose Tissue-Derived Cells with the Self-Assembling Peptides Scaffold into the Pericardial Space Attenuates Cardiac Remodeling in a Mouse Old Myocardial Infarction Model
3. 学会等名 American Heart Association 2018 Scientific Session (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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