

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591625
 研究課題名(和文) 自己幹細胞誘導により自然治癒メカニズムを応用した心筋再生治療法の確立
 研究課題名(英文) Therapeutic effect of growth factor enhancement of cardiac regeneration on cardiac remodeling in infarcted rat hearts.
 研究代表者
 上野 高義 (UENO TAKAYOSHI)
 大阪大学・医学系研究科・講師
 研究者番号：60437316

研究成果の概要：

本研究では徐放化ゼラチンシートにSDF-1を吸収させ、SDF-1を長期間放出することにより、末梢血幹細胞を心筋梗塞部に誘導することで心機能を改善させることを目的とした。予めG-CSFにより骨髄中から末梢血へ幹細胞を誘導し、SDF-1を吸収させたゼラチンシートを慢性心筋梗塞モデル動物に貼付することで、心機能の改善の有無を評価した。SDF-1移植群において心機能改善傾向とリモデリング抑制効果が確認された。細胞移植を必要とせず、成長因子とマトリックスのみで心筋再生を実現できる新たな治療法として有用である。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2008年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：心筋再生，心筋梗塞，幹細胞誘導因子

1. 研究開始当初の背景

心不全に対する治療法として、ブロッカーやACE-inhibitorによる内科治療が行われるが、それらも奏功しないほど重症化した場合には、補助人工心臓や心臓移植等の置換型治療が有効で、我々も本邦における臨床的有用性を報告してきた。しかし、これら重症心不全に対する置換型治療はドナー不足や免疫

抑制、合併症など解決すべき問題が多く、すべての重症心不全患者に対する普遍的な治療法とは言い難い。

一方、最近、重症心不全治療の解決策として新しい再生型治療法の展開が不可欠と考えられる。心筋細胞は、殆ど分裂しないため、不全心筋において傷害を受けた心筋細胞は最終的にapoptosis等によりその数は減少す

る。しかし、最近、心筋細胞等による心筋への細胞移植は心機能を改善する事が報告され、骨格筋芽細胞による細胞移植、骨髄単核球細胞移植の臨床応用が開始されており成果を挙げてきた。また、当科でも筋芽細胞と骨髄細胞の併用療法を行い、心機能改善を報告した。しかし、細胞治療はその培養に時間を要すること、つまり培養期間中に患者の状態が悪化し結局移植細胞数が十分でない可能性が示唆されている。一方で感染の問題も示唆されている。また、骨格筋芽細胞の場合には心筋に分化するのではないため不整脈の問題、また、骨髄単核球細胞の場合には、分化の方向性が決定されていないため未だ分化の最終形が明確でないという問題がある。

近年、G-CSF 投与による心機能改善が報告され注目を集めている。2001年にOrlicらは、G-CSF により抹消血幹細胞を心筋梗塞領域へ誘導し、誘導された幹細胞が心筋細胞へ分化した結果、心機能が改善したと報告した(1)。さらに、最近、虚血再灌流による心筋障害に対し、G-CSF を投与することで、虚血再灌流によって生じた心筋アポトーシスを抑制、あるいは炎症細胞誘導により早期に梗塞領域を線維化させることにより、後に生じる心筋リモデリングを抑制するとされている(2, 3)。しかし、これらの心機能の改善は、心筋梗塞急性期においておこるものであり、心筋梗塞の慢性期にG-CSF の投与による効果の報告はされていない。

本研究では、予め G-CSF により骨髄中から抹消血へ幹細胞を誘導し、SDF-1 を吸収させたゼラチンシートを慢性心筋梗塞モデル動物に貼付することで、心機能の改善の有無を評価する。さらに、梗塞領域に誘導された細胞種を同定する。

2 . 研究の目的

SDF-1 は stromal cell derived factor と呼ばれるように、幹細胞を誘導する因子であり、慢性心筋梗塞モデルに対して、SDF-1 をアデノウイルスで遺伝子導入することで、慢性心筋梗塞の心機能が改善したと報告されている(4-5)。これらの報告では、SDF-1 が抹消血幹細胞を心筋梗塞部に誘導し、抹消血幹細胞が心筋細胞、あるいは血管内皮細胞に分化することにより、梗塞部が再生され心機能が改善する。

しかし、ウイルスを人体に投与することは、倫理的にもまだまだハードルが高く、迅速な対応が必要な重症心不全治療には適さない。そこで、本研究では徐放化ゼラチンシートにSDF-1 を吸収させ、SDF-1 を長期間放出する

ことにより、抹消血幹細胞を心筋梗塞部に誘導することで心機能を改善させることを目的とする。

これまで遺伝指導により成果を認めていた SDF-1 を徐放化ゼラチンシートに吸収させることで長期間にわたり、放出が可能である。さらに、予め G-CSF により骨髄から幹細胞を抹消血へ誘導し、この結果、従来と同様の成果が期待できる上に、ゼラチンシートを用いることで人体への応用も十分考慮に入れることが可能である。本研究は独創的でありかつ治療は円滑に行え、患者の待機時間もなく、感染の危険性も低く、従来の細胞移植治療よりもこれらの点において優れている。

3 . 研究の方法

(1) 心筋梗塞後の SDF-1 発現

SD rat 8 週令の を用いて、全身麻酔下左開胸にて、心臓を露出する。左肺を虚脱させ心膜を切開。左心耳を挙上して左前下行枝を結索することにより心臓前壁～心尖部にかけて心筋梗塞を作製する。白色化するため梗塞の可否を肉眼的に判断できる。これを梗塞後 1 週、2 週、4 週、6 週、8 週における time course にて各時点で各 5 匹の凍結切片を採取する

(2) RT-PCR による SDF-1 の発現検討

各時点での心臓組織における SDF-1 の発現を RT-PCR で検討する。

(3) 心筋梗塞モデル作製

SD rat 8 週令の を用いて、全身麻酔下左側方開胸にて心臓を露出する。左前下行枝を結索することにより心臓前壁～心尖部にかけて心筋梗塞を作製する。

(4) G-CSF 投与

心筋梗塞作成後 2 週間目から G-CSF を連日 5 日間投与する。投与法は、20ug/匹/日である。すなわち、5 日間連続投与により、計 100ug/匹投与することになる。

(5) SDF-1 含有ゼラチンシート作製

予め作製されたゼラチンシートに SDF-1:20ug を溶解した PBS:125ul をゼラチンシート上にむらなく滴下し、4 にて一晚保管することで吸収される。

(6) 再手術

心筋梗塞後 3 週目に、梗塞モデルラットを全麻酔下に再開胸し、心筋梗塞部を被覆するように SDF-1 含有または PBS 含有ゼラチン

シートを圧着する。シート圧着後、閉胸する。また、SDF-1 direct injection 群は、SDF-1:20ug/PBS:125 ul の溶解液を心筋梗塞周辺部に直接移植する。PBS direct injection 群は、PBS:125 ul のみを心筋梗塞周辺部に直接移植した。

(7) 心機能評価

心エコーにて、治療後 2、4、6 週後に心機能を評価した。評価項目は、左室拡張期面積、収縮期面積、左室駆出率、左室拡張期径、左室収縮期径。

(8) 組織学的評価

治療後 2、4、6 週後に組織学的検討を行った。H.E 染色、Masson Trichrome 染色を行った。また、免疫染色としては、cardiac stem cell marker として知られる c-kit, CD34+, Sca-1 により幹細胞の誘導を評価した。Factor-VIII, PCNA, SMA 染色を行う。一方で、梗塞モデルでの無治療群の組織での RT-PCR による増殖因子の発現を time course で評価した。

4. 研究成果

心筋梗塞後の SDF-1 発現の検討において、心筋梗塞初期に SDF-1 の発現が上昇する傾向が観察された。

心筋梗塞ラット作製時において、死亡率は約 30% であり、主要な死因は不整脈、低心拍出量であったが、生存個体については、同程度の心機能をしめす、心筋梗塞モデルが作製できた。

SDF-1 溶液を含浸させたゼラチンシートは、移植可能な強度を保持しており、容易に心筋梗塞部位への移植が可能であった。

そして、心臓超音波検査より、SDF-1 移植群は他群と比較して心機能改善傾向がみとめられた。

組織学的検討から、新生血管の誘導と左室拡大の抑制が認められリモデリング抑制効果が確認された。

さらに、免疫染色の結果から、幹細胞マーカーである c-kit, CD34+ 陽性の細胞群が観察された。これらの結果から、骨髄由来の幹細胞の梗塞部への集積と血管新生による組織血流の改善による相乗効果によって、リモデリング抑制と心機能効果が示されたと考えられる。今後、骨髄移植モデル等を用いて、心筋組織に集積した細胞の起源を追跡し、心機能改善効果のメカニズムを詳細に検討することも視野にいれて研究を進展させていく。

本研究は、細胞移植を必要とせず、成長因

子とマトリックスのみで心筋再生を実現できる新たな治療法として有用である。

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 1 件)

Fukui S, Kitagawa-Sakakida S, Kawamata S, Matsumiya G, Kawaguchi N, Matsuura N, Sawa Y, Therapeutic effect of midkine on cardiac remodeling in infarcted rat hearts. Ann Thorac Surg. 2008 Feb;85(2):562-570.

[学会発表](計 1 件)

Fukui S, Matsumiya G, Fukushima N, Ichikawa H, Kuratani T, Sakaki M, Ueno T, Matsue H, Fujita T, Sawa Y. Heart Failure Models of Large Animals for Preclinical Trial of Myocardial Regeneration Therapy, 日本心不全学会 学術集会, 浦安, 9.9-10, 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 高義 (UENO TAKAYOSHI)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 60437316

(2) 研究分担者

澤 芳樹 (SAWA YOSHIKI)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 00243220

市川 肇 (ICHIKAWA HAJIME)
大阪大学・医学系研究科・特任教授 (常勤)
研究者番号: 60303939

松宮 護郎 (MATSUMIYA GORO)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 20314312

倉谷 徹 (KURATANI TORU)
大阪大学・医学系研究科・寄付講座准教授
研究者番号: 90448035

白川 幸俊 (SHIRAKAWA YUKITOSHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：20457013

松江 一 (MATSUE HAJIME)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：80437318

(3)連携研究者

宮川 繁 (MIYAGAWA SHIGERU)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70544237

齋藤 充弘 (SAITO ATSUHIRO)
大阪大学・医学部附属病院・特任助教(常勤)
研究者番号：20448038

(4)研究協力者

福井 伸哉 (FUKUI SHINYA)
大阪大学・医学系研究科・大学院生

今西 悠基子 (IMANISHI YUKIKO)
大阪大学・医学系研究科・大学院生