

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：84503

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390399

研究課題名（和文）新規脂肪組織由来幹細胞を用いた重症心不全に対する画期的治療法の開発

研究課題名（英文）ADMPCs as a promising tool for cardiac regeneration

研究代表者

松山 晃文（MATSUYAMA AKIFUMI）

（財）先端医療振興財団 再生医療開発支援部 部長

研究者番号：10423170

研究成果の概要（和文）：

従来の治療法で治療しえない重症心不全に対する心筋再生治療法の研究開発は急務である。研究開始までに我々が開発してきた新規の脂肪組織幹細胞を高機能化させる技術を基盤とし、脂肪組織幹細胞由来再生心筋芽細胞の高機能化をはかった。nkx2.5 をマーカーとして脂肪組織由来幹細胞を心筋芽細胞へと高機能化する培養条件検討と薬剤のスクリーニングを実施し、低分子化合物ライブラリー（のべ約 2000 種類）から、添加培養により心筋マーカーである *alpha-Cardiac actin*、*Myosin Light Chain*、*Cardiac troponin I*、*Myosin Heavy Chain* のすべての発現を誘導する薬剤として“polyamine”のスクリーニングに成功し、特許出願を行った。ついで、これら高機能化心筋芽細胞の有用性を確認するための大動物モデルの構築を試みた。重症心不全モデルブタとして 2 段階梗塞作製法による重症心不全モデルを用い、高機能化誘導心筋芽細胞の有効性を検証した。大阪大学心臓血管外科及び（独）理化学研究所と共同で心駆出率が 30%~35% の重篤な慢性心筋梗塞モデルブタを作製、高機能化心筋芽細胞を投与したところ、心駆出率は 45%~55% に改善することを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Background: Polyamines has been reported to make embryonic stem cells differentiate into cardiac lineage. In this study, we examined whether spermine could commit human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells (hADMPCs) into cardiac lineage and whether the polyamine treated-hADMPCs would differentiate into cardiomyocytes-like cells and improve left ventricular dysfunction in a swine chronic myocardial infarction model.

Methods and Results: After 24h-treatment with polyamine, hADMPCs showed the augmentation of cardiac marker-expressions; nkx2.5, islet-1, alpha-cardiac actin and cardiac troponin I (11.2-, 27.5-, 43.6- and 19.1-fold to hADMPCs *per se*, respectively). To examine the effect of polyamine treated-hADMPCs on left ventricular dysfunction, swine chronic MI model were built up by first ballooning and reperfusion to first diagonal branch and second one to left ascending coronary artery (#6) 1 week-later. Four week-later second one, the swine (immunization with CyA 0.6mg i.m./kg/day) received transplantation of polyamine treated-hADMPCs (1×10^5 , 3×10^5 , 1×10^6 and 3×10^6 cells/kg) or lactic Ringer's solution via intracoronary (#6), and echocardiogram was examined at 0, 4, 8 and 12 weeks after

transplantation. Follow-up showed rescue of function in the transplanted, and the most effective dose was 3×10^5 cells/kg (EF; 33.4%, 47.0%, 51.5% and 52.9% at 0, 4, 8 and 12 week-after transplantation, respectively). Histologically, the polyamine treated-hADMPCs were engrafted into the scarred myocardium and reprogrammed into human specific troponin I and alpha-cardiac actin positive cells *in situ* 12 week-after transplantation. **Conclusion:** The transplantation of polyamine treated-hADMPCs is a potentially effective therapeutic strategy for future cardiac tissue regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

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：再生医療・循環器・高血圧・脂肪組織・幹細胞・心筋細胞

1. 研究開始当初の背景

重症心不全は予後不良な難治性疾患であり、特に end-stage 心不全にあつては1年死亡率が75%とされる。本症重症例に対しては心臓移植が究極の治療法である。臓器移植法の改正をみたが、ドナー不足が急速に解決される訳ではない。移植待機日数も1000日を超え、待機死する患者さんも多い。

2. 研究の目的

研究開始までに我々が開発してきた新規の脂肪組織幹細胞を心筋芽細胞へと分化させる技術を基盤とし、脂肪組織幹細胞由来再生心筋芽細胞の高機能化をはかることを目的とした。

3. 研究の方法

nkx2.5をマーカーとして脂肪組織由来幹細胞を心筋芽細胞へと誘導する培養条件検討と薬剤のスクリーニングを実施し、低分子化合物ライブラリー(のべ約2000種類)から高機能化する条件を検討した。

高機能化心筋芽細胞の有用性を確認するため2段階梗塞作製法モデルを用い、高機能化誘導心筋芽細胞の有効性を検証した。

4. 研究成果

Nkx2.5をマーカーとして脂肪組織由来幹細胞を心筋芽細胞へと高機能化する培養条件検討と薬剤のスクリーニングを実施し、低分子化合物ライブラリー(のべ約2000種類)から、添加培養により心筋マーカーである

alpha-Cardiac actin、*Myosin Light Chain*、*Cardiac troponin I*、*Myosin Heavy Chain* のすべての発現を誘導する薬剤として”polyamine”のスクリーニングに成功し、特許出願を行った。

高機能化心筋芽細胞の有用性を確認するための大動物モデルの構築を試みた。重症心不全モデルブタとして2段階梗塞作製法による重症心不全モデルを用い、高機能化誘導心筋芽細胞の有効性を検証した。大阪大学心臓血管外科及び(独)理化学研究所と共同で心駆出率が30%~35%の重篤な慢性心筋梗塞モデルブタを作製、高機能化心筋芽細胞を投与したところ、心駆出率は45%~55%に改善することを見出した。

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9件)

Komoda H, Okura H, LeeC-M, Sougawa N, Iwayama T, Hashikawa T, Saga A, Yamamoto-Kakuta A, Ichinose A, Murakami S, Sawa Y and Matsuyama A. Reduction of Neu5GC Xenoantigen on Human ADMSCs lead to Them as Safer and More Useful Cell Sources for Realizing Various Stem Cell Therapies. *Tissue Eng Part A*. 査読有 16(4).2010. 1143-1155.

Okura H, Yamashita S, Tohru Ohama, Saga A, Kakuta-Yamamoto A, Hamada Y, Ohyama R, Sawa Y and Matsuyama A. HDL/apolipoprotein A-I binds to macrophage-derived progranulin and suppresses its conversion into proinflammatory granulins. 査読有 J Atheroscler Thromb. 17(6) 2010. 568-577

Okura H, Matsuyama A, Lee CM, Saga A, Kakuta-Yamamoto A, Nagao A, Sougawa N, Sekiya N, Takekita K, Shudo Y, Miyagawa S, Komoda H, Okano T, Sawa Y. Cardiomyoblast-like cells differentiated from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve left ventricular dysfunction and survival in a rat myocardial infarction model. Tissue Eng Part C Methods. 査読有 16(3) 2010. 417-425

Okura H, Saga A, Soeda M, Ichinose A, Matsuyama A. Adipose Tissue-Derived Multi-lineage Progenitor Cells as a Promising Tool for *In Situ* Stem Cell Therapy. Current Tissue Engineering, 査読有 In press Accepted date at 03 Jan. 2012.

Yuasa-Kawase M, Masuda D, Yamashita T, Kawase R, Nakaoka H, Inagaki M, Nakatani K, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Matsuyama A, Nishida M, Ishigami M, Kawamoto T, Komuro I, Yamashita S. Patients with CD36 Deficiency Are Associated with Enhanced Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. J Atheroscler Thromb. 査読有 19:2011. 263-275.

Masuda D, Sakai N, Sugimoto T, Kitazume-Taneike R, Yamashita T, Kawase R, Nakaoka H, Inagaki M, Nakatani K, Yuasa-Kawase M, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Nakagawa-Toyama Y, Nishida M, Ishigami M, Masuda Y, Matsuyama A, Komuro I, Yamashita S. Fasting Serum Apolipoprotein B-48 Can be a Marker of Postprandial Hyperlipidemia. J Atheroscler Thromb. 査読有 18: 2011: 1062-1070.

Sawa Y, Miyagawa S, Sakaguchi T, Fujita T, Matsuyama A, Saito A, Shimizu T, Okano T. Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in a patient with DCM: report of a case. Surg Today. 査読有 42: 2012. 181-184.

[学会発表] (計7件)

Okura H, Komoda H, Saga A, Yamamoto-Kakuta A, Fumimoto Y, LeeC-M, Ichinose A, Sawa Y and Matsuyama A.

Human Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells Express N-Glycolylneuraminic Acid Xenoantigen and Are Sensitive to Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity 第7回国際幹細胞学会 2009年7月8日~11日 スペインバルセロナ

Okura H, Matsuyama A, Lee CM, Saga A, Kakuta-Yamamoto A, Nagao A, Sougawa N, Sekiya N, Takekita K, Shudo Y, Miyagawa S, Komoda H, Okano T, Sawa Y. Human Cardiomyoblast-like cells (hCLCs) differentiated from adipose tissue-derived multilineage progenitor cells (hADMPCs) differentiated into cardiomyocyte in vivo and rescued chronic myocardial model rats from severe heart failure. 第7回国際幹細胞学会 2009年7月8日~11日 スペインバルセロナ

Okura H, Matsuyama A, Lee CM, Saga A, Kakuta-Yamamoto A, Nagao A, Sougawa N, Sekiya N, Takekita K, Shudo Y, Miyagawa S, Komoda H, Okano T, Sawa Y. Cell-patches composed with human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells and human umbilical cord vein endothelial cells improves left ventricular dysfunction in rat myocardial infarction through transdifferentiate into cardiomyocytes. 第7回国際幹細胞学会 2009年7月8日~11日 スペインバルセロナ

Matsuyama A. 「How to Translate Academic Seeds into Industries.」第4回PMDA 国際シンポジウム 2009年10月9日 東京

Okura H., Sawa Y and Matsuyama A. Cell-patches Composed with hADMPCs Derived Cardiomyoblasts (hCLCs) and Human Umbilical Cord Vein Endothelial Cells Improve Left Ventricular Dysfunction. 第9回日本再生医療学会総会 2010年3月18日 広島

松山晃文 幹細胞製剤の適応—Science・Translational R&D・Publicへの展開という観点から— 第14回日本適応医学会学術総会 2010年7月3日~4日 東京

Okura H, Saga A, Soeda M and Matsuyama A. Non-Clinical Studies (GLP) for Clinical Application of Cardiomyoblast-like cells differentiated from human Adipose

tissue-Derived Multilineage Progenitor Cells.
ISSCR 9th Annual Meeting. 2011. 14 June.
2011. カナダ トロント

〔図書〕(計3件)

松山晃文 「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に
関する指針」の解説. iPS 細胞の産業的応
用技術. 監修 山中伸弥. CMC 出版.
2009

松山晃文 「シームレス」な研究のために
医科学研究の自由と規制 上智大学出版
2011. 14

松山晃文 多能性幹細胞時代の個人情報保
護 医科学研究の自由と規制 上智大学出版
2011. 13

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 「心筋指向性細胞を含む細胞製剤」
発明者: 松山晃文・大倉華雪
権利者: 理化学研究所・大阪大学・(公財)
先端医療振興財団
種類: 特許出願
番号: 特願2012-100362
出願年月日: 2012年4月25日
国内外の別: 国内

○取得状況(計◇件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山晃文 (MATSUYAMA AKIFUMI)
(公財) 先端医療振興財団 再生医療研究
開発部門 部門長補佐 (兼) 再生医療開
発支援部 部長
研究者番号: 10423170

(2) 研究分担者

早川堯夫 (HAYAKAWA TAKAO)
近畿大学薬学総合研究所 所長

研究者番号: 50124392

李千萬 (Lee Chun-Man)

研究者番号: 10432543

菰田弘 (KOMODA HIROSHI)

研究者番号: 70432482

(3) 連携研究者

()

研究者番号: