

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592042

研究課題名(和文) 虚血性心筋症に対する末梢血単核球移植による治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the new therapy for ischemic cardiomyopathy

研究代表者

西田 誉浩(NISHIDA, TAKAHIRO)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50284500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では慢性虚血心への末梢血単核球移植の治療の確立を目指した。アフレーシスを用いての末梢血単核球の採取を試みるも、単核球成分を分離に難渋した。G-CSFを投与し血球成分を増加させたのちに末梢血より血球成分採取する方法を試み、単純な遠心分離により単核球成分を採取する方法で、より効率の良い採取する方法を検討した。

上記の方法にて採取した血球成分の効果を家兎の下肢虚血モデルを用いたパイロット実験で確認したが、十分な効果を得られなかった。慢性虚血の治療効果を得るためには、やはり単純な細胞成分のみの移植では不十分であり、血管新生因子を産生する細胞や血管新生に関与する細胞が必要ではないかと確認できた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to investigate the progress the new therapy against the ischemic cardiomyopathy, we tried to obtain the MNCs from the pig. However it was not possible due to failing the large amount MNCs, We tested the effect of small amount of MNCs to the ischemic limbs of rabbit. Unfortunately, This try was not effective to reduce the limb ischemia.

We recognized that some cells producing the vascular growth factor are mandatory to improve the perfusion of the ischemic organs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 心臓血管外科学

キーワード：末梢血単核球移植

1. 研究開始当初の背景

虚血性心筋症は、経皮的冠動脈形成術や冠動脈バイパス術が不可能なほど冠動脈病変が進行している場合が多く、その予後は極めて不良の疾患であり、心臓移植を必要とすることも多い疾患である。

近年、骨髄由来の単核球のなかに血管内皮前駆細胞と呼ばれる細胞が存在し、それらの細胞が血管形成を誘導することが確認され、血管内皮前駆細胞の局所注入による心臓や下肢などの重症虚血性病変に対する治療効果が報告されている (Lancet 2002;360:427-435)。我々も過去において、大型動物 (家畜ブタ) を用いて、アメリロイドコンストラクターを用いて作成した慢性虚血心への骨髄由来単核球の局所注入が、血管新生と心機能の改善を惹起することを発見した。また治療後一年を経過しても、腫瘍や不整脈の発症を認めず、その長期間の安全性についても確認している。しかしながら、大量の骨髄由来細胞を得るためには、全身麻酔による骨髄穿刺が必要となり、患者に対する侵襲が大きいという問題が残るので、実際の臨床研究では G-CSF を用い骨髄由来細胞を末梢血に動員したのちアフエレーシスにより骨髄由来単核球を採取し 2 名の患者に虚血心筋へ局所注入し一定の効果を認めた (未発表)。しかしながら、G-CSF による血小板増加などによる冠動脈閉塞が常に危惧される。実際 3 人目の患者で G-CSF の注入後、小さな急性心筋梗塞を発症した患者を認めたため、それ以降本研究は中止された。血管内皮前駆細胞である骨髄由来細胞の血管形成という概念が新規治療法の開発の端緒となったが、その後、単核球移植による血管新生効果は、必ずしも骨髄由来単核球を必要としないという仮説の検

証が行われている。すなわち、骨髄単核球移植による血管新生治療効果の本質は骨髄単核球そのものが血管へ分化するという機序に基づくものではなく、そのメカニズムの大部分は単核球から分泌される血管増殖因子によるものであるとの報告がなされている。さらに、重症下肢虚血に対する研究にて、骨髄由来細胞をほとんど有しない末梢血単核球移植による治療効果を検証するための臨床研究がおこなわれ、一定の効果を認めている (Atherosclerosis 2010;208(2):461-6)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記の背景を踏まえ、虚血性心筋症に対する新規治療法の開発を目指し、より侵襲が低く、安全性の高い骨髄由来細胞に依らない末梢血単核球移植の治療効果と安全性を、大型動物を用いた慢性虚血モデルにて検証し、臨床応用が可能か否かを明らかにすることである。また、本研究によって、予後が悪く治療法の選択肢が限られている虚血性心筋症のみならず他の臓器における虚血障害に対する新規治療としての末梢血単核球移植の安全性と実践性を確認できると考えられる。

3. 研究の方法

(概要)

当施設は 1980 年代より心機能、心保存、心筋保護、補助循環に関する種々の動物モデルを確立し、研究を継続的に進めてきた。当施設は人工呼吸器・循環動態モニター等を備えた実験室 (九州大学医学部アニマルセンター)、心室容量測定装置 (シグマ 5)、アナログデジタル変換装置、コンピュータ等のデータ解析システム等を有しており、動物実験の設備はほぼ完備している。病理組織標本・生化学的評価についても心臓血

管研究施設内にて遂行可能である。研究代表者(西田誉浩),研究分担者(田ノ上禎久,園田拓道)は心保存,心筋保護,慢性虚血の大型動物モデルに関する研究実績があり,その方法論については熟知し実践できる能力を備えている。また本研究に先駆けて行った骨髄細胞移植の実験は,良好な結果が得られている。

以上のような背景のもとに、以前に当研究施設にて行った慢性虚血心筋に対する骨髄細胞移植療法の治療効果の判定に用いた、家畜豚を用いたアメリロイドコンストラクターによる慢性虚血モデルを用い、より低侵襲である末梢血単核球移植療法の、急性期の治療効果を初年度に行う。引き続き翌年度には慢性期における治療効果の判定と安全性の確認を行う。

本研究の立案は、代表研究者の西田誉浩であり、その研究の進捗状況を把握し、研究の方向性を的確に指導する。大型動物に対する手術および心臓エコー検査や心臓カテーテル検査は、西田誉浩と園田拓道が主として行い、病理組織学的検討は田ノ上禎久が中心となっていく。Colored microsphere による局所心筋血流量得の測定は、園田拓道が中心となっていく。

(詳細)

【平成 23 年度】

平成 23 年度は、末梢血単核球細胞移植療法の慢性心筋虚血に対する急性期の治療効果及び安全性の判定を目指す。

1. 大型動物(家畜ブタ、ミニブタ; 20kg ~ 35kg) を用い、アメリロイドコンストラクターを用い冠動脈回旋枝を四週間で徐々に完全に閉塞させる。心臓カテーテル検査にて、回旋枝の完全閉塞を確認した後に予めアフエレ

ーシスにて採取していた末梢血単核球を回旋枝領域に 27G 針を用い心筋内注入を行う。心筋内注入後一カ月後に、治療効果の判定を行う。

2. 治療効果の判定は、

- A: 左室造影(左室駆出率、左室容量)と冠動脈造影(側副血行路)
- B: 心臓超音波検査;
- C: Colored microsphere; 局所心筋血流量
- D: 病理組織学的検査; 抗第 VIII 因子抗体を用いた免疫染色により毛細血管密度を測定する。骨形成や骨芽細胞の有無を確認する。

【平成 24 年度】

平成 24 年度は、末梢血単核球細胞移植療法の慢性心筋虚血に対する慢性期の治療効果及び安全性の判定を目指す。

1. 大型動物(家畜ブタ、ミニブタ; 20kg ~ 35kg) を用い、アメリロイドコンストラクターを用い冠動脈回旋枝を四週間で徐々に完全に閉塞させる。心臓カテーテル検査にて、回旋枝の完全閉塞を確認した後に予めアフエレシスにて採取していた末梢血単核球を回旋枝領域に 27G 針を用い心筋内注入を行う。23 年度は、22 年度と異なり心筋内注入後、六か月ないし一年の経過を観察し、治療の長期的な効果と安全性を確認する。

2. 治療効果の判定は、

- A: 左室造影(左室駆出率、左室容量)と冠動脈造影(側副血行路)

B：心臓超音波検査；

C：Colored microsphere；局
所心筋血流量

にて行い。

3．安全性の確認は、

D：病理学的検討にて、悪性腫瘍骨形成や骨芽細胞などの出現の有無を検討する。

4．研究成果

本研究の目的は、虚血性心筋症に対する新規治療法として、骨髓由来細胞に依らない末梢血単核球による血管新生療法の開発を目指したものであった。

当研究室では、これまでに大型動物(家畜ブタ)を用いて、アメロイドコンストラクターによる慢性虚血心モデルを作成し、慢性虚血心筋への骨髓由来単核球の局所注入が、血管新生と心機能の改善に寄与する可能性を見出した。さらに治療後1年を経過しても腫瘍や不整脈の発生を認めず、長期での安全性を確認した。このモデルを用い、骨髓由来細胞に依らない末梢血単核球を用いて、骨髓由来単核球移植と同等の効果を得ることを目指し、実験を進めた。

本研究では慢性虚血心への末梢血単核球移植の急性期における治療効果及びその安全性の判定を目指した。アフエーシスを用いての末梢血単核球の採取を試みるも、十分な単核球成分を分離する方法の確立に難渋した。

そこで、アフエーシスに依らない末梢血単核球成分の採取方法の確立を目指したが、効率的な細胞成分の採取には至らなかった。G-CSFを投与し血球成分を増加させたのちに末梢血より血球成分採取する方法を試み、単純な遠心分離により単核球成分を採取する方法で、より効率の良い採取する方法を

検討した。

上記の方法にて採取した血球成分の効果判定をべく家兎の下肢虚血モデルを用いたパイロット実験を行った。日本白色家兎の左下肢を灌流する動脈(左総腸骨動脈から左総大腿動脈を抜去した左下肢虚血モデル)で確認したが、十分な効果を得られなかった。慢性虚血の治療効果を得るためには、やはり単純な細胞成分のみの移植では不十分であり、血管新生因子を産生する細胞や血管新生に關与する細胞が必要ではないかと確認できた。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0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
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

西田 誉浩(NISHIDA TAKAHIRO)
九州大学 大学病院 講師
研究者番号：50284500

(2)研究分担者

田ノ上 禎久 (TANOUE YOSHIHISA)

研究者番号：40372742

(3)研究分担者

園田 拓道 (SONODA HIROMICHI)

研究者番号：50596830

(4)研究分担者

大石 恭久 (OISHI YASUHISA)

研究者番号：20529870