

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659672
 研究課題名（和文） 脱細胞化したマトリックスへのヒト人工心筋細胞の再播種によるバイオ人工心臓の作成
 研究課題名（英文） Engineering a bioartificial heart by using extracellular matrix scaffold
 研究代表者
 佐野 俊二（SANO SHUNJI）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：50235438

研究成果の概要（和文）：

心臓移植の事業推進において臓器提供者不足が大きな問題であり、次世代の臓器移植医療法の開発が必要である。摘出心臓をランゲンドルフ灌流装置を用いて脱細胞化させることで立体的な足場を形成し、周期的な前後負荷及び電気刺激を与えつつ、ヒト心臓内細胞及び血管内皮細胞を灌流培養させることで、冠動脈血流を伴い、緻密に作業心筋細胞が生着することで、より高い機能性のある自家細胞由来の心臓としての器官形成に成功した。

研究成果の概要（英文）：

The shortage of donors for heart transplantation has become a critical issue to treat the patients with end-stage of cardiac failure. We have decellularized the rat whole heart by using pulsatile perfusion apparatus. Human cardiac progenitor cells were mixed with endothelial progenitor cells in culture and those were perfused to recellularize the acellular construct. Following 8 days in continuous perfusion, reseeded cells were engrafted onto the matrix to reconstruct the entire vascular beds and myocardium ex vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：細胞外マトリックス、心臓内幹細胞、灌流培養。

1. 研究開始当初の背景

組織工学的手法を駆使した器官レベルでの心臓の形成は、これまでに多くの解決しがたい問題点が存在していた。局所的細胞輪や細胞シート工学などの研究により、これらの人工物の移植によって、機能不全に陥った心機能が改善することが報告されている。しか

しながら、細胞シート工学の研究により、細胞間で有効な酸素交換を行いつつ、立体的な拍動性の心臓に密着させポンプ機能を補助するには、パッチの厚さに制限が生じ、約100ミクロンが限度といわれている。最近の報告では、これらの諸問題点を一気に解決できる革新的な技術として、脱細胞化した細胞外マ

トリックスで形成された足場に心血管細胞を再播種させ、実質細胞で再構築された人工心臓の作成が技術的に可能であることが示唆された(*Nat Med.*;14:213,2008)。

脱細胞化した心臓を足場として用いて、心血管前駆細胞を再播種させる方法は画期的であり、最近の動物実験の報告では、心臓の他に機能的な肺や肝臓の器官再構築にも成功してきている(*NatMed.*;16:927,2010; *Science.*;329:538,2010;*NatMed.*;16:814,2010)。

上記の手法を用いたバイオ人工心臓の作成過程には、①灌流再播種時におけるドナー細胞の喪失と②心血管細胞が未熟であるという問題点があり、再構築されたバイオ人工心臓の心機能は、成人心の約 2%、乳幼児心の約 25%しか機能していない。人工的に樹立した成熟心血管幹細胞を用いることで、心室筋細胞の緻密化を介してより機能性の高い心臓の器官構築が期待できる。

ヒト人工心筋細胞の樹立はいまだ報告がない。ヒト成熟心筋細胞用いたバイオ人工心臓の作成は、既報以上に機能的に向上した人工心臓を作成でき、臓器移植に代わる革新的な治療法となる。

2. 研究の目的

重症心不全に対する治療法として、機械的人工心臓の埋め込みや脳死心臓移植が目下のところ主流の先端医療であるが、前者は高額な医療費による経済・財政的負担、後者は生涯通じての免疫抑制剤の投与や様々な副作用による多臓器障害が報告されている。自家細胞用いたバイオ人工心臓の作成により、これらの問題点は着実に解決されると予想されるため、本研究目的は、

- (1) ヒト心臓内幹細胞用いた人工ヒト心筋細胞作成法の樹立。
- (2) ラット全心臓の脱細胞化による細胞

外マトリックスで形成された足場の作成。

- (3) 脱細胞化した心臓への人工ヒト心筋細胞及びヒト血管内皮細胞の再播種化。
- (4) 再構築した自家細胞由来バイオ人工心臓の機能解析及び移植検討。

3. 研究の方法

- (1) レンチウイルスシステム用いて、GATA4/Tbx5/Mef2C をヒト心臓内幹細胞に導入し人工ヒト心筋細胞を樹立する。分化した心筋細胞は alpha-MHC-eGFP ガイド下で純化精製する。
- (2) 麻酔下でラット心臓を摘出し、上行大動脈に灌流チューブを挿入、SDS ならびに 1%Triton-X をそれぞれ心腔内及び冠動脈内に 15 分ずつ循環灌流させ、全心臓の脱細胞化を行う。
- (3) 脱細胞化した心臓の右房、上行大動脈にカニューレ挿入後、Radnoti 社製のワーキングハートシステム用いて、37°C、酸素化した灌流液内に 5×10^7 個の心臓内幹細胞と同数の人工心筋細胞を注入し、細胞外マトリックスにヒト心血管細胞を再播種させる。
- (4) ミラーカテーテルを左房内通じて左室内に挿入し電気刺激を与え、左房・左室圧及び心電図を記録する。人工心臓はラットの腹部大動脈に他家移植し、術後組織と心機能を評価する。

4. 研究成果

- (1) ラット心臓の脱細胞化
- ① 12 週令の F344 Fisher ラットを麻酔し、全身ヘパリン化後、正中切開にて上、下大静脈、肺動静脈、胸部大動脈を剥離切断し、全心臓を摘出する。ランゲンドル

フ法によって、1.8mm のカニューレを上行大動脈通じて逆行性に心臓内に灌流させた。

- ② 心筋保護目的で 10 μ M アデノシン入り PBS を冠動脈内に平均 80mmHg で 15 分間灌流させ、引き続き 1%SDS そして 1%Triton-X をそれぞれ 15 分間持続灌流させる。最終工程として、抗生剤入りの PBS でその後 120 時間灌流させた。
- (2) 人工ヒト心筋細胞の細胞外マトリックスへの再播種化
- ① 脱細胞化した心臓は左房及び上行大動脈に 18 ゲージのカニューレを挿入し心尖部まで電気刺激リードを入れる。37°C、5%CO₂ で酸素化された細胞培地を心房内流量 20mL/min、冠動脈流量 6mL/min で 24 時間心臓内に栄養を入れる。前・後負荷は圧センサー介してそれぞれ 1-12mmHg と 1-60mmHg に制御し、ペーシングリード用いて 1Hz、5-20V、2ms で周期的に心外膜側より刺激した。
 - ② 細胞は 5x10⁷ 個の精製したヒト人工心筋細胞と 5x10⁷ 個のヒト心臓内幹細胞を 200 μ L の PBS に希釈し、27 ゲージの針使用し 5 回に分けて左心室内に注入する。回路内を密閉後、約 8 から 10 日間持続灌流させることで三次元培養を行った。これまでの研究実施期間中において、遺伝子組み換えをしていないヒト心臓内幹細胞を中心とした再播種灌流実験を主体に研究を進め、有効なヒト幹細胞の脱細胞化した細胞外マトリックスへの再播種に成功した。今後、GATA4/Tbx5/Mef2c を遺伝子導入した人工成熟心筋細胞を大量に培養し、より作業能が高い左室心筋の三次元レベルでの再構築を目指していく。

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 13 件)

1. Itoh H, Sano S, Pouard P. Pediatric perfusion in Japan: 2010 practice survey. *Perfusion*27(1):72-77, 2012. 査読あり
2. Fujii Y, Ishino K, Tomii T, Kanamitsu H, Fujita Y, Mitsui H, Sano S. Atrionatriuretic Peptide improves left ventricular function after myocardial global ischemia-reperfusion in hypoxic hearts. *Artificial Organs*36(4):379-386, 2012. 査読あり
3. Taniguchi M, Akagi T, Kijima Y, Ito H, Sano S. Transcatheter Closure of a Large Atrial Septal Defect under Microprobe Transesophageal Echocardiographic Guidance. *Echocardiography*29(4):E94-96, 2012. 査読あり
4. Nakagawa K, Akagi T, Taniguchi M, Kijima Y, Goto K, Kusano KF, Itoh H, Sano S. Transcatheter closure of atrial septal defect in a geriatric population. *Catheterization and Cardiovascular Interventions* 80(1):84-90, 2012. 査読あり
5. Itoh H, Ichiba S, Ujike Y, Kasahara S, Arai S, Sano S. Extracorporeal membrane oxygenation following pediatric cardiac surgery: development and outcomes from a single-center experience. *Perfusion*27(3):225-229, 2012. 査読あり
6. Watanabe N, Taniguchi M, Akagi T,

- Tanabe Y, Toh N, Kusano K, Ito H, Koide N, Sano S. Usefulness of the right parasternal approach to evaluate the morphology of atrial septal defect for transcatheter closure using two-dimensional and three-dimensional transthoracic echocardiography. *Journal of the American Society of Echocardiography*25(4):376-382, 2012. 査読あり
7. Sano S, Fujii Y, Arai S, Kasahara S, Tateishi A. Atrioventricular valve repair for patient with heterotaxy syndrome and a functional single ventricle. *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery, Pediatric cardiac surgery annual* 15(1):88-95, 2012. 査読あり
 8. Sano S. Editorial Comment: Does the shunt type determine midterm outcomes after a Norwood operation? *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 42(2):216-217, 2012. 査読あり
 9. Fujii Y, Sano S, Asou T, Imoto Y, Oshima Y, Kawasaki S, Kishimoto H, Sakamoto K, Maeda M, Yamagishi M, Matsuo K. Outcomes of one-lung fontan operation: a retrospective multicenter study in Japan. *Annals of Thoracic Surgery*94(4):1275-1280, 2012. 査読あり
 10. Sano S. Japanese congenital heart surgery is almost the same level of Europe and North America. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*113(3):288-291, 2012. 査読なし
 11. Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Sata Y, Mizuno M, Kamiya A, Shishido T, Inagaki M, Shirai M, Sano S, Sugimachi M. Medetomidine, an α 2-adrenergic agonist, activates cardiac vagal nerve through modulation of baroreflex control. *Circulation Journal*76(1):152-159, 2012. 査読あり
 12. Fujii Y, Kasahara S, Kotani Y, Takagaki M, Arai S, Otsuki S, Sano S. Double-barrel Damus-Kaye-Stansel operation is better than end-to-side Damus-Kaye-Stansel operation for preserving the pulmonary valve function: the importance of preserving the shape of the pulmonary sinus. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011 Jan;141(1):193-9. 査読あり
 13. Shimizu S, Une D, Shishido T, Kamiya A, Kawada T, Sano S, Sugimachi M. Norwood procedure with non-valved right ventricle to pulmonary artery shunt improves ventricular energetics despite the presence of diastolic regurgitation: a theoretical analysis. *J Physiol Sci.* 2011 Aug 10 査読あり
- [学会発表] (計 11 件)
1. Sano S. Sano Operation. The 9th International Congress of Update in Cardiology and Cardiovascular Surgery.2013.3.21、アンタリア、トルコ
 2. Sano S. My concept in postoperative care for pediatric cardiac surgical patient: Milrinone as a sole cardiac drug. The Society of Thoracic

- Surgeons of Thailand 27th Annual Meeting. 2013.1.11、バンコク、タイ
3. Sano S. Recent development of neonatal heart surgery. The 4th National Congress of Cardiovascular and Thoracic Surgery.2012.11.22、ハノイ、ベトナム
 4. Sano S. Management of atrioventricular valve regurgitation in single ventricle repair. 22nd Annual Congress of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of ASIA. 2012.11.15、コタキナバル、タイ
 5. Sano S. Repair of ebstein's anomaly in neonates and small infants: impact of right ventricle exclusion. 26th EACTS Annual Meeting.2012.10.27、バルセロナ、スペイン
 6. Sano S. Hypoplastic Left Heart Syndrome: from stem cell therapy to new clinical pathways. Seminar at Wisconsin Pediatric Hospital. 2012.10.4、ミルウォーキー、米国
 7. Sano S. Hypoplastic Left Heart Syndrome: from stem cell therapy to new clinical pathways. Grand Rounds UW Pediatric Cardiac Surgery. 2012.10.1、ウイスコンシン、米国
 8. Sano S. Surgical treatment of congenital mitral valve disease. 2012 AATS MITRAL CONCLALVE WORK SHOP. 2012.9.15、軽井沢
 9. Sano S. Hybrid procedure in congenital heart disease. China Heart Congress 2012.8.9、北京、中国
 10. Sano S. Imagination and innovation cross the ocean -from Sano Operation

to stem cell therapy. The 22nd Annual Robert E. Gross Memorial Lecture. 2012.6.6、ボストン、米国

11. Sano S. RV-PA shunt as a first stage palliation for hypoplastic left heart syndrome -Recent Evolution-. The 4th Congress of Asia-Pacific Pediatric Cardiac Society.2012.4.4、台北、台湾

[図書] (計 5 件)

1. 佐野俊二、笠原真悟、新井禎彦、岩崎達雄、森田 潔、伊藤英史 心臓手術の実際 第22回 大動脈縮窄症・大動脈弓離断症に対する手術と体外循環法—
Clinical Engineering23(2):151-159, 2012.
2. 佐野俊二 日本の心臓・大血管外科レベルは欧米を超えているか? 5. 先天性心疾患 日本外科学会雑誌 113(3):288-291,2012
3. 佐野俊二、笠原真悟、藤井泰宏 第9章 先天性心疾患の最新治療 3. Ebstein 奇形の外科治療 先端医療シリーズ 43 循環器疾患の最新医療 pp137-139, 2012
4. 佐野俊二 世界における循環器専門医 オーストラリアの循環器医の現状 循環器専門医 20(1):162-166, 2012.
5. 佐野俊二 IV. 成人期の先天性心疾患の治療 2.手術 (2) 再手術の時期と問題点 新・心臓病診療プラクティス 18 大人になった先天性心疾患, 2012

[その他]

ホームページ等

<http://okayama-u-cvs.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐野 俊二 (SANO SHUNJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50235438

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

王 英正

岡山大学・岡山大学病院・教授

研究者番号：50372579