

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790971

研究課題名 (和文) 自己修復機転を賦活化する心筋再生デバイスの開発

研究課題名 (英文) Development of novel scaffold for cardiac regeneration.

研究代表者

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

研究成果の概要：

根本的治療として期待される再生医療を汎用性の高い治療法として日常治療の中に普及させるために、幹細胞分化因子を制御することで自己のもつ修復機転を賦活化し、内在性の自己心筋幹細胞などの増殖と、心筋細胞への分化を促進して、心機能を改善する新規な心筋再生用デバイスを開発することを目的とした。本研究開発の成果で、新規に開発した血管新生誘導担体と心機能改善効果を有する因子を組み合わせることにより、新たな心筋再生用デバイス開発の可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

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：再生治療 心筋再生因子 組織修復材料

1. 研究開始当初の背景

循環器領域において、高齢化、虚血性心疾患の増加にともない、今後、心不全患者数の増大及びそれに伴う治療費の増加が予想され、既に高額化した医療費の高騰にさらに拍車をかけるものと思われる。重症心不全に対する現在の最終的な治療法は、補助人工心臓や、心臓移植などの置換型治療であり、これまでその有用性が報告されてきたが、現段階では前者はその耐久性や

合併症など、後者はドナーの確保や免疫抑制剤の使用等に問題があり、普遍的な治療とは言い難いのが現状である。最近、このような重症心不全に対し、これまでの置換型治療から、遺伝子工学や細胞組織工学、再生医療等を駆使した再生型治療が新しい治療法として注目されている。

近年、重症心不全患者に対する心機能回復戦略として、細胞移植法が有用であることが報告されており、すでに自己骨格筋芽細胞による臨床応用が欧米で開始されてい

る (Hagege AA, et al. Circulation 114:1108-113, 2006)。我々も、自己骨格筋芽細胞と骨髄単核球細胞移植を併用すると、単独より心機能改善効果が高いことを証明し (Memon IA, et al. J Thorac Cardiovasc Surg 130(3):646-653, 2005)、大阪大学医学部付属病院未来医療センターにおいて臨床研究をすすめている。さらに、自己筋芽細胞を細胞シート工学の手法により組織化し、これを虚血性心筋症モデル動物や拡張型心筋症モデル動物に移植することにより著明な組織の改善と心機能の向上が起ることを示した (Miyagawa S, et al. Transplantation 80:1586-1595, 2005, Memon IA, et al. J Thorac Cardiovasc Surg 130:1333-1341, 2005, Kondoh H, et al. Cardiovasc Res 69(2):466-475, 2006)。しかし、この手法では、細胞シートグラフトを作製するために自己筋芽細胞を長期間培養する必要があり、緊急性の高い治療を必要とする重症患者への対処が困難である。

一方、最近の組織幹細胞研究の進歩により、心臓においても、細胞分裂し心筋細胞に分化しうる心筋幹細胞の存在が発見された (Beltrami AP, et al. Cell 19:763-776, 2003, Oh H, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 100:12313-12318, 2003, Laugwitz KL, et al. Nature 433(7026):647-653, 2005)。よって、従来では胚性幹細胞や骨髄間葉系幹細胞といった多分化能をもった細胞からしか再生しえないと考えられていた心筋細胞が、自己心筋組織に存在する心筋幹細胞によって再生しうる可能性が示唆された。

また、近年のナノバイオテクノロジーの発展により、材料の表面の微細構造や、幹細胞の分化誘導を制御するケモカインやそのレセプター、その他分化誘導因子などを、ナノレベルで制御することにより機能性材料を構築し、それによって幹細胞の分化や機能を自在に操作する技術 (セルマニピュレーション) が可能になり、革新的材料開発も新しい段階を迎えたと言える。

これまでにも、コラーゲンなどの生体吸収性材料からなる3次元の担体に細胞を播種し心筋組織を再生させる研究は報告されている (Li RK, et al. Circulation 100:II63-69, 1999)。しかし、心筋幹細胞を病巣に誘導し、かつ増殖、分化を制御して材料自身の機能によって心筋を再生するようなデバイスは現在のところ存在しない。

我々が、現在進めている細胞移植による心筋再生治療において、心機能改善のメカニズムに様々な分化増殖因子が関連していることが明らかとなった。これら因子の

最適な組み合わせや作用時期を、さらに詳細に検討していくことで、自己の修復機能を賦活化し心筋再生へと導くような制御因子の最適な条件が明らかになると考えられる。

本研究では、分化増殖因子の最適な組み合わせと作用時期について検討し、心機能改善効果の高い条件を見出し、自己修復機能を賦活化する心筋再生デバイスの実現に向けた最も重要となる部分を明らかにしていく。

2. 研究の目的

根本的治療として期待される再生医療を汎用性の高い治療法として日常治療の中に普及させるために、再生医療の新手法の提案を行う。具体的には、幹細胞分化因子を制御することで自己のもつ修復機能を賦活化し、内在性の自己心筋幹細胞などの増殖と、心筋細胞への分化を促進して、心機能を改善する新規な心筋再生用デバイスを開発し、重症心不全に対する新たな治療法を確立することである。

3. 研究の方法

(1) 心筋幹細胞の分化・誘導因子の探索
心筋幹細胞の障害部位への遊走及び動員促進因子を探索する。現在、我々が行っている、心筋梗塞部位への筋芽細胞シート移植によって心機能の回復が認められた心筋組織について、遺伝子発現パターンを遺伝子チップにより解析する。

(2) 分化・誘導因子の *in vitro* における効果の検討

種々の細胞増殖因子及び液性因子を候補として、培養心筋幹細胞などに作用させ、心筋細胞への影響について検討した。

(3) 分化・誘導因子などの材料への導入法の検討

同定した心筋細胞への分化誘導因子等を、障害部位で効果的に機能発現させるための新規材料の設計と合成をおこなった。さらに、これら因子の材料への導入する方法を検討した。

(4) 下肢虚血部、梗塞心への移植、機能評価・組織評価

上述の因子をラット下肢虚血、心筋梗塞モデルに埋入する。移植後4週、8週後の

組織評価 (HE 染色、Connexin34 免疫染色、FactorVIII 免疫染色、Sarcomeric actin 免疫染色等)、及びレーザードップラー、心臓超音波検査にて、機能評価を行った。

(5) in vivo における再細胞化のメカニズム、集積する細胞の検討

ラット背部に移植し、移植後 1、2、3 ヶ月において、HE 染色、マッソン トリクローム染色、desmin、actin、Troponin T の各種免疫染色により移植部位に存在する細胞のキャラクタライズを行った。また、この組織を Real time PCR にて筋細胞特有の転写因子、構造蛋白の発現を経時的に解析した。

4. 研究成果

終末糖化産物 (Advanced glycation end products ; AGEs) は、タンパク質と糖類が非酵素的に反応したもので、生体内においては高血糖状態の血液中などで産生される。近年、AGEs が血管内皮細胞の VEGF 産生を促進し、in vivo において血管新生を誘導することが報告されている。本研究では、AGEs を心筋再生医療用マトリックスとして応用すべく、糖化架橋したアルブミンの血管新生誘導効果について、ラット下肢虚血モデルおよび心筋梗塞モデルで検討を行った。

EDC を用いて架橋したウシ血清アルブミンに、リボースを添加し、37°C 3 日間保持することで非酵素的に糖化反応を行った。未反応物を透析で除去し、動物実験に使用した。リボースを添加せず 37°C 3 日間保持した架橋アルブミンを比較対象とした。

これらマトリックスをラット背部皮下に移植後の組織学的検討を行った結果、炎症反応を誘起せず組織化することが示された。さらに糖化架橋アルブミンについては、マトリックス内への血管誘導が多く認められた。

ラット下肢虚血モデルは左総腸骨動脈を結紮し作製した。下肢血流量と組織学的評価により血管新生効果を検討した。さらに、ラット心筋梗塞モデルは左前下行枝を結紮し作製した。組織学的評価と超音波測定により心機能を評価した。糖化架橋アルブミンについて、虚血部位への血管新生効果について、詳細に検討を行った。糖化架橋アルブミンは、ラット下肢虚血部において、優位に血流の改善が認められ、組織学的検討により、リボース化架橋アルブミンを移植した虚血部位では、担体が分解されることにおける炎症作用によって毛細血管の新生が促進されることがわかった。さら

に、ラット心筋梗塞部位への移植においても心機能の改善と左室の拡大を抑制することが、確認できた。以上の結果から、リボース化架橋アルブミンは再生医療用血管新生材料として有用であることが示唆された。

さらに、心臓の自己修復能を賦活化する因子として、心機能が改善される過程で発現が亢進される因子について、遺伝子解析結果から選び出しを行い、単独の移植で心機能改善効果を示すことがわかった。これら因子と糖化架橋アルブミンは混合することで徐放化できることが可能となった。

以上の結果より、新規に開発した血管新生誘導担体と心機能改善効果を有する因子を組み合わせることにより、新たな心筋再生用デバイスの開発性が示唆された。

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 2 件)

(1) 齋藤 充弘、澤 芳樹、重症心不全に対する再生治療の現状、治療、89(12) 3311-3316、2007、南山堂 査読無し

(2) 澤 芳樹、齋藤 充弘、心疾患の現状と研究の将来、生産と技術、59(4) 78-81、2007、生産技術振興協会 査読無し

[学会発表] (計 2 件)

(1) 齋藤 充弘、清水 達也、岡野 光夫、澤 芳樹「心筋再生医療の現状と展望」第 5 回ナノバイオ国際シンポジウム 2009 年 2 月 19 日 東京

(2) 齋藤 充弘、清水 達也、岡野 光夫、澤 芳樹「重症心不全に対する自己細胞治療の現状と展望」第 56 回日本心臓病学会学術集会 2008 年 9 月 10 日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

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

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

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

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

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

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

宮川 繁 (MIYAGAWA SHIGERU)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教

三木 健嗣 (MIKI KENJI)
大阪大学・大学院医学系研究科・大学院生