

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 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390266

研究課題名（和文） 人工心臓及び再生医療を用いた重症心不全に対する集学的治療法の確立

研究課題名（英文） The development of novel therapy combined LVAD and regenerative medicine for severe heart failure patients

研究代表者

宮川 繁 (MIYAGAWA SHIGERU)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：70544237

研究成果の概要（和文）：

本科研において、補助人工心臓を装着した患者の左室補助人工装着時、および心臓移植になった心臓の組織解析を行った。特に、当研究室では、左室補助人工心臓を装着した拡張型心筋症患者に対する筋芽細胞シート移植の臨床研究を行っている。これまで左室補助人工心臓を装着した患者4例と、左室補助人工心臓を装着していない拡張型心筋症7例、虚血性心筋症8例に筋芽細胞シート移植を行い、一部の患者において左室のreverse remodelling効果を認めた。

左室補助人工心臓を装着した拡張型心筋症4例に筋芽細胞シートを移植したが、そのうち3例が左室補助人工心臓より離脱した。うち1例は、心不全が悪化し、再度植え込み型人工心臓を装着した。筋芽細胞シートを移植したにもかかわらず、心機能が向上しなかった1例は、昨年度末心臓移植が行われ、その心臓サンプルの解析を行い、血管密度の増加、心筋構造蛋白の発現増強を認めるものの、移植細胞は認めなかった。

定常流人工心臓と拍動型人工心臓を装着した患者の組織サンプルにて、定常流人工心臓装着患者においては、微小血管における平滑筋中膜の肥厚化が認められ、機能改善度合いの低下及び心筋組織血流の低下が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this project we evaluated histologies of heart tissue at LVAD implantation and heart transplantation. We performed myoblast sheet implantation to cardiomyopathy patients as clinical trial. We implanted myoblast sheet to 4 dilated cardiomyopathy (DCM) patients who received LVAD, 7 DCM patients without LVAD, and 8 ICM patients without LVAD. 2 of 4 DCM patients who received LVAD showed bridge to recovery from LVAD. In one DCM patient who could not show functional recovery after myoblast sheet implantation, we could not detect implanted myoblasts in heart sample obtained at heart transplantation in spite of histological angiogenesis and enhanced expression of cytoskeletal proteins in myocytes.

We could detect hypertrophy in smooth muscle layer in microvasculature in continuous flow LVAD compared with pulsatile flow LVAD, suggesting that poor functional recovery after LVAD implantation because of decrease of blood perfusion in continuous flow LVAD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2011年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2012年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

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

キーワード：人工心臓 再生医療 心不全 幹細胞 左室形成デバイス 心不全薬

1. 研究開始当初の背景

重症心不全に対する現行の治療として、心臓移植、人工心臓をあげることができるが、心臓移植においては、ドナー不足が大きな問題であり、人工心臓においては感染、血栓等の合併症を避けることができず、これらの治療法は普遍的な治療とは言い難い。人工心臓装着後、心機能が回復し、左室補助人工心臓より離脱できる症例が散見されるが、残念ながら、これらの症例はごく一部にすぎない。何らかの方法を用いて人工心臓よりの離脱率を向上させることは、極めて少ない心臓移植や、合併症の多い人工心臓のデメリットを補うことができ、重症心不全における革新的な治療法になりうると思われる。

2. 研究の目的

本研究において、人工心臓の持つ心再生効果のメカニズムを解明しつつ、人工心臓の持つ心再生効果を向上させるような、最適な再生型治療のコンビネーション治療を考案することである。

3. 研究の方法

1. LVAD による心筋再生効果のメカニズムの解明

LVAD による心筋再生効果のメカニズムは極めて複雑であると考えられる。これまでの報告では、LVAD 装着により、左室の線維化が

抑制され、この線維化の抑制が LVAD による” Bridge to Recovery” の一つのインデューサーであると考えられる。本研究では LVAD 装着により線維化が抑制されるメカニズムを解析する。

また、近年では、LVAD に限らず心筋再生の一つのメカニズムとして、心筋細胞に分化しうる幹細胞が、障害されている心筋組織に集積し、集積した細胞が、心筋細胞に分化したり、または、心筋再生を促すサイトカインを放出することにより、荒廃した心筋組織が治癒しうるということが報告されている。これらのバックグラウンドをもとに、LVAD を装着することにより幹細胞の集積が促進されているか、そして、心筋再生因子の発現増幅が起こっているか検討する。

これらの解析は、LVAD 装着の際採取された心筋組織と、LVAD にて” Bridge to Transplantation” された心筋組織を比較検討することとする。

1-a. 線維化抑制のメカニズムの解明

心筋組織の collagen content を ELISA 法にて定量化する。また、collagen 量の定量化だけではなく、LVAD 装着により collagen の type の変化を検討する。心筋の線維化をコントロールする因子として、TGF- β , Matrix metalloproteinase (MMP), tissue inhibitor

of matrix metalloproteinases (TIMPs)、Smad、RECK 等が知られているが、これらの線維化をコントロールする molecule が LVAD 装着による線維化抑制にどのように寄与しているか検討する。これらの因子の検討には、RT-PCR、Western、免疫組織学的検討にて解析を行う。

1-b. 心筋幹細胞、血管幹細胞の解析

これまで、心筋幹細胞として機能しうる細胞は、c-kit、sca-1 等の細胞が知られており、これらの細胞は特に心房組織に多いことが知られている。これらの細胞は、心筋が障害されたとき、心房や心室より心筋障害部位に集積し、不全心の再生に寄与しているものと考えられている。また、荒廃した心筋組織の再生には心筋細胞だけではなく、血管の造成も寄与しているものと思われる。心筋サンプルより心筋幹細胞、血管新生にかかわる幹細胞を解析する。

1-c. 心筋幹細胞の集積の解析

心筋組織より細胞を単離し、単離された細胞を FACS 解析し、c-kit、sca-1 陽性細胞の数を検討し、LVAD 装着前後で比較する。また、c-kit、sca-1 陽性細胞の免疫染色を行い、その局在性を検討する。単離された c-kit 陽性細胞、sca-1 陽性細胞を心筋細胞への分化誘導をかけ、心筋細胞へ分化誘導可能か検討する。

1-d. 血管形成に関与する細胞の解析

心筋組織より細胞を単離し、単離された細胞を FACS 解析し、CD43 陽性細胞の数を検討し、LVAD 装着前後で比較する。また、CD43 陽性細胞の免疫染色を行い、その局在性を検討する。ほか、血管新生にかかわりうる細胞の解析も行う。

1-e. 心筋再生因子の解析

既知の心筋再生因子である HGF、VEGF、IGF-1、Thymosin b4 等のサイトカインの産生を RT-PCR、ELISA 法にて発現を検討する。ま

た、affymetrix にて、遺伝子発現の違いを LVAD 前後で解析し、特に心発生で増幅しうる因子にターゲットを絞って解析する。Affymetrix にて差がありそうな因子が特定できれば、RT-PCR にてその発現を定量化する。

1-f. 各種 LVAD 間の心筋再生効果の比較

現在、当病院では、体外型 TOYOBO LVAD や 植え込み型 Jarvik 2000、Novacor、HeartMate、Dura、Eva heart 等の各種 LVAD を装着しており、植え込んだ患者より得られたサンプルは豊富である。各種 LVAD において、心筋幹細胞の集積、血管新生にかかわる幹細胞の集積、及び心筋再生因子の発現を RT-PCR、western 法にて比較することにより、どの LVAD が心筋再生効果が高いかを検討する。また、連続流 LVAD による定常流循環が心筋内微小循環および、心筋の reverse remodeling に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 人工心臓を装着した拡張型心筋症患者に対する筋芽細胞シート移植

本科研において、補助人工心臓を装着した患者の左室補助人工装着時、および心臓移植になった心臓の組織解析を行った。特に、当研究室では、左室補助人工心臓を装着した拡張型心筋症患者に対する筋芽細胞シート移植の臨床研究を行っている。これまで左室補助人工心臓を装着した患者4例と、左室補助人工心臓を装着していない拡張型心筋症10例、虚血性心筋症7例に筋芽細胞シート移植を行った。

左室補助人工心臓を装着した拡張型心筋症4例に筋芽細胞シートを移植したが、そのうち3例が左室補助人工心臓より離脱した。うち1例は、心不全が悪化し、再度植え込み型人工心臓を装着した。筋芽細胞シートを移植したにもかかわらず、心機能が向上しなかった1例は、昨年度末心臓移植が行われ、その心臓サンプルの解析を行った。

人工心臓装着時の組織サンプルと比較したところ、CD31組織染色では、筋芽細胞シート移植後は比較的血管径の太い血管が多数増勢しており、血管密度も移植前と比較して増加していた。また、Cardiac myosin heavy chain を染色したところ、人工心臓装着時のサンプルにおいては、心筋細胞質内の発現は乏しかったが、筋芽細胞シート移植後は同心筋骨格蛋白の発現増強を認めた。人工心臓より離脱した患者の人工心臓離脱時の組織サンプルも入手しており、細胞シート移植前と後の組織学的変化を検討中である。

(2) 定常流人工心臓と拍動型人工心臓における微小血管構造の差異の検討

末期心不全患者において、左室補助人工心臓 (LVAD) による左室圧・容積負荷の軽減が、左心機能の改善につながる (reverse remodeling) と言われている。近年連続流型 LVAD の使用頻度が高まっているが、連続流補助循環における脈圧の減少が心筋の微小循環に及ぼす影響については分かっていない。LVAD 植込みを行った末期心不全患者 24 人を対象とした。拍動型 LVAD を 11 人 (P 群)、連続流型 LVAD を 13 人 (C 群) に装着した。LVAD による補助期間は P 群:954 日、C 群:709 日であった。術後心超音波検査にて心機能の推移を 2 群間で比較検討した。また VAD 植込み時、心臓移植時に採取した心筋組織を 2 群間で比較検討した。

心臓超音波検査にて LVAD 装着前後での左室収縮末期径 (LVES) は P 群で $63 \pm 2\text{mm}$ から $46 \pm 9\text{mm}$ 、C 群で $65 \pm 2\text{mm}$ から $59 \pm 3\text{mm}$ と P 群で有意に縮小傾向を認めた ($P=0.008$)。また左室収縮率 (LVEF) は P 群で $15 \pm 8\%$ から $34 \pm 4\%$ 、C 群で $17 \pm 2\%$ から $22 \pm 4\%$ と P 群で有意に改善傾向を認めた ($P=0.05$)。組織学的検査では、両群において、LVAD 前後で心筋細胞径の減少、および心筋間の微小血管密度の上昇を認め

たが、両群間に有意差は認めなかった。さらに α SMA 染色による微小血管の平滑筋層の厚さを比較すると、C 群では平滑筋層の厚さが $9 \pm 0.4 \cdot \mu\text{m}$ から $14 \pm 0.6 \cdot \mu\text{m}$ と増加を認めたが ($P=0.0002$)、P 群では $10 \pm 1.7 \cdot \mu\text{m}$ から $12 \pm 0.7 \cdot \mu\text{m}$ と増加を認めなかった ($P=0.28$)。上記結果より、連続流型 LVAD では心筋内微小血管の平滑筋層の肥厚を認め、左室収縮能の改善が拍動型 LVAD に比して少なかったことが判明した。脈圧の減少による微小血管平滑筋層の変化が LVAD による reverse remodeling に影響を及ぼす可能性が示唆された。

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 16 件)

- ① Uchinaka A, Kawaguchi N, Hamada Y, Mori S, Miyagawa S, Saito A, Sawa Y, Matsuura N. Transplantation of myoblast sheets that secrete the novel peptide SVVYGLR improves cardiac function in failing hearts. Cardiovasc Res. 2013 Apr 23. 1-38 <http://cardiovascres.oxfordjournals.org> 査読有
- ② Sakaguchi T, Matsumiya G, Yoshioka D, Miyagawa S, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Saito S, Ueno T, Sawa Y. DuraHeart™ Magnetically Levitated Left Ventricular Assist Device. Circ J. 2013 Apr 18. [Epub ahead of print] <http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-12-1410> 査読有
- ③ Kamata S, Miyagawa S, Fukushima S, Nakatani S, Kawamoto A, Saito A, Harada A, Shimizu T, Daimon T, Okano T, Asahara T, Sawa Y. Improvement of Cardiac Stem Cell-Sheet Therapy for Chronic Ischemic Injury by Adding Endothelial Progenitor Cell Transplantation: Analysis of Layer-Specific Regional Cardiac Function. Cell Transplant. 2013 Apr 3. <http://dx.doi.org/10.3727/096368913X665602> 査読有

- ④ Yoshioka D, Toda K, Sakaguchi T, Miyagawa S, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Saito S, Saito T, Shibasaki I, Sakata Y, Ohtani T, Sawa Y. Initial report of bridge to recovery in a patient with DuraHeart LVAD. *J Artif Organs*. 2013 Mar 20;1-3 DOI:10.1007/s10047-013-0704-6 査読有
- ⑤ Sawa Y, Miyagawa S. Cell sheet technology for heart failure. *Curr Pharm Biotechnol*. 2013 Jan;14(1):61-6. <http://dx.doi.org/10.2174/1389201011314010009> 査読有
- ⑥ Shudo Y, Miyagawa S, Nakatani S, Fukushima S, Sakaguchi T, Saito A, Asanuma T, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Myocardial layer-specific effect of myoblast cell-sheet implantation evaluated by tissue strain imaging. *Circ J*. 2013;77(4):1063-72. Epub 2012 Dec 29. <http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-12-0615> 査読有
- ⑦ Saito S, Sakaguchi T, Miyagawa S, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Yoshioka D, Ueno T, Kuratani T, Sawa Y. Jarvik 2000 biventricular assist device conversion from old pin-shaped bearing pumps to new conical bearing pumps. *J Artif Organs*. 2013 Mar;16(1):105-9. doi:10.1007/s10047-012-0669-x. Epub 2012 Oct 26. 査読有
- ⑧ Saito S, Sakaguchi T, Miyagawa S, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Daimon T, Sawa Y. Recovery of right heart function with temporary right ventricular assist using a centrifugal pump in patients with severe biventricular failure. *J Heart Lung Transplant*. 2012 Aug;31(8):858-64. doi:10.1016/j.healun.2012.03.002. Epub 2012 May 査読有
- ⑨ Saito S, Miyagawa S, Sakaguchi T, Imanishi Y, Iseoka H, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Saito A, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Myoblast sheet can prevent the impairment of cardiac diastolic function and late remodeling after left ventricular restoration in ischemic cardiomyopathy. *Transplantation*. 2012 Jun 15;93(11):1108-15. doi:10.1097/TP.0b013e31824fd803 査読有
- ⑩ 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*. 2012 Jan;42(2):181-4. doi:10.1007/s00595-011-0106-4. Epub 2011 Dec 27. 査読有
- ⑪ Shudo Y, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Kawaguchi N, Matsuura N, Sawa Y. Establishing new porcine ischemic cardiomyopathy model by transcatheter ischemia-reperfusion of the entire left coronary artery system for preclinical experimental studies. *Transplantation*. 2011 Oct 15;92(7):e34-5. DOI:10.1097/TP.0b013e31822d875c 査読有
- ⑫ Shudo Y, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Novel regenerative therapy using cell-sheet covered with omentum flap delivers a huge number of cells in a porcine myocardial infarction model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011 Nov;142(5):1188-96. doi:10.1016/j.jtcvs.2011.07.002. Epub 2011 Sep 14. 査読有
- ⑬ Fujita T, Sakaguchi T, Miyagawa S, Saito A, Sekiya N, Izutani H, Sawa Y. Clinical impact of combined transplantation of autologous skeletal myoblasts and bone marrow mononuclear cells in patients with severely deteriorated ischemic cardiomyopathy. *Surg Today*. 2011 Aug;41(8):1029-36. doi:10.1007/s00595-010-4526-3 査読有
- ⑭ Imanishi Y, Miyagawa S, Saito A, Kitagawa-Sakakida S, Sawa Y. Allogenic skeletal myoblast transplantation in acute myocardial infarction model rats. *Transplantation*. 2011 Feb 27;91(4):425-31.

doi: 10.1097/TP.0b013e3182052bca.
査読有

- ⑮ Miyagawa S, Roth M, Saito A, Sawa Y, Kostin S. Tissue-engineered cardiac constructs for cardiac repair. Ann Thorac Surg. 2011 Jan;91(1):320-9. doi:10.1016/j.athoracsur.2010.09.080. Review. 査読有
- ⑯ Miyagawa S, Saito A, Sakaguchi T, Yoshikawa Y, Yamauchi T, Imanishi Y, Kawaguchi N, Teramoto N, Matsuura N, Iida H, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Impaired myocardium regeneration with skeletal cell sheets—a preclinical trial for tissue-engineered regeneration therapy. Transplantation. 2010 Aug 27;90(4):364-72. DOI:10.1097/TP.0b013e3181e6f201 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 宮川 繁 重症心不全に対する自己細胞シート移植と左室補助人工心臓を用いた集学的心筋再生治療 日本人工臓器学会 2012. 11. 22-24 アクロス福岡
- ② Sawa Y. Regenerative Cell Sheet Technology to Repair the Heart. AHA2012 2012. 11. 3-7 Los Angeles Convention Center USA
- ③ Sawa Y. It's a Whole New Ball Game: Human Clinical Stem Cell Issue Engineering. AHA2012 2012. 11. 3-7 Los Angeles Convention Center USA
- ④ Kainuma S. Effects of Pedicle Omentum Flap Combined With Cell Sheet Implantation on Vessel Stability, Myocardial Perfusion, and Left Ventricular Reverse Remodeling in Rat Myocardial Infarction Model. AHA2012 2012. 11. 3-7 Los Angeles Convention Center USA
- ⑤ Saito T. Effect of Continuous-Flow Mechanical Support on

Microvasculature Remodeling may Contribute Adversely to Bridge to Recovery in the Failing Heart. AHA 2012 2012. 11. 3-7 Los Angeles Convention Center USA

- ⑥ 宮川 繁 細胞シートを用いた新しい心不全治療の現状と展望。日本老年医学学会学術集会 2012. 6. 28-30 東京国際フォーラム
- ⑦ 宮川 繁 重症心不全における細胞シートを用いたトランスレーショナルリサーチ 第11回日本再生医療学会総会 2012. 6. 12-14 パシフィコ横浜
- ⑧ 宮川 繁 重症心不全における細胞シート移植治療の基礎研究及びその臨床応用 日本外科学会 2012. 4. 12-14 幕張メッセ
- ⑨ 宮川 繁 Transitional Research of Cell Sheet-based Myocardial Regeneration Therapy 日本循環器病学会 2012. 3. 16-18 福岡国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

倉谷 徹 (KURATANI TORU)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授
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・寄附講座准教授
研究者番号：60437316

坂口 太一 (SAKAGUCHI TAICHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授
研究者番号：10467574
(H23 年度まで分担者として参画)

吉川 泰司 (YOSHIKAWA YASUSHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40570594

山内 孝 (YAMAUCHI TAKASHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20527999

(H22年度まで分担者として参画)

白川 幸俊 (SHIRAKAWA YUKITOSHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
准教授

研究者番号：20457013

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

島村 和男 (SHIMAMURA KAZUO)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：10507205