

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 6月15日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591557

研究課題名（和文）

重症心不全大動物モデルを用いた幹細胞治療基盤の確立

研究課題名（英文）

Regenerative medicine for heart failure in large animal models

研究代表者

豊田 雅士（TOYODA MASASHI）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）

・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長

研究者番号：50392486

研究成果の概要（和文）：幹細胞移植医療における安全性や有効性の検証として、前臨床研究としての中大動物実験が求められる。本研究ではヒトで心筋分化能が高いとして期待される羊膜細胞をブタ羊膜から樹立しヒト細胞と比較した。さらにブタの心不全モデルを作製し、そこに細胞を移植し評価した。その結果、ブタ羊膜細胞はヒトと同等な特性を有しており、移植により心機能が改善し、移植した細胞は生着後心筋への分化が認められた。

研究成果の概要（英文）：Amniotic membrane contains a multipotential stem cell population. To explore the clinical application of transplantation of allogeneic amniotic membrane stem cells (AMSCs), we transplanted them into porcine hearts affected by chronic myocardial ischemia as a preclinical study. We have demonstrated that allogeneic AMSC transplantation produced histological and functional improvement in the impaired myocardium in a porcine model of chronic myocardial ischemia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：幹細胞、細胞移植医療、トランスレーショナルリサーチ、大動物モデル、心疾患

1. 研究開始当初の背景

再生医療や細胞移植の基礎研究が目覚ましい成果をあげ、究極の治療である臨床応用を視野に入れた研究が加速している。これまで循環器領域において幹細胞移植が多くの施設で施行されているが、報告されている心臓病への幹細胞移植の臨床試験では、心臓機能改善効果に関する評価は有効・無効が相半ばしており、細胞移植において至的條件であるか

は今後の検討課題として積み上げられている。細胞移植が心臓疾患の治療法として確立するには多くの点で解決しなければならない。幹細胞移植の研究はマウスを用いた *in vitro* や *in vivo* での研究を基礎として、ヒト細胞での検証を行ってきたが、*in vivo* での実験は他種であるマウスなどの実験動物を用いている。移植法や免疫拒絶の問題、分化誘導法や移植細胞の生着率、腫瘍化など

については臨床で想定される自己または同種幹細胞移植による中長期的にわたる検証システムが必要であり、本来は中大動物を使った実験が求められる。しかしヒトに近い中大動物においては材料である幹細胞がほとんど樹立されていない。

2. 研究の目的

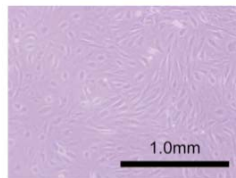
幹細胞生物学の発展は著しく、臨床医学においては幹細胞移植という形でその応用がなされ始めている。その幹細胞移植医療は、皮膚や骨・軟骨などの疾患から心臓、肝臓、膵臓など主要臓器に関する疾患へと期待が高まっている。そこで本研究ではヒトの細胞移植治療の前臨床段階としてのモデルとなるブタにおける幹細胞を樹立し、細胞移植治療に最適な規格化を試みる。さらにブタの心不全疾患モデルを作製し、移植による効果を客観的に評価するための指標を提示するための基盤を築くことを目的とし研究を遂行する。

3. 研究の方法

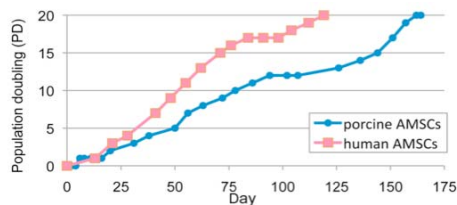
本研究では、重症心不全の細胞移植治療の基盤確立を目指し、ブタをモデル動物とした実験をおこなう。まずヒト幹細胞において心筋分化能が高いとされ、かつ細胞ソースとしても期待される羊膜由来の細胞をブタ羊膜から樹立する。さらに樹立したブタ羊膜由来細胞がヒト羊膜由来細胞と同等な特性を有しているかについて、増殖能や細胞表面抗原解析などにより比較検証する。さらに心不全モデルとなるブタを作製し、生理学的・組織学的な評価を行うとともに、樹立したブタ羊膜由来細胞を移植し、心機能改善効果、組織病理学的評価を行う。

4. 研究成果

(1) ブタ羊膜由来細胞の樹立と特性評価
これまでの知見を元に、ブタ羊膜から細胞を樹立した。得られた細胞について増殖能や細胞表面抗原解析を行い、ヒト羊膜由来細胞の特性と比較した。その結果、形態 (図1) や増殖能 (図2) はほぼ同等なことがわかった。また細胞表面抗原解析を行い、ヒト羊膜細胞の主要なマーカーの発現も同様であった (図3)。こ

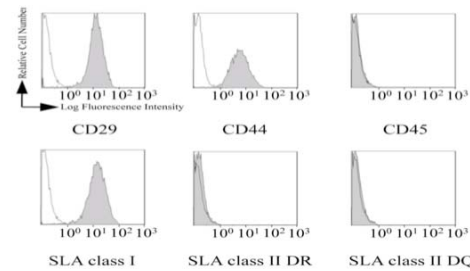


(図1)ブタ羊膜由来細胞



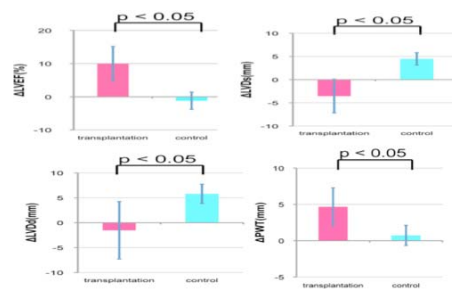
(図2)ブタおよびヒト羊膜由来細胞の増殖能

の結果から、樹立したブタ羊膜細胞はヒト羊膜細胞とほぼ同じ特性を有していると考えられた。



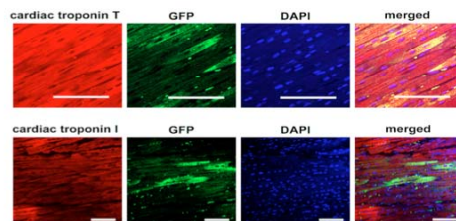
(図3)ブタ羊膜由来細胞の細胞表面抗原解析

(2) ブタ心筋虚血モデルへの移植と評価
ブタを用いた心筋虚血モデルの作製を試み、虚血4週間後における心機能評価を行い、心不全状態にあるかどうかを調べた。その結果、ヒトの心不全病態と同様な心不全様の機能低下を認めた。次に作製した心筋虚血モデルブタに、ブタ羊膜由来細胞もしくは生理食塩水を虚血心の後下壁に直接注入し、4週後に心機能評価ならびに移植した細胞の病理組織学的検討を行った。その結果、羊膜細胞移植群 (5匹) はコントロール群 (生理食塩水移植; 4匹) と比較し、心エコーによる心機能評価を行ったところ、各種指標で心機能の改善効果を認めた (図4、赤: 移植群、青: コントロール群)。



(図4)移植による心機能改善効果

そこでさらに移植細胞の心筋組織中の動態を明らかにするため、GFP トランスジェニックブタ由来の羊膜細胞を樹立して、それを心筋虚血モデルブタに移植したうえで移植4週間後の組織学的検証を行った。移植心筋部位にGFP陽性細胞が認められ、それらの細胞は心筋マーカー陽性を示した (図5)。



(図5)移植したブタ羊膜細胞

このことは羊膜由来細胞が免疫抑制剤無しに生着し、心筋分化したことを示している。しかし心機能の改善を十分説明できるほど多くの細胞が生着していたとはいえ、むしろ周囲の細胞が移植細胞の影響により心筋の再生に寄与したとも考えられる。実際羊膜細胞移植群では虚血部分の心筋組織の繊維化が抑制されていた。移植後の組織再生までの機構については今後詳細な検討が必要であると考えられる。

本研究において大動物モデルによる細胞移植における安全性や有効性を評価・検証する基盤を確立できたといえる。今後の臨床研究にむけて、移植細胞の中長期的な動態を追跡し、生理機能の持続効果を検証していく必要がある。そのためには細胞の生着率向上を目指した移植法や移植後の細胞のイメージング技術などの開発も同時に求められる。

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 6 件)

- ① Kimura M, Toyoda M, Gojo S, Itakura Y, Kami D, Miyoshi S, Kyo S, Ono M, Umezawa A. Allogeneic amniotic membrane-derived mesenchymal stromal cell transplantation in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *J. Stem Cells Regen. Med.*, 査読有, 8(3), 2012, 171-180.
<http://www.pubstemcell.com/monthly/vol18iss3.htm>
- ② Ishii R, Kami D, Tovoda M, Makino H, Gojo S, Ishii T, Umezawa A. Placenta to cartilage: direct conversion of human placenta to chondrocytes with transformation by defined factors. *Mol. Biol. Cell*, 査読有, 23(18), 2012, 3511-3521.
DOI: 10.1091/mbc.E11-10-0869.
- ③ Gojo S, Toyoda M, Umezawa A. Tissue engineering and cell-based therapy toward integrated strategy with artificial organs. *J Artif Organs.*, 査読有, 14(3), 2011, 171-177.
DOI: 10.1007/s10047-011-0578-4.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 豊田雅士 : 再生医療の実現化を目指すための幹細胞評価と糖鎖の果たす役割. 第 16 回循環器再生医療研究会, 2012.11.17, 東京
- ② 豊田雅士, 木村光利, 井上-山崎麻由, 太田百絵, 板倉陽子, 上大介, 許俊鋭, 小野稔, 五條理志, 梅澤明弘. 羊膜細胞を用い

た心筋再生医療への取り組み. 第 15 回循環器再生医療研究会, 2011.11.19, 東京.

- ③ 木村光利, 五條理志, 豊田雅士, 板倉陽子, 許俊鋭, 梅澤明弘, 小野稔 : ブタ慢性心筋虚血モデルへの同種ブタ羊膜由来細胞移植. ブタ慢性心筋虚血モデルへの同種ブタ羊膜由来細胞移植, 第 11 回心血管再生先端治療フォーラム, 2011.7.2, 東京.
- ④ Kimura M, Gojo S, Toyoda M, Itakura Y, Miyoshi S, Kyo S, Umezawa A, Ono M. Transplanted allogenic amniotic membrane-derived mesenchymal cells improved left ventricular function in porcine chronic ischemic heart. Joint Meeting of 19th ASCVTS & 21st ATCSA, 2011.5.28, Phuket Thailand

- ⑤ 木村光利, 五條理志, 豊田雅士, 板倉陽子, 許俊鋭, 西村隆, 川島大, 梅澤明弘, 小野稔 : ブタ慢性心筋虚血モデルにおける同種ブタ羊膜由来細胞移植. 第 10 回日本再生医療学会総会, 2011.3.1-2, 東京
- ⑥ 木村光利, 五條理志, 豊田雅士, 板倉陽子, 許俊鋭, 三好俊一郎, 梅澤明弘, 小野稔 : ブタ慢性心筋虚血モデルへの同種ブタ羊膜由来細胞移植. 第 10 回再生心臓血管外科治療研究会, 2011.2.23, 千葉

[図書] (計 1 件)

- ① 豊田雅士, 梅澤明弘, 文光堂, 心筋再生のマテリアル. 心不全外科治療の要点と盲点 (高本眞一監修, 許俊鋭編集), 2012, pp216-220.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 雅士 (TOYODA MASASHI)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長
研究者番号 : 50392486

(2) 連携研究者

梅澤 明弘 (Umezawa Akihiro)

独立行政法人国立成育医療研究センター研究所・再生医療センター・センター長
研究者番号 : 70213486

五條 理志 (Gojo Satoshi)

京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号 : 90316745

(3) 研究協力者

板倉 陽子 (Itakura Yoko)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療セ

ンター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：30582746

上 大介（Kami Daisuke）

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：80415588

三好 俊一郎（Miyoshi Shunichiro）

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10296577

肥田 直子（Hida Naoko）

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：70360112

井上 麻由（Inoue Mayu）

独立行政法人国立成育医療研究センター

研究所・生殖・細胞医療研究部・研究員

研究者番号：40596920