

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592047

研究課題名(和文) ヒト胎児付属物由来間葉系細胞と心筋分化誘導分子による重症心不全治療の実現

研究課題名(英文) Treatment for severe heart failure using human placenta derived mesenchymal cells and differentiation inducing molecule to myocytes

研究代表者

岡本 一真 (OKAMOTO, KAZUMA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10338064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：全身麻酔下のビーグル犬を用いて、セルディング法により心嚢内に内視鏡を挿入して心嚢内の視野を確保した。心嚢内での内視鏡手術手技の確立、周辺機器の最適化、心外膜側からの細胞移植デバイスツールの開発をすすめた。ビーグル犬の左室にヒト胎盤由来間葉系細胞の左室20カ所への移植を行い、手技中の血行動態の変化をモニタリングした。さらにペースメーカーワイヤの留置にも成功した。また、PPAR- およびARBを中心に、数種類の候補分子について幹細胞の生着率、心筋分化誘導率の変化などについて検討した。

研究成果の概要(英文)：1) Establishment of cell implantation technique using pericardial endoscopy
In beagle dogs, pericardial endoscope was placed in pericardial space using Seldinger technique and the view in the pericardial space was afforded. Specialized technique to work in the small pericardial space, optimized device, and tools for cell transplant to the epicardium were developed. Human placenta derived mesenchymal cells were successfully implanted to the left ventricle of beagle dogs. Pacing wire implantation under pericardial endoscopic view was also performed.
To find factors to enhance differentiation to the cardiomyocyte from mesenchymal cells, several candidate molecules were verified.

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：幹細胞 間葉系 細胞移植 低侵襲 内視鏡 心不全

1. 研究開始当初の背景

重症虚血性心疾患、拡張型心筋症、肥大型心筋症などを原因疾患とする重症心不全に対する現時点での最終的な治療法は心臓移植である。しかしながら、欧米におけるドナー不足を鑑みると、2010年7月の臓器移植法改正後も本邦では今後も著しいドナー不足が続くことが予想される。また、欧米において外国人に対する渡航心移植を制限が明白になっており、今後は、渡航移植は難しくなる。さらには、移植治療の侵襲の大きさや莫大な医療コスト、10年を越える長期予後が不良なことを考慮すると、心臓移植に替わる治療法が待望されている。代表的な代替治療法である人工心臓については、耐久性、感染、血栓塞栓症などの問題が完全に解決されたとは言えず、重症心不全治療のゴールとするには難しい。また左室形成術に代表されるような外科的治療法についても、十分な成果が挙がっているとは言い難い。

これに対して、細胞移植治療に対する期待は年々高まり、心不全治療を目指した幹細胞研究が着実に進んでいる。細胞移植治療は臓器そのものを移植する臓器移植とは異なり、生体外で培養・分化誘導された細胞を移植するか、もしくは、ホルモンや成長因子などの液性因子を投与することで臓器機能を補填することを目指しており、臓器移植と比較すると移植臓器の確保という問題を回避出来る利点がある。特に、2006年の Inducible Pluripotent Stem Cells (iPS細胞)の発見以来、再生医療は現実味を帯び、莫大な人的・物的・資金的資源が幹細胞研究に投入され、急速に新しい知見を得ている。さらに、間葉系幹細胞や ES細胞といった有望な細胞移植ソースについても基礎研究が進んでいる。

研究代表者の岡本らは、ヒト胎児付属物(卵膜、胎盤、臍帯、子宮内膜)由来の間葉系幹細胞の心筋分化について探求を深めており、2007年にはヒト胎盤由来の間葉系細胞を拍動し作業型心筋タイプの活動電位を有する細胞に分化させることに成功している。

2. 研究の目的

本研究課題では、ヒト胎児付属物(卵膜、胎盤、臍帯、子宮内膜)由来の間葉系細胞と心筋分化誘導分子の組み合わせによる高率な心筋分化法を規格化し、重症心不全に対する細胞移植治療の実現を目指して研究を遂行する。

心筋分化誘導分子を導入することでヒト胎児付属物由来間葉系細胞から心筋への分化誘導効率を飛躍的に向上し、最終的には細胞移植が重症心不全治療の標準治療となることをゴールとする。

研究期間内において、ヒト胎児付属物由来間葉系細胞の心筋への分化効率の飛躍的な向上、中型動物における内視鏡下細胞移植治療法の有効性および安全性の確認の大きな枠組みからなり、間葉系細胞の調整から中型

動物への移植実験までを本研究課題で行う予定である。

3. 研究の方法

(1) 心嚢内視鏡下細胞移植法の確立

低侵襲な心筋への細胞移植法としての、心嚢内視鏡下細胞移植法の開発を進める。ヒト胎児付属物由来間葉系細胞の有効な心筋分化誘導法を検証するためのビーグル犬を用いた In Vivo 実験系を確立する。

(2) 心筋分化誘導分子による分化効率の向上

心筋分化誘導率を劇的に向上させる分子の同定を推進する。現在最も有力な候補である PPAR- および ARB を中心に、数種類の候補分子について検討する。さらに、in-vitro だけではなく in-vivo での幹細胞の生着率、心筋分化誘導率の変化などについて検討を進める。

(3) 幹細胞移植の治療効果の検討

心嚢内視鏡下低侵襲アプローチを用いて、ヒト幹細胞の生体内での分化能・生着能検定を行う。免疫不全動物への移植による生着、機能発揮、組織構築能に関する検討やイヌ心筋梗塞モデルへの移植による心機能改善の評価により、ヒト幹細胞移植による重症心不全治療の臨床応用を裏付ける基礎データを蓄積する。

4. 研究成果

(1) 心嚢内視鏡下細胞移植法の確立

ヒト胎盤由来の間葉系細胞が低侵襲な心嚢内視鏡下アプローチで安全に移植でき、生着させ、心筋へ分化する能力を検証することを目指して研究を進めた。全身麻酔下のビーグル犬を用いて、セルディンガー法により心嚢内に内視鏡を挿入して心嚢内の視野を確保し、各種マニピュレータープロトタイプを用いて心嚢内で細胞移植シミュレーションによる器具の最適化を行った。既製の内視鏡システムを用いた心嚢内での内視鏡手術手技の確立、マニピュレータを含めた周辺機器の最適化、心外膜側からの細胞移植デバイスツールの開発をすすめた。心嚢内の作業空間確保のためには、心嚢内に気体を充満させて心嚢のスペースを確保する方法を試みたが、心タンポナーデの血行動態になるため、実用性はなく、硬性内視鏡もしくはシースそのもので胸壁を挙上することによってスペースを確保するのがもっとも有用であることが分かった。心嚢内視鏡アプローチでビーグル犬の左室に青色色素の注入、ビーズの注入、ヒト胎盤由来間葉系細胞の左室 20 カ所への移植とすすめ、観血的動脈圧ラインや心電図の解析により手技中の血行動態の変化をモニタリングした。さらにペースメーカーワイヤの留置にも成功し、心嚢内視鏡を用いて目視のもとで心臓再同期療法(CRT)に用いる心外膜リードを目的の場所に正確に留置することが可能であることが確認できた。

(2) 心筋分化誘導分子による分化効率の向上:

心筋分化誘導率を劇的に向上させる分子の同定を目的として PPAR- および ARB を中心に、数種類の候補分子について幹細胞の生着率、心筋分化誘導率の変化などについて検討した。

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 8 件)

Shirakawa K, Egashira T, Ieda M, Kawaguchi S, Okamoto K, et al.

Multidisciplinary approach to the treatment of cardiac AA amyloidosis and aortic stenosis due to Castleman's disease: A hybrid therapy with tocilizumab and aortic valve replacement. *Int J Cardiol.* 2014 May 1;173(2):e9-e11. doi: 10.1016(査読あり)

Kudo M, Yozu R, Okamoto K. Recurrent Mitral Regurgitation Due to Ruptured ePTFE Neochordae after Mitral Valve Repair by the Loop Technique: A Report of Case. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2014 Jan 15. [Epub ahead of print] (査読あり) URL:

<http://europepmc.org/abstract/MED/24429693/reload=0;jsessionid=eU7t1nlky9B8ZH9Pov4X.20>

Kimura T, Miyoshi S, Okamoto K, et al. The effectiveness of rigid pericardial endoscopy for minimally invasive minor surgeries: cell transplantation, epicardial pacemaker lead implantation, and epicardial ablation. *J Cardiothorac Surg.* 2012 Nov 9;7:117. doi: 10.1186 (査読あり)

Shimizu H, Okamoto K, Yamabe K, et al. Hybrid treatment of a ruptured

aneurysm in the distal aortic arch: report of a case. *Surgery Today.* 2012 Oct;42(10):1019-21. doi: 10.1007 (査読あり)

Aeba R, Kudo M, Okamoto K, Yozu R. Bridging annuloplasty for left triventricular valve of partial atrioventricular septal defect. *Ann Thorac Surg.* 2012 May;93(5):e137-9. doi: 10.1016 (査読あり)

Okamoto K, Kudo M, Yozu R. Loop-in-loop technique in mitral valve repair via minithoracotomy. *Ann Thorac Surg.* 2012 Apr;93(4):1329-30. doi: 10.1016 (査読あり)

Yozu R, Okamoto K, Kudo M, et al. New innovative instruments facilitate both direct-vision and endoscopic-assisted mini-mitral valve surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012 Apr;143(4 Suppl):S82-5. doi: 10.1016 (査読あり)

岡本一真、工藤樹彦、四津良平. 人工腱索再建を軸にした僧帽弁形成戦略. *胸部外科* 2012; 65(4);291-295.(査読なし)

[学会発表](計 15 件)

岡本一真、工藤樹彦、川口新治、他 5 名. 安全な右小開胸僧帽弁手術の確立. 第 44 回日本心臓血管外科学会学術総会、2014/2/20、ホテル日航熊本(熊本)

岡本一真、工藤樹彦、四津良平. 内視鏡補助下右小開胸心臓手術の現在と未来 シンポジウム「小切開心臓手術(MICS法)の可能性と安全性」. 第 61 回日本心臓病学会学術集会、2013/9/20、ホテル日航熊本(熊本)

Kazuma Okamoto, Mikihiro Kudo, Hidenobu Takaki, et al. VIDEO-ASSISTED CARDIAC SURGERY VIA RIGHT

MINI-THORACOTOMY. ASCVTS2013,
2013/4/5、神戸国際会議場(兵庫)
Kazuma Okamoto, Mikihiro Kudo, Ryohei
Yozu. "LOOP-IN-LOOP" TECHNIQUE IN
MITRAL VALVE REPAIR VIA
MINITHORACOTOMY. 20th Annual Meeting
ASCVTS, 2013/3/10, Bali, Indonesia.
岡本一真、工藤樹彦、高木秀暢、四津良平. 人工腱索再建を軸とした僧帽弁形
成術を実現する Loop-in-Loop
technique. 第 43 回日本心臓血管外科学
会学術総会、2013/02/26、ホテルグラン
パシフィック LE DAIBA (東京)
岡本一真、工藤樹彦、根本淳、他 4 名.
人工腱索再建を軸にした内視鏡補助
下・右小開胸アプローチによる僧帽弁形
成術、第 65 回日本胸部外科学会定期学
術集会、2012/10/20、福岡国際会議場(福
岡)
Kazuma Okamoto, Mikihiro Kudo, Ryohei
Yozu. "Loop-in-loop technique" for
multiple PTFE neo-chordae creations
in mitral valve repair. Fourth Annual
Joint Scientific Meeting HVSA,
2012/4/12, New York, America.
岡本一真、工藤樹彦、四津良平. 心臓外
科領域におけるロボット手術および鏡
視下手術への取り組み. 第 3 回小切
開・鏡視外科学会 Grand symposium、
2011/11/12、(東京)
岡本一真、工藤樹彦、四津良平. "Second
generation" loop-technique による右
小開胸僧帽弁形成術、第 64 回日本胸部
外科学会定期学術集会、2011/10/12、名
古屋国際会議場(名古屋)
木村雄弘、三好俊一郎、岡本一真、他 4
名. 心嚢内視鏡による低侵襲治療の試
み、第 25 回日本心臓血管内視鏡学会、
2011/10/8、京都大学医学部芝蘭会館(京
都)

岡本一真、三好俊一郎、木村雄弘、他 3
名. 心嚢内視鏡を用いた心筋への低侵襲
ヒト幹細胞デリバリーシステムの開発、
第 15 回日本心筋・血管新生療法研究会、
2011/7/14、ホテルブエナビスタ(長野)
Kazuma Okamoto, Mikihiro Kudo, David
Adams, Ryohei Yozu. New innovations of
instruments and techniques facilitate
endoscopic-assisted mitral valve
repair via mini-thoracotomy. ISMICS,
2011/6/8-11, Washington DC, America.
Kazuma Okamoto, Mikihiro Kudo, Ryohei
Yozu. ASD CLOSURE VIA
ENDOSCOPIC ASSISTED MINI-THORACOTOMY
APPROACH. ASCVTS-ATCSA 2011 Joint
Meeting of 19th ASCVTS and 21st ATCSA,
2011/5/28, Phuket, Thailand.
R. Yozu, K. Okamoto, M. Kudo, H. Nonaka,
D. Adams. New Innovative Instruments
Facilitate Both Direct-vision and
Endoscopic-assisted Mini-mitral
Valve Surgery. Mitral Conclave 2011,
2011/5/5, New York, America.
Kiyokazu Kokaji, Shunichiro Miyoshi,
Tatsuo Takahashi, Kazuma Okamoto, et
al. Pretreatment of Autologous
Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells
with Pioglitazone Improved the
Efficacy of Transplantation on
Cardiac Function in Beagle. ACC 60th
Annual Scientific Session,
2011/4/3, New Orleans, America.

〔図書〕(計 3 件)

岡本一真、四津良平. 日本医事新報社、
日本医事新報、2013、全 118 ページ
岡本一真、四津良平. 中外医学社、
Annual Review 循環器、2013、全 285
ページ
岡本一真、四津良平. 先端医療技術研究
所、先端医療シリーズ 43 循環器疾患の

〔産業財産権〕

出願状況
該当なし
取得状況
該当なし

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡本 一真 (OKAMOTO, Kazuma)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：10338064

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

肥田 直子 (HIDA, Naoko)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：70360112

木村 雄弘 (KIMURA, Takehiro)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：20449002

三好 俊一郎 (MIYOSHI, Shunichiro)
慶應義塾大学・医学部・講師 (非常勤)
研究者番号：10296577