

様 式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462131

研究課題名(和文) 補助人工心臓離脱率向上を目指した心筋再生医療導入に関する実験的検討

研究課題名(英文) Experimental evaluation of myocardial regenerative therapy to improve the success rate of ventricular assist device removal for severe heart failure

研究代表者

水野 友裕 (Mizuno, Tomohiro)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：00323676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円

研究成果の概要(和文)：細胞シートの作成技術を獲得したのち、雌ルイスラットの虚血心を用いて、雄ルイスラットの細胞の直接注入と細胞シート移植とで細胞の生着率をY-chromosomeをターゲットとしたreal-time PCRにより生存率を計測した。移植後1時間の生存率は細胞シートは $40.0 \pm 14.4\%$ 、直接注入では $19.9 \pm 13.7\%$ と細胞シートは良好に細胞を移植できたが、生着率は時間とともに減少し、4週間後にはそれぞれ生存率は $3.7 \pm 3.6\%$ 、 $1.9 \pm 2.0\%$ と減少し、その減衰率は両群で同じで非常に低い生存率であった。心筋再生医療を発展させるためには、移植細胞をいかに生存させるか、という命題をクリアする必要がある。

研究成果の概要(英文)：Methods: Female Lewis rats were divided into two groups after coronary ligation: three layers of Male Lewis smooth muscle cell-sheet transplantation (Group CS) and direct injection (Group DI). A total of  $1 \times 10^6$  cells were transplanted in both groups. At 1h, 1 week, and 4 weeks after transplantation, the recipient female rat hearts were harvested, and real-time PCR was performed to measure the number of live male donor cells, which included the Y-chromosomes. Results: One hour after transplantation, the rate of live cells was  $40.0 \pm 14.4\%$  in Group CS and  $19.9 \pm 13.7\%$  in Group DI; at 1 and 4 weeks, it was  $14.5 \pm 18.6\%$  and  $8.3 \pm 2.9\%$ , and,  $3.7 \pm 3.6\%$  and  $1.9 \pm 2.0\%$ , respectively. The attenuation curves of the transplanted cells similar between the groups. Conclusions: Cells can be transplanted more effectively by cell-sheet transplantation than by direct injection. However, the donor cell number in both groups decrease with almost the same attenuation curve.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：重症心不全 心筋再生医療 補助人工心臓 細胞シート 細胞移植

## 1. 研究開始当初の背景

重症心不全患者に対する治療は外科的治療、薬物的治療とも高度に進歩してきたが、末期重症心不全状態では、bridge to transplantation (BTT)として補助人工心臓 (Ventricular Assist Device : VAD) により機械的に循環を補助し、全身状態を改善させて心臓移植へと進むしか治療法がない。しかし、世界的にも donor 不足のため移植待機期間が長く、特に日本では待機期間は3年以上であり、待機期間中に塞栓症、感染、出血性疾患などの VAD 合併症により命を落とすこともあり、患者にとっても治療を施す心臓外科医にとってもまだまだハードルの高い治療手段となっている。西暦 2000 年前後に、重度の障害を受けた不全心に対し左室補助人工心臓 (LVAD) を装着し、心負荷を軽減すると(unload)、左室機能が回復する例が多く見られ、bridge to recovery (BTR)という概念が生まれた。しかし、実際は、LVAD により回復した心機能も LVAD 離脱後早期に左室は再拡張し、心機能の低下を来し、不整脈死に至ったり、再度 LVAD を装着し移植へと移行する例が非常に多く、LVAD + 薬物治療では bridge to recovery はあまり期待できないのが現状である。しかし、donor 不足を鑑み、VAD による循環補助中に心機能を回復させる新たな治療法を開発することで、VAD 離脱率が向上すれば、心移植の必要性を減少させることが可能となる。その心機能回復の方法として、細胞移植、心筋細胞シート移植などの regenerative therapy がその一翼を担うと期待される。

Regenerative therapy に関しては、実験レベルでは効果的とする報告が多数あり、申請者自身も gene transfection を施した cell transplantation の効果を報告している。しかし、臨床治験の結果では、限定的な効果しか得られていない。Cell transplantation の

問題点として、移植細胞の 70-80%は移植早期に死滅してしまう点にあり、適正な移植細胞数、移植方法も明確にはなっていない。この欠点を補うべく、細胞シートとして細胞を移植する方法が開発され、実験レベルでの効果は報告されており、わずかながら臨床応用の報告が散見されるが、その効果を検証するレベルには至っていない。

著者は、LVAD 装着状態 (左室 unloading 状態) の心臓と、その後 VAD を離脱した心臓 (左室 reloading の状態) をシュミレーションするモデル (Mizuno T, Weisel RD, Li RK. Reloading the heart: A new animal model of left ventricular assist device removal. J Thorac Cardiovasc Surg 第 130 巻 P.99-106、2005 年)を開発し、このラット心肺移植モデルを使用して、unloading 中の心臓に細胞移植を行った後に reloading をした場合、reloading 後の左室拡張が明らかに抑えられることを示し、LVAD 治療において、unloading 中に効果的な治療を行うことで LVAD 離脱後の左室の拡張を抑え、心不全再発を予防できる可能性を発表した (Mizuno. "Feasibility of cell transplantation with a left ventricular assist device to improve the success rate of left ventricular assist device removal: the first experiment." Interact Cardiovasc Thorac Surg 2011;12:10-14)。また、同じ実験モデルを使って、unloading 中の cell transplantation では移植細胞の survival rate が上がることも確認している。

## 2. 研究の目的

LVAD 装着後の補助療法としてこれまで薬物治療が行われてきたが、その効果は不十分と言える。細胞移植、細胞シート治療などの心筋再生医療がこの補助療法として大きな役割を果たす可能性が十分予測されるため、独自に開発したラットの VAD シュミレーション実験モデルを使用し、細胞移植、心筋シートなどの regenerative therapy の効果、機

序を実験的に検討する。

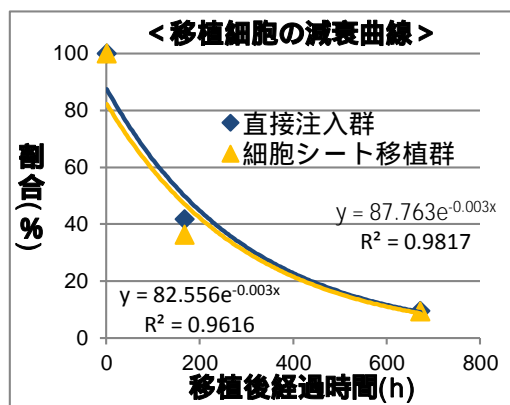
### 3. 研究の方法

LVAD 装着状態（左室 unloading 状態）の心臓と、その後 VAD を離脱した心臓（左室 reloading の状態）をシミュレーションするモデル（Mizuno T, Weisel RD, Li RK. Reloading the heart: A new animal model of left ventricular assist device removal. J Thorac Cardiovasc Surg 第 130 巻 P.99-106、2005 年）を用いる。今回の実験では、1. 心筋梗塞による不全心を作成。2. 別のラットに梗塞心を植込み、2 週間の unloading 後に reloading をかける。3. 2 週間の unloading の間に、移植された不全心に対し、心機能回復を目的に、平滑筋細胞、骨格筋芽細胞の直接注入する群、平滑筋細胞、骨格筋芽細胞の細胞シートを直接貼り付ける群、同細胞シートを大網に先行移植（心肺移植時に同時に大網へ細胞シートを移植する予定）させておいて大網ごと移植心に貼り付ける群、特に intervention をしない群を作成。5. reloading 後 2 週間維持したのち心機能測定。ドナー心摘出し移植した細胞の生着率、細胞外マトリックスの測定を行う。

### 4. 研究成果

雄ルイスラットの平滑筋細胞シートの作成技術を獲得したのち、雌ルイスラットの虚血心を用いて、雄ルイスラットの細胞シート移植群と細胞直接注入群とで細胞の生着率を Y-chromosome をターゲットとした real-time PCR によりを計測した。細胞シートは 3 層のものを作成した。移植細胞数は  $1 \times 10^6$  個とした。細胞移植後 1 時間での細胞の生存率は細胞シート群で  $40.0 \pm 14.4\%$ 、細胞直接注入群では  $19.9 \pm 13.7\%$ であり、細胞シート移植のほうが、効果的に移植が可能であった。その後の生存率は、一週間後はそれぞれ  $14.5 \pm 18.6\%$ 、 $8.3 \pm 2.9\%$ 、4 週間後はそれぞれ  $3.7 \pm 3.6\%$ と  $1.9 \pm 2.0\%$ であり、移植細胞の生存

率は非常に低いものであった。また、その減衰率は細胞シートと細胞直接注入法とで同じであることが実験的に明確となった（それぞれ  $R^2 = 0.96$  and  $0.98$ ）。



心臓ではない他部位（皮膚、大網など）に先行移植し、生着させたうえで虚血心へ移植を行う実験も行い、検討したが、real-time PCR における DNA 抽出で脂肪の混在が障壁となり、正確なデータは得られなかった。異所性心肺移植後への細胞シート移植の効果を判定する段階で研究期間終了を迎えた。現在、現時点での研究成果を論文化しており、学会発表等も並行して行っていく予定である。

### 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 1 件）

水野友裕：心筋再生医療と補助人工心臓の併用療法の可能性 - 補助人工心臓からの離脱率を向上させ心移植の需要を減らせるか -

BIO Clinica 査読無 Vol.31, No.6

pp.625-633, 2016 年.

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

水野 友裕 (MIZUNO, TOMOHIRO)  
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研  
究科 心臓血管外科 准教授  
研究者番号：00323676

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：