

平成30年6月27日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10217

研究課題名(和文) 臨床応用に向けた重症心不全治療に対する骨髄細胞シートの新規治療戦略の構築

研究課題名(英文) Construction of novel strategy for clinical application to treat severe heart failure by implantation of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cell sheets

研究代表者

白澤 文吾 (SHIRASAWA, Bungo)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80444719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ウサギ大腿部骨髄由来間葉系幹細胞シート自家移植による陳旧性心筋梗塞部に対する治療効果を検討した。何も貼付しないコントロール群、通常培養後の細胞シート貼付群、低酸素培養後の細胞シート貼付群の3群で、左心室の機能、心筋梗塞領域を比較した。左心室の機能は、左心室駆出率・左室内径短縮率により評価し、心筋梗塞領域は、マッソン・トリクローム染色により評価した。いずれもコントロール群に比べ、通常培養後の細胞シート貼付群で、さらに通常培養後の細胞シート貼付群に比べ、低酸素培養後の細胞シート貼付群で有意に左心室の機能の増加、心筋梗塞領域の減少を認めた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the in vivo therapeutic effect of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cell sheets (BM-MSC) on a rabbit old myocardial infarcted area following autologous transplantation. Functions of left ventricular and myocardial infarcted area were compared among control group, transplantation group of BM-MSC following normoxic culture condition, and transplantation group of BM-MSC following hypoxic culture condition. Functions of left ventricular was evaluated left ventricular ejection fraction and left ventricular fractioning shortening, and myocardial infarcted area was evaluated Masson's trichrome-staining. Compared with control, transplantation of BM-MSC following normoxic condition significantly enhanced functions of left ventricular and reduced myocardial infarcted area. Furthermore, compared with normoxic condition, transplantation of BM-MSC following hypoxic condition significantly enhanced functions of left ventricular and reduced myocardial infarcted area.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：間葉系幹細胞 細胞シート 低酸素プレコンディショニング 心筋梗塞

1. 研究開始当初の背景

我が国において約 80 万人に上る虚血性心疾患患者に対する骨髄細胞移植療法は、動物実験レベルでは高い治療効果が示されている。しかし当科を含む複数の研究グループがこれまでにやってきている臨床試験においては、血流改善などの効果は認められるものの左室機能改善に至る報告はない。一方近年では、細胞をシート状にして不全心に移植する細胞シート移植治療が注目を浴びており、骨髄細胞シートにおいても動物モデルでその有用性が示されている。

2. 研究の目的

本研究では、当科で開発した低酸素プレコンディショニング法を骨髄細胞シートに応用し、骨髄細胞シートの機能賦活化が虚血性心疾患に対する新たな治療法となり得るかを検証する。

3. 研究の方法

まず、麻酔下で骨髄穿刺により、ウサギ大腿骨から骨髄細胞を採取し、採取された自己骨髄細胞を用いて、自己骨髄細胞シートを作製する。自己骨髄細胞シートに低酸素プレコンディショニング(2%酸素・24時間)を施して、機能が賦活化したウサギ自己骨髄細胞シート(enhanced BMCシート)を作製し、その機能賦活化状態を検証する。機能が賦活化したウサギ自己骨髄細胞シートにおける血管新生因子の産生能、酸化ストレス抵抗性の獲得、等について *in vitro* で検討し、ウサギ自己骨髄細胞シートの機能賦活化が生じているか否かを検討する。次に、冠動脈左前下行枝を結紮し作製したウサギ陳旧性心筋梗塞モデルの不全心へ機能が賦活化したウサギ自己骨髄細胞シートを移植し、左室機能の改善や線維化の状態等について、心エコーおよび組織学的な解析による検証を行う。また、移植細胞シートの造腫瘍性についても検討し、臨床応用へ向けた体制作りを構築する。

4. 研究成果

(1) 大腿骨から単離したウサギ骨髄由来間葉系幹細胞を2週間培養し、ほぼコンフルエントになった紡錘形の形態を示す間葉系幹細胞が観察され(図1-A)、骨髄由来間葉系幹細胞の細胞表面マーカーであるCD44の発現が認められた(図1-B)。さらに、ウサギ骨髄由来間葉系幹細胞を骨分化条件下で培養すると、コントロール群に比べ、アルカリリンフォスファターゼ活性が有意に高く(図1-C)脂肪分化条件下で培養すると、脂肪滴が認められた(図1-D)。また、軟骨分化条件下で培養すると、コントロール群に比べ、軟骨分化マーカーである酸性ムコ多糖体量の増加が認められた(図1-E)。これらの結果は、典型的な間葉系幹細胞の特徴を示しており、我々が単離したウサギ骨髄由来細胞は間葉系幹細胞と考えられ、以下の実験に用いることとした。

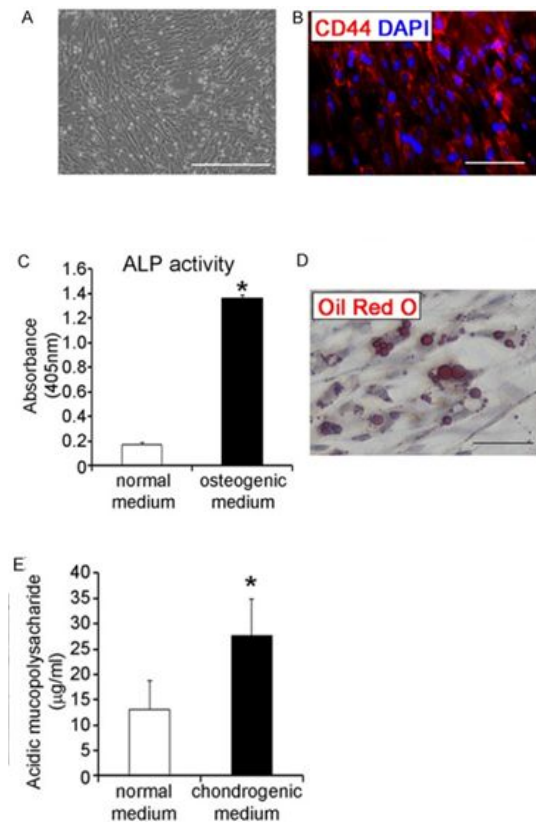


図1. ウサギ骨髄由来間葉系幹細胞の単離と骨分化、脂肪分化、軟骨分化能の確認

(2) ウサギ骨髄由来間葉系幹細胞から細胞シートを作製し、低酸素プレコンディショニング後の VEGF 産生量を比較・検討した。2%酸素で、24h, 48h, 72h 処理し、VEGF 量を測定したところ、2%酸素で 48h 処理したときの VEGF 量が最も多かった (図 2-A)。また、低酸素プレコンディショニングにより、ウサギ骨髄由来間葉系幹細胞シートには、アポトーシスの有意な増加は認められなかった (図 2-B, C)。

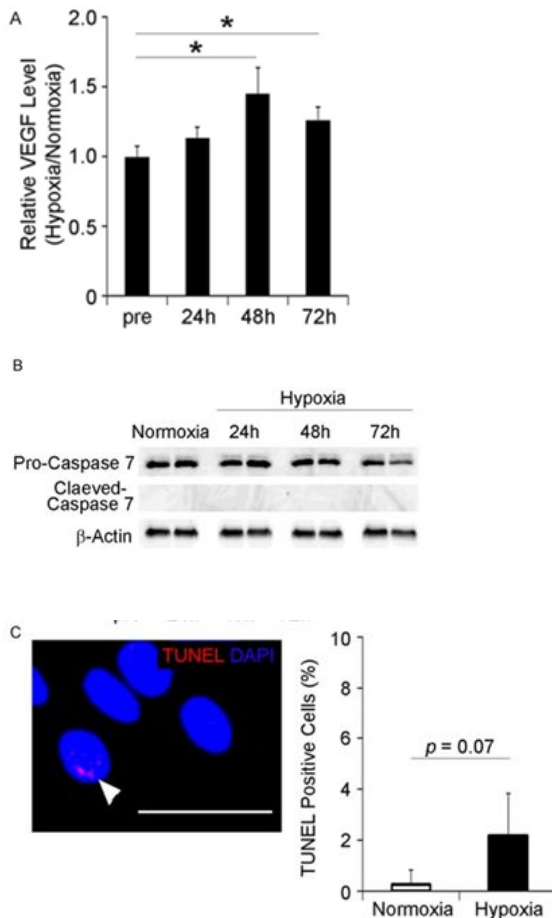


図 2. 低酸素プレコンディショニングによるウサギ骨髄由来間葉系幹細胞シートの VEGF 産生量の増加

(3) 低酸素プレコンディショニングにより、血管新生能が増加するかどうか、チューブフォーメーションアッセイにより検討した。ヒト臍帯血由来の血管内皮細胞をコンディショニングメディウムを用いて、通常酸素条件下、低酸素条件下で培養したところ、両群ともコントロール群に比べ、血管形成能が増加し、通常酸素 + コンディショニングメディウム条件下に比べ、低酸素 + コンディシ

ョニングメディウム条件下の方が有意に血管形成能が増加していた。また、細胞の遊走能を比較・検討したところ、両群ともコントロール群に比べ、細胞遊走能が低下し、通常酸素 + コンディショニングメディウム条件下に比べ、低酸素 + コンディショニングメディウム条件下の方が有意に細胞遊走能が低下していた。

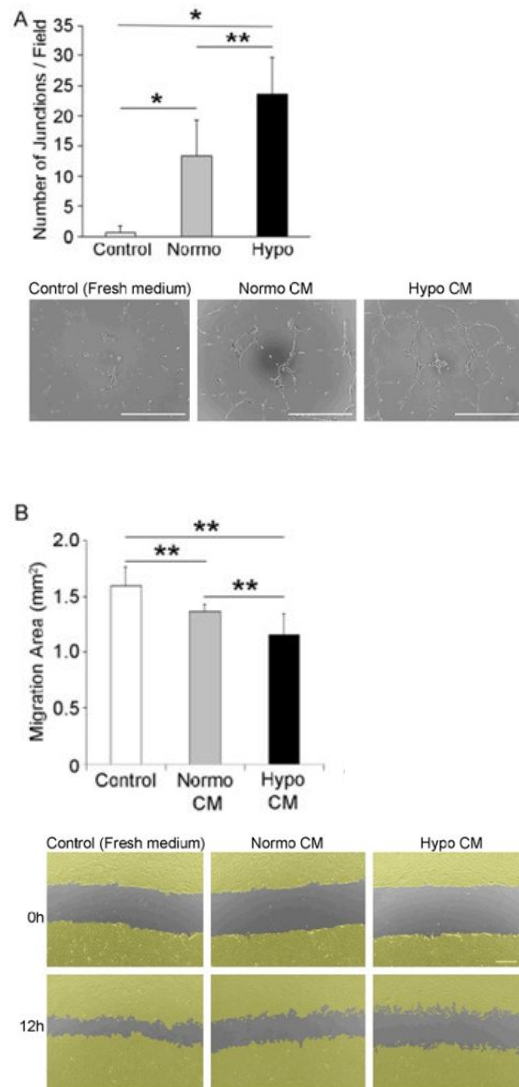


図 3. 低酸素プレコンディショニングによるウサギ骨髄由来間葉系幹細胞シートの血管新生能の増加

(4) 低酸素プレコンディショニングされたウサギ骨髄由来間葉系幹細胞シートをウサギ陳旧性心筋梗塞モデルの不全心へ移植し、左心室機能が改善されるかどうか検討した。通常酸素条件下および低酸素条件下で培養されたウサギ骨髄由来間葉系幹細胞シートを貼付したいずれの群も、未貼付群に比べ、

有意に左心室機能の回復が認められ、さらに、通常酸素条件下に比べ、低酸素条件下で培養されたウサギ骨髄由来間葉系幹細胞シートを貼付した群において、有意な左心室機能の回復が認められた。

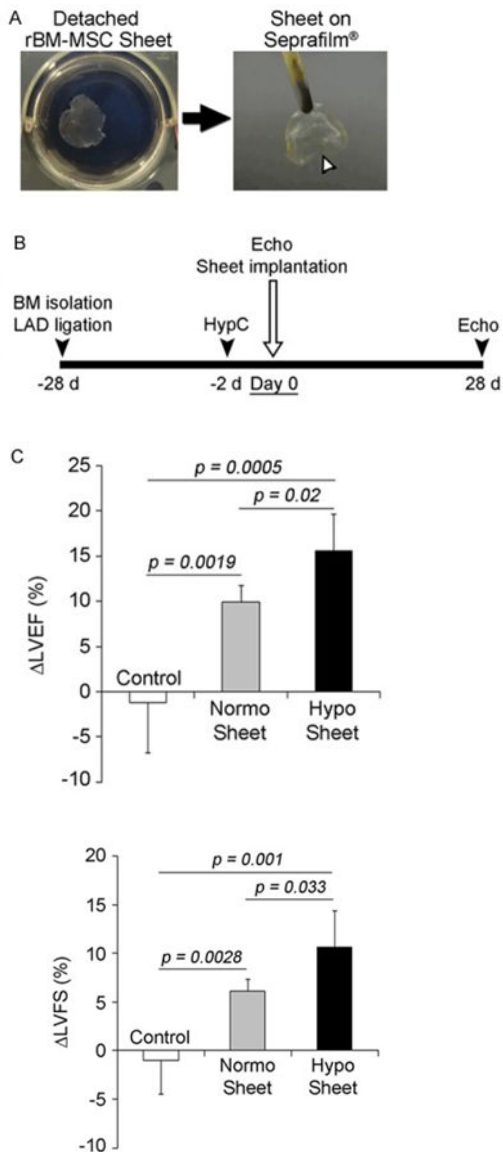


図 4. ウサギ骨髄由来間葉系幹細胞シートのウサギ陈旧性心筋梗塞不全心への移植による左心室機能の改善

(5) 通常酸素条件下および低酸素条件下で培養されたウサギ骨髄由来間葉系幹細胞シートを貼付したいずれの群も、未貼付群に比べ、有意に心筋梗塞領域の減少および毛細血管の密度の増加を認め、さらに、通常酸素条件下に比べ、低酸素条件下で培養されたウサギ骨髄由来間葉系幹細胞シートを貼付した群において、有意な心筋梗塞領域の減少および毛細血管の密度の増加が認められた。

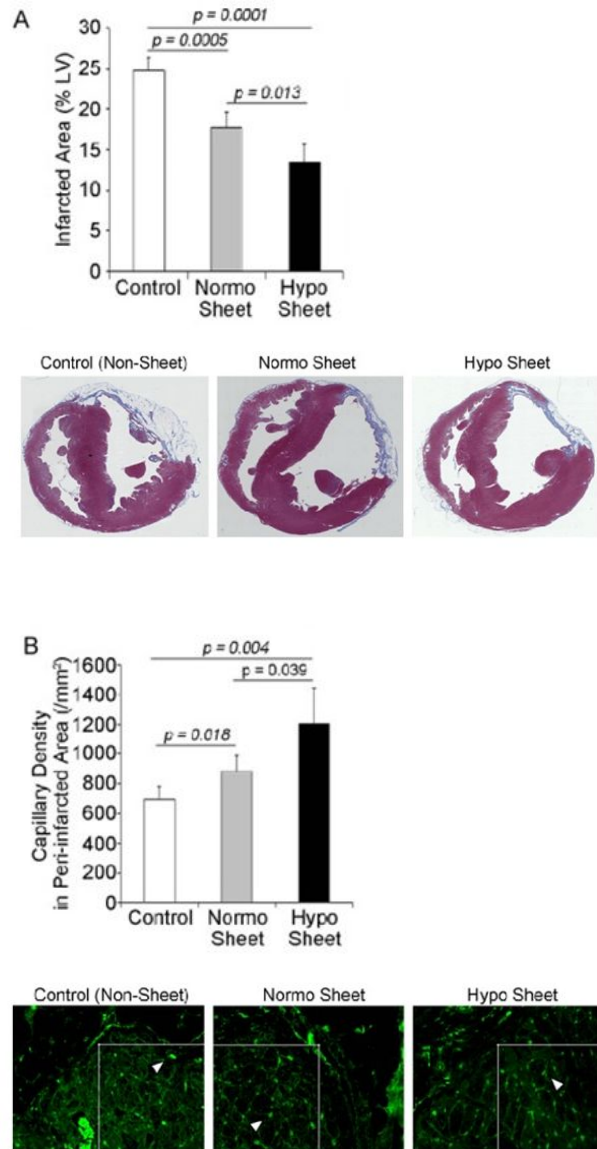


図 5. ウサギ骨髄由来間葉系幹細胞シートのウサギ陈旧性心筋梗塞不全心への移植による心筋梗塞領域の減少および毛細血管の密度の増加

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. Yuya Tanaka, Tohru Hosoyama, Akihito Mikamo, Hiroshi Kurazumi, Arata Nishimoto, Koji Ueno, Bungo Shirasawa, Kimikazu Hamano. Hypoxic preconditioning of human cardiosphere-derived cell sheets enhances cellular functions via activation of the PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α pathway. American Journal of Translational Research, 2017, 9, 664-673. (査読有)

2. Yuya Tanaka, Bungo Shirasawa, Yuriko Takeuchi, Daichi Kawamura, Tamami Nakamura, Makoto Samura, Arata Nishimoto, Koji Ueno, Noriyasu Morikage, Tohru Hosoyama, Kimikazu Hamano. Autologous preconditioned mesenchymal stem cell sheets improve left ventricular function in a rabbit old myocardial infarction model. American Journal of Translational Research, 2016, 8, 2222-2233. (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 田中裕也、細山 徹、竹内由利子、河村大智、中村玉美、上野耕司、西本 新、森景則保、美甘章仁、濱野公一「低酸素プレコンディショニングにより機能増強した自己骨髄細胞シートによる心不全治療」第116回日本外科学会定期学術集会 2016年大阪国際会議場/リーガロイヤルホテル大阪(大阪府大阪市)
2. 田中裕也、細山 徹、竹内由利子、河村大智、中村玉美、上野耕司、西本 新、森景則保、美甘章仁、濱野公一「低酸素プレコンディショニングで機能増強した自己骨髄細胞シートによる心不全治療(ポスター)」第15回日本再生医療学会総会 2016年大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

白澤 文吾 (SHIRASAWA, Bungo)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 8 0 4 4 4 7 1 9

(2)研究分担者

蔵澄 宏之 (KURAZUMI, Hiroshi)
山口大学・医学部・特別医学研究員
研究者番号: 5 0 6 4 5 1 1 6

(3)研究分担者

末廣 晃太郎 (SUEHIRO, Kotaro)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 1 0 5 6 9 3 1 2