

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19922

研究課題名(和文)Cardiosphere由来細胞シートは陳旧性心筋梗塞治療に有効か？

研究課題名(英文)Is transplantation of cardiosphere-derived cell sheet useful as novel therapeutic strategy for old myocardial infarction.

研究代表者

藏澄 宏之(KURAZUMI, Hiroshi)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：50645116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：虚血性心不全に対する根本的治療法は心臓移植のみであり、慢性的なドナー不足の我が国において、代替治療法の早期開発が望まれる。本研究では、心筋幹細胞の一種である cardiosphere-derived cell (CDC) と近年注目されている細胞シート技術の併用により作製した CDC シートの心不全治療における有用性についてマウス心筋梗塞モデルを用いて検証した。その結果、CDC シートはその高い血管新生因子産生能により虚血心における効果的な血管新生誘導をもたらした。また、左室駆出率など左室機能の著しい回復が認められた。ゆえに、CDC シートの自家移植は虚血性心不全に対する効果的治療法となり得る。

研究成果の概要(英文)：Heart transplantation is only therapeutic approach to completely cure heart failure patients with severe myocardial infarction. However, donor shortage is severe in our country, and alternative therapeutic strategies to heart transplantation is anxious to be developed as soon as possible. In this study, I focused on cardiosphere-derived cell (CDC), which is subtype of cardiac stem cell in postnatal heart, and cell sheet technology, which is paid most attention in regenerative medicine, to investigate if CDC sheet was useful as novel therapeutic tool for severe myocardial infarction. As a result, CDC sheet resulted in effective angiogenesis in infarcted heart by its potential to highly express multiple angiogenic factors and in an improvement of left ventricular functions after transplantation. These result encouraged us to conclude that autologous transplantation of CDC sheet will surely become effective therapeutic approach for severe myocardial infarction.

研究分野：心臓外科

キーワード：細胞移植治療 cardiosphere由来細胞 細胞シート

1. 研究開始当初の背景

(1) Cardiosphere-Derived Cell (CDC)

近年の医療技術の目覚ましい発展にも関わらず心筋梗塞などの虚血性心疾患の根治には至っていない。とりわけ心筋梗塞の虚血性心筋症は心不全の原因となるが、根本的な治療法は心移植のみであり、慢性的ドナー不足の日本において、移植に代わる効果的な治療法の早期確立が望まれる。細胞移植療法は、「壊死した心筋細胞や心血管細胞の補充」や「移植細胞のパラクライン効果による血管新生の促進」などにより虚血心臓の再生を促す方法であり、陳旧性を含む心筋梗塞に対する有効な治療戦略の一つとして期待されている。これまでに移植細胞として用いられてきた細胞種には、骨髄由来細胞や血管内皮細胞、心筋前駆細胞、ES 細胞由来心筋細胞や骨格筋芽細胞などがあり、これらの細胞はいずれも心筋梗塞の動物モデルを用いてその効果が証明されている。

我々の研究グループは、心筋前駆細胞を含む細胞塊 (Cardiosphere) を由来とする Cardiosphere-Derived Cells (CDC) (Smith et al., *Circulation*. 2007) に注目し心筋梗塞治療に対する CDC の有用性について検討してきた (Kurazumi et al., *PLoS One*. 2011)。特に、Cardiosphere および CDC が障害心における移植細胞の生存や維持に重要な細胞外基質や細胞接着分子を高発現している (= 生存に適した微小環境を CDC 自ら作り出せる) ことは、心筋梗塞治療におけるこの細胞の有用性を強く示唆している (Li et al., *Stem Cells*. 2010)。ヒト心臓から調整した CDC による心筋梗塞に対する臨床試験が米国で開始された事実は、この細胞の有用性と重要性を裏付けるものである (Makkar et al., *Lancet*. 2012)。

(2) 細胞移植と細胞シート

細胞移植療法における重大な問題点として、「細胞の移植後生着率の低さ」が挙げられる。細胞を心臓に直接注入した場合の生着率が低く、移植24 時間後に大部分の細胞は死滅してしまう。例えば、CDC の梗塞心での生着率は5%程度である (Cheng et al., *Biomaterials*. 2012)。細胞を長期に渡り移植部位に留ませる方法の一つとして、細胞を基質 (マトリックス) に包埋し移植することが考えられる。実際、疎水性マトリックスに CDC を包埋しマウス急性心筋梗塞モデルへ移植することで生着率が7 倍増加している。この結果は、マトリックスを用いた方法の効果を実証するものであり、今後へ期待を抱かせる (Cheng et al., *Biomaterials*. 2012)。しかし、陳旧性心筋梗塞では広範囲に渡る癒痕を生じる為にマトリックスを用いた方法では全域をカバーできず、本手法はあくまでも局所移植を前提とした急性期のケースに限定される。一方、近年再生医療領域で大きな注目を集める「細胞シート」は、移植細胞をシート状に配列し

患部全体を覆うように張り付けることから、梗塞心における移植細胞の「生着率の向上」と「広範囲に渡る生着」を可能にする (Masumoto et al., *Stem Cells*. 2012)。すなわち本手法は、癒痕化した陳旧性心筋梗塞に対して強力な治療ツールとなり得る。

2. 研究の目的

研究背景に記載したとおり、CDC が心筋梗塞治療に有用であり、更に細胞シート技術を応用することによって広範囲に渡る CDC 移植が可能であることは明白である。しかし、これまでに CDC と細胞シート技術とを併用し陳旧性心筋梗塞モデルでその効果を検証した報告はなく、早急な検討が必要である。そこで本研究では、「CDCシートが相乗効果を発揮し、陳旧性心筋梗塞治療において効果を発揮する」ことを証明する。

3. 研究の方法

(1) Cardiosphere-derived cell (CDC) の単離

ヒト CDC は山口大学医学部附属病院にて心臓手術を受けた患者の右心房組織より単離した (Smith et al., *Circulation*. 2007)。本臨床研究は、山口大学医学部附属病院治験及び人を対象とする医学系研究等倫理審査委員会により承認 (No.2010025) を得て実施し、被験者本人に口頭および文書による十分な説明を行い、本人あるいは同意補助者の自由意志による同意を文書で得た後に研究を実施した。研究実施に関わるデータ類および同意文書等は、匿名化を図るために識別番号でデータ識別を行うなど、被験者の秘密保護には十分配慮し実施した。

また全ての動物試験は、山口大学動物使用委員会の承認を受け実施した (No. 31-089)。

(2) CDC シートの作製

マウスおよびヒト CDCs を用いた細胞シート (CDC シート) の作製には温度応答性培養皿 (CellSeed 社) を用い、CDC 播種 4 日後に細胞シートを剥離し、形態学的解析および培養上清中の細胞増殖因子濃度等を測定した。

(3) ELISA

細胞シートより分泌される細胞増殖因子を同定する為に、VEGF、HGF、IGF-I、bFGF、および MMP2 の培養上清濃度を ELISA により測定した。

(4) 陳旧性心筋梗塞モデルの作製とシート移植

開胸したマウスの冠動脈左前下行枝を縫合系で結紮し (LAD ligation) 4 週間後に心エコー (VeVo770; Visual Sonics 社) により左室駆出率 (LVEF) および左室内径短縮率

(LVFS)を測定した。それぞれ 40%および 20%程度まで減少したマウス個体を陳旧性心筋梗塞モデルとして使用した。

LAD ligationを施し4週間後のマウス梗塞心にマウス CDC シートを貼付した。この際、シートのキャリアとしてセプラフィルム(科研製薬)を用い、セプラフィルムにシートを載せた状態でそのまま梗塞部へ貼付した。シート貼付4週間後にLVEF および LVFS、梗塞辺縁部の血管新生について、シート非貼付群と比較した。

(5) 統計解析

統計解析にはSPSS Statistics 20(IBM社)を用い、シート貼付および非貼付群の2群間における解析は Student's t-test で行った。P<0.05 を統計的に有意な差とした。

4. 研究成果

(1) CDC の単離と CDC シートの作製

まずヒト右心房組織から CDC を従来法 (Smith et al., *Circulation*. 2007) により単離し、CDC のマーカーである CD90、CD105、c-kit の発現について、Flow cytometry および免疫蛍光染色により確認した。また、CDC の特徴である心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞などへの多分化能について *in vitro* で確認した。その結果、これまでの報告同様に、CD90、CD105、c-kit の高い発現を認め、また多分化能についても確認された。これらの結果は、CDC が正常に単離できていることを示している。

続いて、単離したヒト CDC を用いて CDC シートの作製に取り掛かった。細胞シートの作製には温度応答性培養皿を用い、細胞播種4日後に培養皿を約 20℃まで冷やし、自然剥離してきた細胞シートを固定後にヘマトキシリン・エオジンにて染色し形態学的な評価を行った。結果、ヒト CDC シートは温度応答性培養皿を用いることにより、問題なく作製可能であることが確認された (Fig. 1A)。さらに、CDC シートから分泌される細胞増殖因子を同定する為に ELISA を実施した。その結果、CDC シートからは HGF、VEGF、IGF-I といった血管新生や細胞増殖を促す種々の細胞増殖因子が分泌されることが明らかとなった。また、細胞外マトリックスに対する消化酵素の一種である MMP2 の分泌も認め、梗塞心における Scar 消化における

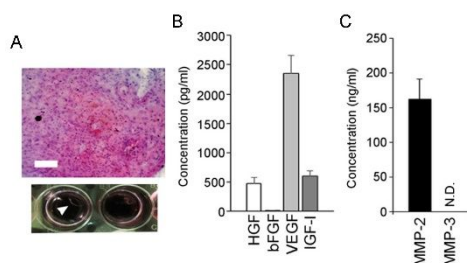


Fig. 1. CDCシートの作製と液性因子分泌能の検証 (A) 温度応答性培養皿で作製したCDCシートのH&E染色像(上)と剥離した細胞シート(下) (B) 培養上清中の種々の細胞増殖因子 (C) 培養上清中のマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs)

効果も期待される (Fig. 1B, C)。

(2) CDC シートのマウス陳旧性心筋梗塞モデルへの貼付とその治療効果の検証

冠動脈左前下行枝を結紮し作製したマウス陳旧性心筋梗塞モデル(結紮4週間後)の梗塞部へ、マウス CDC シートをセプラフィルムに載せた状態で貼付した (Fig. 2A)。

細胞シート貼付前と4週間後に、心エコーによりLVEF および LVFS を測定し、シート貼付による左室駆出率・左室内径短縮率の変化を測定した。その結果、いずれのパラメータも有意な改善が認められた (Fig. 2B)。このことは、CDC シート移植により心機能が回復していることを意味している。

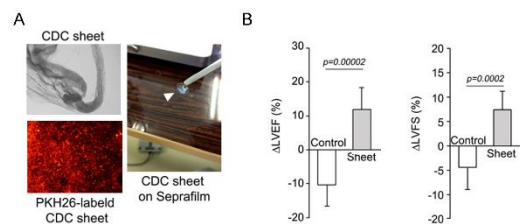


Fig. 2. CDCシートの貼付とシート貼付後の左室機能の変化率 (A) 作製したCDCシートとセプラフィルムへの貼り付け (B) シート移植4週間後の左室駆出率 (LVEF) と左室内径短縮率の変化

続いて、陳旧性心筋梗塞モデルへのマウス CDC シート貼付による、梗塞辺縁部における血管新生効果についても検討した。シート貼付4週間後に心臓をサンプリングし、薄切切片上で血管内皮に対する免疫蛍光染色を行い、シート貼付による血管新生効果について評価した。その結果、シート貼付により梗塞辺縁部の血管数が増加していることが明らかとなった (Fig. 3A)。先の検討において、CDC シートから血管新生因子や細胞増殖促進因子が分泌されることが認められていることから、これらの因子が梗塞心における積極的な血管新生効果を生んだと予想される。さらに興味深いことに、CDC シート移植は梗塞心の scar サイズを減少させることも明らかとなった (Fig. 3B)。これは、CDC シートの有する MMP2 分泌能によるものと予想される。

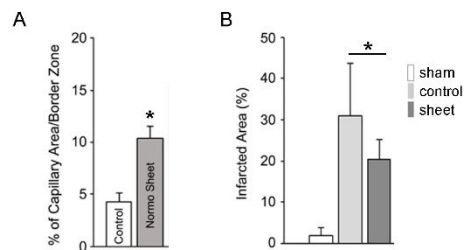


Fig. 3. CDCシート移植後の梗塞心での血管新生および梗塞部面積 (A) CDCシート移植4週間後のボーダーゾーンの血管密度の比較 (B) CDCシート移植4週間後の梗塞部面積の比較 *P<0.05

(3) まとめ

本研究により、心筋幹細胞のサブタイプである Cardiosphere-derived cell を用いて細胞シートが作製可能であることが示され、さらに、この CDC シートが重症心不全に対して高い治療効果を有することが明らかとなった。今後は、より人に近いモデル動物を用いた前臨床試験を経て、早期の臨床応用を目指す。

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0件)

〔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0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

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：50645116

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし