

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08761

研究課題名(和文) 低酸素刺激を併用した心筋幹細胞シート移植による重症心不全治療法の開発

研究課題名(英文) Hypoxic-conditioned cardiosphere-derived cell sheet transplantation for congestive heart failure.

研究代表者

美甘 章仁 (Mikamo, Akihito)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30372709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：超高齢社会である本邦の心不全は160万人になる。重症心不全に対する心移植はドナー不足などの問題から普及に至らず、幹細胞を用いた細胞移植療法が期待されてきた。近年の研究から移植した幹細胞が心臓組織へ生着することは稀であり、分泌される成長因子が心機能改善効果の主因だと判明した。心不全に対する細胞移植療法の最適化は喫緊の課題である。本研究では、中型動物であるウサギの陳旧性心筋梗塞モデルに心筋幹細胞(CDC)シートを移植し、効果を検証した。また、低酸素刺激による細胞シートの機能賦活化も検討した。結果、これらによって有意な心機能改善が得られると分かり、パラクライン作用による血管新生が機序と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症心不全に対する治療法に心臓移植があるが、ドナー不足や移植後の免疫抑制に伴う問題を考えると現実的ではない。不全心に幹細胞などを移植する細胞移植療法が期待されている。移植細胞を長期間、留ませる方法として“細胞シート技術”が注目されてきた。シート化した細胞を患部に移植でき、広範囲に及ぶ心筋の壊死や線維化にも対応し得る。また、我々は移植細胞の血管新生能や酸化ストレス抵抗性、組織生着性を向上させる“低酸素プレコンディショニング法”を独自に開発した。本研究は、“移植前に細胞を低酸素培養する”というシンプルな方法であり、臨床現場で求められる“スピード”や“簡便さ”を解決し得る。

研究成果の概要(英文)：There are 1.6 million of patients with heart failure in Japan. Cardiac transplantation is not a common therapeutic option due to shortage of donor hearts. Alternatively, the transplantation of stem cells to failing heart has been studied in order to develop a future therapeutic strategy. Recently, paracrine factors, such as growth factors, from stem cells mainly improve the cardiac function rather than their direct maturation to cardiac muscles. We investigated the hypoxic-conditioned cardiosphere-derived cell (CDC) sheet transplantation for old myocardial infarction model of rabbit and found that this strategy effectively improved the cardiac function, partially through angiogenesis in a paracrine manner.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：心筋幹細胞(CDC) 心筋梗塞 慢性心不全 低酸素プレコンディショニング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会である我が国の心不全は(潜在的な患者を含めると)160万人にのぼり、うち半数は虚血性心疾患によるとされる。重症心不全に対する心移植はドナー不足などの問題から普及には至らず、幹細胞を用いた細胞移植療法が期待されてきた。細胞を移植部位に留まらせる方法として細胞シート技術が確立され、現在はiPS細胞由来心筋細胞や骨格筋芽細胞を用いた細胞シート移植が積極的に研究されている。一方で、移植細胞による腫瘍形成、細胞の準備にかかる費用と時間などは課題であり、これらに対する解決策が必要である。また、近年の研究から移植した幹細胞が心臓組織へ生着することは稀であり、これらが心筋細胞へ分化することよりもむしろ、分泌される成長因子やエクソソームが心機能改善効果の主因であることが判明した。

当研究室は心筋幹細胞(cardiosphere-derived cell(CDC))の研究において長年の実績があり、CDCシート移植が小型動物の陳旧性心筋梗塞モデルにおいて心機能を有意に改善することを報告してきた。低酸素プレコンディショニングなど、幹細胞の機能賦活化に関する研究においても実績がある。また、CDCは成長因子やエクソソームの分泌能に優れることが知られている。

2. 研究の目的

本研究では、中型動物であるウサギの陳旧性心筋梗塞モデルにおいてCDCシートが心機能改善効果を示すか否かを検証する。小型動物では困難であった詳細な検討を、CDCの機能賦活化を併用して行う。

3. 研究の方法

(1). 低酸素刺激を併用した積層化 CDC シートの機能賦活化の検証

a. ウサギ心筋幹細胞の単離と細胞シート作製

ウサギ心筋幹細胞は、雄の New Zealand White Rabbit種の心臓組織片からCardiosphere を得る方法で調整した(*Circulation*. 2007; 115:896-908.)。CDCの精製度は、Fluorescent-Activated Cell Sorting (FACS) 解析によるc-kitおよびSca-1発現で確認し、CDCシートを作製した。

b. 低酸素プレコンディショニングによる積層化CDCシートの機能賦活化の検証

①細胞濃度、②低酸素期間といった至適条件を改めて検討するため、培養上清中のVEGF濃度をEnzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法で測定した。また、積層化・低酸素刺激を併用することで、apoptosis誘導などの悪影響がないかを検証した。具体的には、Caspase等のapoptosis誘導シグナルの活性化とapoptosisの発生をSub G1解析を用いて検証した。

(2). 積層化CDCシートの血管新生能の評価

Huvec細胞に低酸素刺激により機能賦活化した積層化CDCシートの培養上清を添加し、血管新生能を評価した。

(3). ウサギ同系移植モデルを用いたCDCシートの心機能改善効果

a. ウサギ陳旧性心筋梗塞モデルの作出

左冠動脈結紮により心筋梗塞モデルを作製した。冠動脈結紮処置後に心エコー検査を行った。処置前のウサギの左室駆出率(LVEF)は概ね60-70%であり、処置後にLVEFが 40-50% まで低下しているウサギをモデルとして移植実験に用いた。

b. 機能賦活したCDCシートの梗塞心への同系移植と治療効果の検証

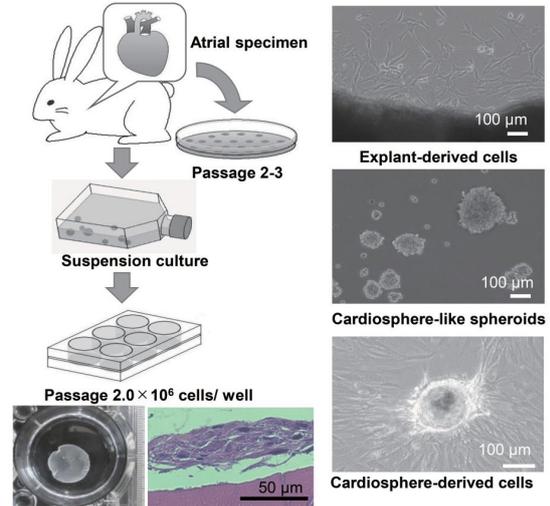
移植実験に用いる群は、①Sham群、②低酸素刺激により機能賦活化したウサギ積層化CDCシート群とした。治療効果については以下の項目で評価・比較した。

- ・心エコー評価：LVEFと左室内径短縮率（LVFS）を算出し比較した。
- ・組織学的評価：線維化率をBZ-II 解析ソフトウェア（キーエンス）を用いて算出、比較した。

4. 研究成果

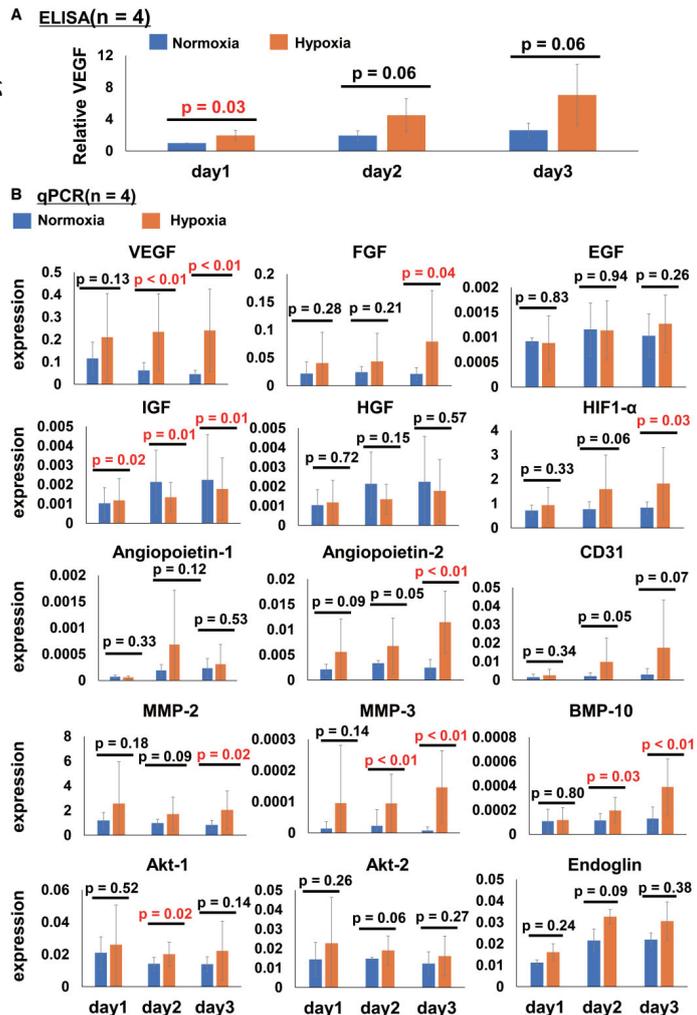
(1) ウサギ心臓の左房より CDC を単離、培養した。FACS で CDC の主要な膜蛋白の発現を確認した。

(右図は Fujita et al. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2019 より引用)



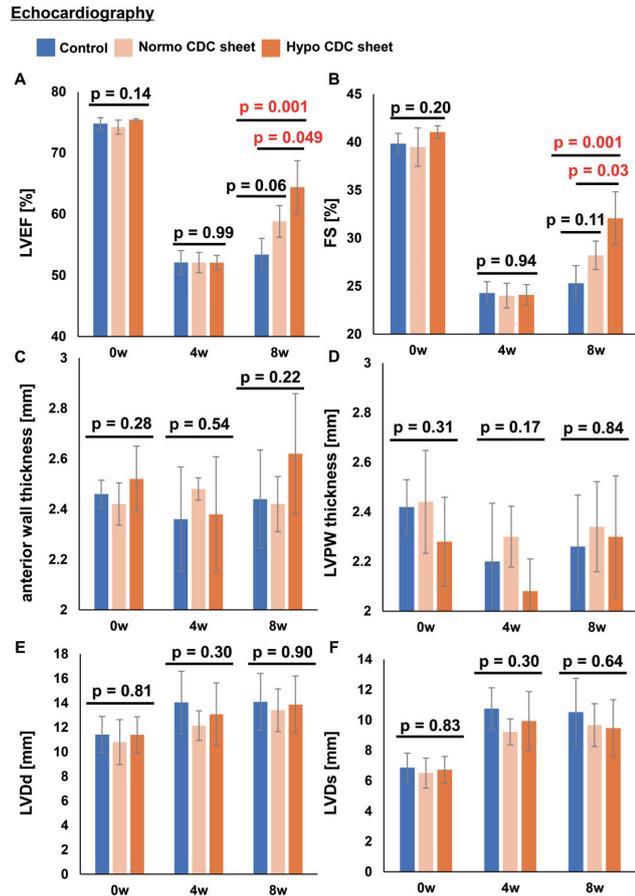
(2) 低酸素プレコンディショニングによる積層化 CDC シートの機能賦活化を検証した。VEGF を含む様々な成長因子の発現が増強することを確認した。また、TUNEL 染色で細胞死が有意に増加していないことを確認した。

(右図は Fujita et al. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2019 より引用)



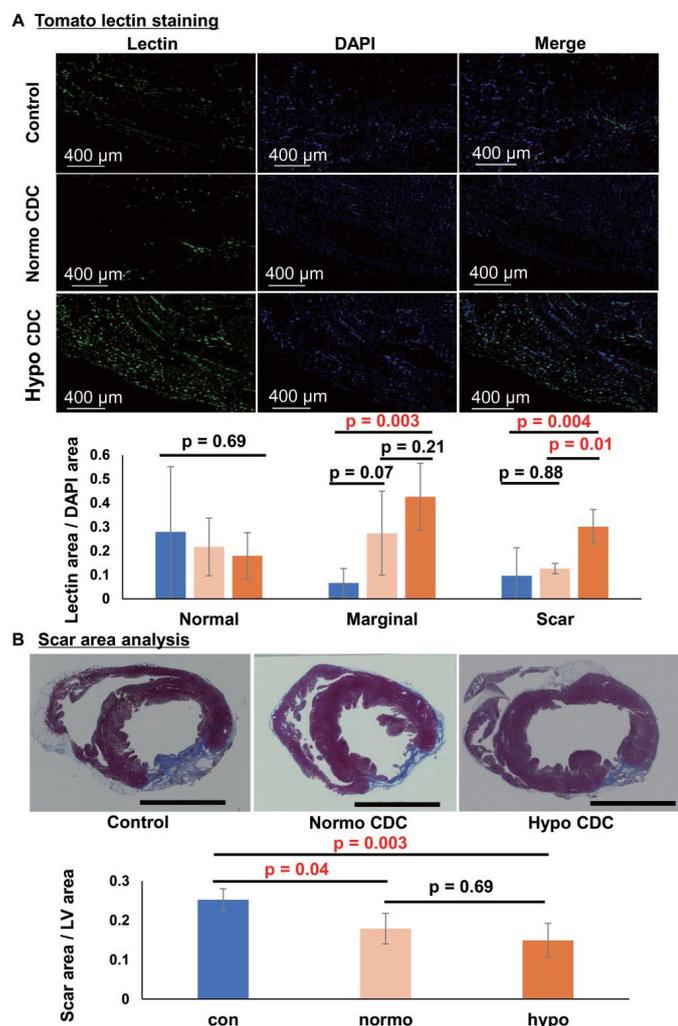
(3) ウサギ陈旧性心筋梗塞モデルを作出し、機能賦活したCDCシートの梗塞心へ同系移植して治療効果を検証した。低酸素で機能賦活化した CDC シートにより、心エコー上の心機能の改善を認めた。

(右図は Fujita et al. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2019 より引用)



(4) ウサギ心臓を組織学的に解析したところ、CDCシートにより血管新生が増強し、梗塞後の癒着化が抑制されていた。

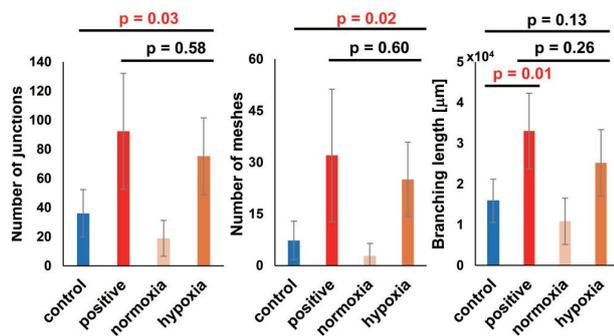
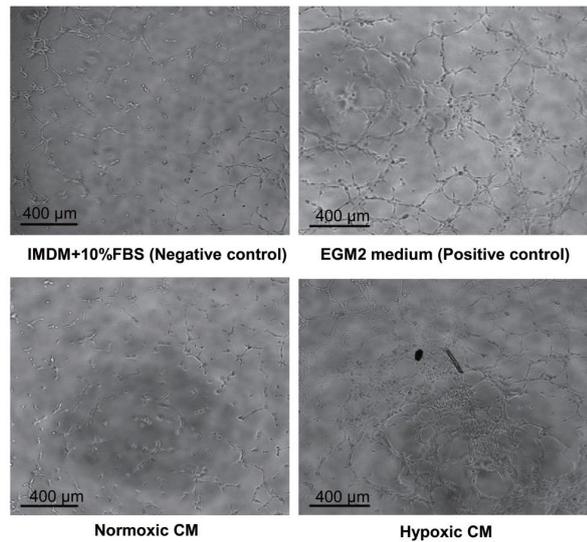
(右図は Fujita et al. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2019 より引用)



(5) Huvec細胞に低酸素刺激で機能賦活化した積層化CDCシートの培養上清を添加し血管新生能を評価した。CDCシートはパラクライン作用で血管新生を促すことが分かった。

(右図はFujita et al. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2019 より引用)

Tube formation assay



(6) 結論

中型動物であるウサギの陳旧性心筋梗塞モデルにおいて CDC シートが心機能改善効果を示した。パラクライン作用による血管新生が機序の一部と思われる。

<引用文献>

- Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens
Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, Giacomello A, Abraham MR, Marbán E. *Circulation.* 2007; 115:896-908.

• Hypoxic-conditioned cardiosphere-derived cell sheet transplantation for chronic myocardial infarction.

- Fujita A, Ueno K, Saito T, Yanagihara M, Kurazumi H, Suzuki R, Mikamo A, Hamano K. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2019; 56:1062-1074.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki R, Mikamo A, Matsuno Y, Fujita A, Kurazumi H, Yamashita A, Hamano K.	4. 巻 25(6)
2. 論文標題 Effect of Autotransfusion Using Intraoperative Predonated Autologous Blood on Coagulopathy during Thoracic Aortic Surgery: A Randomized Controlled Trial.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Thorac Cardiovasc Surg	6. 最初と最後の頁 311-317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5761/atcs.oa.19-00106.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujita A, Ueno K, Saito T, Yanagihara M, Kurazumi H, Suzuki R, Mikamo A, Hamano K.	4. 巻 56(6)
2. 論文標題 Hypoxic-conditioned cardiosphere-derived cell sheet transplantation for chronic myocardial infarction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Cardiothorac Surg	6. 最初と最後の頁 1062-1074
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ejcts/ezz122.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki R, Mikamo A, Matsuno Y, Fujita A, Kurazumi H, Okada M, Hamano K.	4. 巻 108(1)
2. 論文標題 Endovascular Treatment of Intercostal Artery Aneurysm Associated With Aortic Coarctation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Thorac Surg	6. 最初と最後の頁 e51-e52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.athoracsur.2019.01.052.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saito Toshiro, Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Matsuno Yutaro, Mikamo Akihito, Hamano Kimikazu	4. 巻 15
2. 論文標題 Preserving the endothelium in saphenous vein graft with both conventional and no-touch preparation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cardiothoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13019-020-01352-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Tamami, Mikamo Akihito, Matsuno Yutaro, Fujita Akira, Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Hamano Kimikazu	4. 巻 30
2. 論文標題 Impact of acute kidney injury on prognosis of chronic kidney disease after aortic arch surgery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 273-279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/icvts/ivz247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Akira, Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Takahashi Masaya, Mikamo Akihito, Hamano Kimikazu	4. 巻 4
2. 論文標題 Relief of vasospasm with fasudil after off-pump coronary artery bypass grafting: a case study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Surgical Case Reports	6. 最初と最後の頁 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40792-018-0481-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tateishi Hiroki, Miyazaki Yosuke, Okamura Takayuki, Abdelghani Mohammad, Modolo Rodrigo, Wada Yasuaki, Okuda Shinichi, Omuro Ayumi, Ariyoshi Toru, Fujii Ayano, Oda Tetsuro, Fujimura Tatsuhiro, Nanno Takuma, Mikamo Akihito, Soliman Osama I.I., Onuma Yoshinobu, Hamano Kimikazu, Yano Masafumi, Serruys Patrick W.	4. 巻 82
2. 論文標題 Inter-Technique Consistency and Prognostic Value of Intra-Procedural Angiographic and Echocardiographic Assessment of Aortic Regurgitation After Transcatheter Aortic Valve Implantation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 2317 ~ 2325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-17-1376	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tateishi Hiroki, Miyazaki Yosuke, Okamura Takayuki, Modolo Rodrigo, Abdelghani Mohammad, Soliman Osama I.I., Oda Tetsuro, Mikamo Akihito, Onuma Yoshinobu, Hamano Kimikazu, Yano Masafumi, Serruys Patrick W.	4. 巻 82
2. 論文標題 Role of Computed Tomography in Planning the Appropriate X-Ray Gantry for Quantitative Aortography of Post-transcatheter Aortic Valve Implantation Regurgitation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 1943 ~ 1950
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-17-1375	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishiguchi Hironori, Kobayashi Shigeki, Okuda Shinichi, Okamura Takayuki, Okada Munemasa, Takemura Genzou, Takahashi Masaya, Mikamo Akihito, Hamano Kimikazu, Yano Masafumi	4. 巻 82
2. 論文標題 Localized Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy Complicated With Shower Emboli Originating From Apical Intramural Thrombi	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 2375 ~ 2376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-17-1231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤田 陽、上野耕司、松野祐太郎、藏澄宏之、鈴木 亮、美甘章仁、濱野公一
2. 発表標題 低酸素下培養によるCardiosphere-derived cells sheet移植の血管新生効果の基礎的検討
3. 学会等名 第49回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田 陽、上野耕司、松野祐太郎、藏澄宏之、鈴木 亮、美甘章仁、濱野公一
2. 発表標題 ラビット陳旧性モデルに対する低酸素培養刺激CDCシートの治療効果の検討
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藏澄宏之、美甘章仁、松野祐太郎、藤田 陽、鈴木 亮、高橋雅弥、池永 茂、濱野公一
2. 発表標題 AVJ plication前後の大動脈弁輪の形態変化に関する検討 (ポスター)
3. 学会等名 第49回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松野祐太郎、美甘章仁、藤田 陽、藏澄宏之、鈴木 亮、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 当科における心臓血管外科周術期感染対策下での透析患者におけるDSWIの検討(ポスター)
3. 学会等名 第49回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田 陽、美甘章仁、松野祐太郎、藏澄宏之、鈴木 亮、濱野公一
2. 発表標題 急性A型大動脈解離における ' Total Archi First ' の治療成績の検討(ポスター)
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松野祐太郎、美甘章仁、藤田 陽、藏澄宏之、鈴木 亮、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 当院における心臓血管外科術後のDSWI発症予防と治療戦略(ポスター)
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 亮、美甘章仁、松野祐太郎、藤田 陽、藏澄宏之、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 大動脈弁狭窄症に対する経カテーテル大動脈弁置換術の適応を拡大すべきか
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松野祐太郎、美甘章仁、藤田 陽、藏澄宏之、鈴木 亮、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 心筋梗塞後心室隔穿孔に対する3次元infarct exclusion法の治療成績
3. 学会等名 第78回山口県臨床外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松野祐太郎、美甘章仁、藤田 陽、藏澄宏之、鈴木 亮、森景則保、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 若年者の胸腹部解離性大動脈瘤に対するEVAR completionの1例
3. 学会等名 第62回関西胸部外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 亮、美甘章仁、松野祐太郎、藤田 陽、藏澄宏之、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 慢性透析患者に対する単独冠動脈バイパス術の治療成績
3. 学会等名 第62回関西胸部外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松野祐太郎、美甘章仁、藤田 陽、藏澄宏之、鈴木 亮、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 心筋梗塞後心室中隔穿孔に対する3-dimensional infarction exclusion法の当科における治療成績
3. 学会等名 第24回日本冠動脈外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藏澄宏之、美甘章仁、松野祐太郎、藤田 陽、鈴木 亮、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 80歳以上の高齢者に対する単独冠動脈バイパス術の治療成績
3. 学会等名 第24回日本冠動脈外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 亮、美甘章仁、松野祐太郎、藤田 陽、藏澄宏之、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 慢性腎不全患者に対する冠動脈バイパス術の治療成績
3. 学会等名 第24回日本冠動脈外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 亮、美甘章仁、松野祐太郎、藏澄宏之、濱野公一
2. 発表標題 心房中隔欠損症に対し完全内視鏡下心房中隔欠損症パッチ閉鎖術を行った2例
3. 学会等名 第94回中国四国外科学会総会・第24回中国四国内視鏡外科研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木亮、美甘章仁、松野祐太郎、藤田陽、藏澄宏之、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 弓部大動脈瘤に対する弓部大動脈人工血管全置換術の治療成績
3. 学会等名 第72回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藏澄宏之、美甘章仁、松野祐太郎、鈴木亮、濱野公一
2. 発表標題 Conventional MICS AVRの1例
3. 学会等名 第115回日本循環器学会中国地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松野祐太郎、美甘章仁、藏澄宏之、鈴木亮、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 HOCMに伴うMRIに対して胸腔鏡補助下右小開胸経僧帽弁の中隔心筋切除と僧帽弁形成術を施行した1例
3. 学会等名 第115回日本循環器学会中国地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝口高弘、上野耕司、竹内由利子、佐村 誠、森景則保、美甘章仁、濱野公一
2. 発表標題 難治性皮膚潰瘍に対するフィブリン糊を用いた末梢血単核球と線維芽細胞から成る混合細胞移植（ポスター）
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田 陽、上野耕司、松野祐太郎、中村玉美、藏澄宏之、鈴木 亮、美甘章仁、濱野公一
2. 発表標題 ウサギ陳旧性心筋梗塞モデルを用いた貼付前低酸素培養Cardiosphere-sphere derived cells sheetによる心不全治療効果の検討
3. 学会等名 第71回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田 陽、上野耕司、松野祐太郎、藏澄宏之、鈴木 亮、美甘章仁、濱野公一
2. 発表標題 低酸素下培養によるCardiosphere-derived cells sheet移植の血管新生効果の基礎的検討
3. 学会等名 第49回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田 陽、上野耕司、松野祐太郎、藏澄宏之、鈴木 亮、美甘章仁、濱野公一
2. 発表標題 ラビット陳旧性モデルに対する低酸素培養刺激CDCシートの治療効果の検討 (ポスター)
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	濱野 公一 (Hamano Kimikazu) (60263787)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	
研究分担者	中村 玉美 (Nakamura Tamami) (40815669)	山口大学・医学部附属病院・診療助教 (4日/週) (15501)	
研究分担者	鈴木 亮 (Suzuki Ryo) (10570319)	山口大学・医学部附属病院・助教 (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------