

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19300175
 研究課題名（和文） 再生医療による致死的不整脈発生機序解明と予防策と再生医療の不整脈治療への応用
 研究課題名（英文） Management of proarrhythmias according to the cardiac stem cell therapy.
 研究代表者
 三好 俊一郎（MIYOSHI SYUNICHIRO）
 慶應義塾大学・医学部・講師
 研究者番号：10296577

研究成果の概要：

心臓分野での再生医療の実現に向けて、ヒト間葉系幹細胞を用いた研究を行った。ヒト間葉系幹細胞の心筋分化能力を改善させ、それにより移植時の治療効果改善効果を目指す研究を行った。また同時に、心臓再生医療で重大な問題となる催不整脈性についての検証を行い、新筋再生の能力が高まれば電氣的に安定し、催不整脈性の心配は減じる可能性が考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード： Cell sheet stem cell human gene arrhythmia

1. 研究開始当初の背景

心臓分野での再生医療において、ヒト間葉系幹細胞の、心筋誘導の低さおよび移植時の不整脈の可能性が否定出来なかった。

2. 研究の目的

ヒト間葉系幹細胞を用いた心筋再生療法における、心筋誘導効率の改善・予想される催不整脈性の機序解明・およびその対応を行う。

3. 研究の方法

（1）ヒト由来間葉系幹細胞（骨髄・月経血・子宮内膜・胎盤・羊膜・臍帯血等）由来心筋細胞の誘導法の違いによる活動電位変化・経

時的変化を観察する。

（2）ヌードラット心筋梗塞モデルへのヒト間葉系幹細胞の移植を行い心機能改善効果、移植細胞の心筋への分化能力判定、催不整脈性を検証する

（3）心筋誘導アッセイを用いた high output in vitro スクリーニングモデル(特許 WO2006/078034)を用いて、ヒト由来間葉系幹細胞の心筋分化誘導効率を改善し、催不整脈性をも改善する。

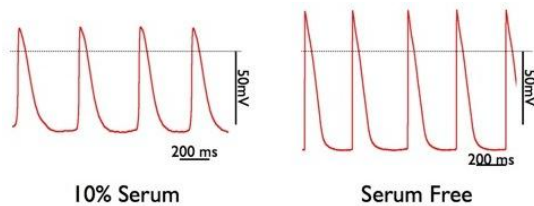
（4）ヒト間葉系幹細胞シートをヌードラットへ移植し、生着効率及び心筋分化誘導効率を評価し、心筋への分化誘導効率及び生着効

率のもっとも高い移植方法を検証する。

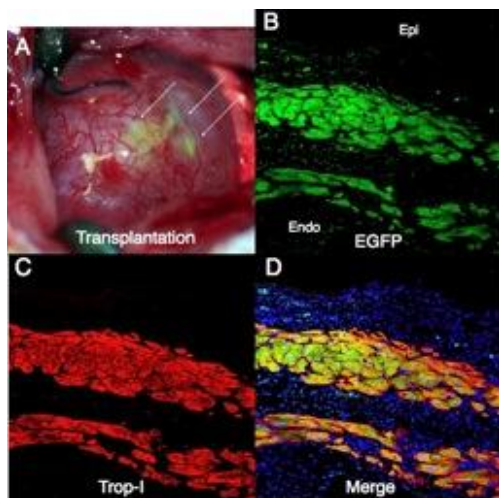
(5) 徐脈性不整脈動物モデルを作製し、細胞シートによって作製したヒト間葉系細胞シートを用いて徐脈性不整脈の治療の可能性を示す。

4. 研究成果

(1) ヒト骨髄(0.3%)・月経血(30%)・子宮内膜(90%)・胎盤(13%)・羊膜(40%)・臍帯血(40%)等由来間葉系幹細胞から心筋を誘導した(括弧内は心筋誘導効率)。誘導した心筋細胞から活動電位を記録すると、記録された活動電位の、電気的安定性は、心筋誘導効率に比例して増加した。また培養中の血清内には多くの血小板由来因子が存在し、それらが心筋活動電位を大きく変形させる可能性が考えられる。そのため我々は、心筋細胞用無血清培地を使用し、心筋誘導を行った所、心筋誘導効率の改善と活動電位の成熟と安定化を確認した。下図は、胎盤由来間葉系幹細胞を血清の存在する培地(左)および血清の存在しない培地で培養した際記録した活動電位である。静止膜電位が深く安定化し、より成熟した活動電位を示す様になる。

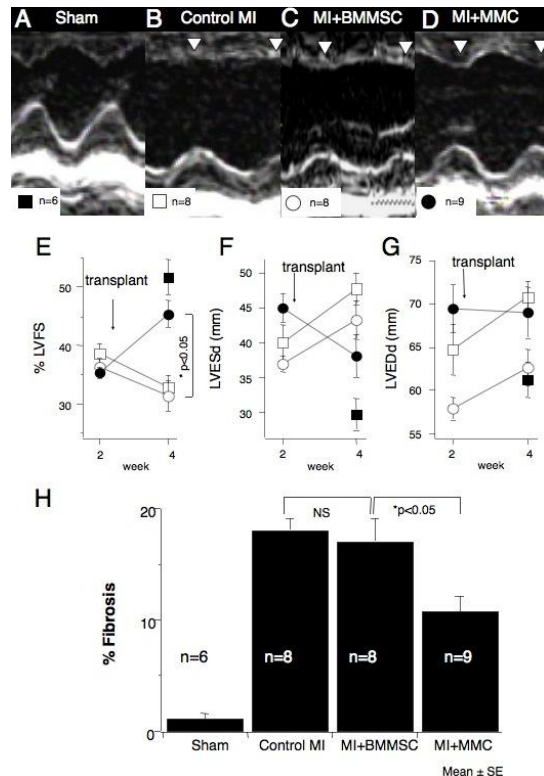


(2) ノードラット心筋梗塞モデルを作製し心臓超音波検査施行後にヒト骨髄間葉系幹細胞を移植した。移植2週間後に再度心臓超音波検査を施行し左室心機能の観察、左室内圧の測定、組織学的な検討による心筋繊維化巣(心筋梗塞巣)および移植した間葉系幹細胞の心筋への分化誘導を確認した。



ここではヒト月経血由来間葉系幹細胞移植した際のデータを記す。ヒト細胞にAdenoウイルスにてGFPにてマーキングを行う。(前図)心筋梗塞部にGFP陽性細胞を移植する(A;緑色)。2週間後に機能検査を終了後、免疫染色を行った所、左室心筋梗塞巣に、心筋へ分化した、GFP陽性ヒト月経血間葉系幹細胞が観察された(B,C,D Cは心臓トロポニン-I抗体での免疫染色像で、GFP陽性細胞がトロポニンで染色されている事が示されている)。

下に心臓超音波検査による移植直前と移植直後の左室心機能のデータを記す。

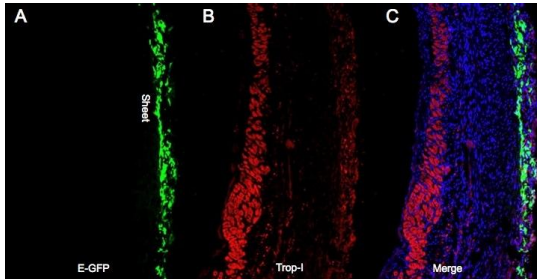


心筋梗塞非作製(Sham)、心筋梗塞のみ作製(Control MI)、骨髄間葉系幹細胞移植群(MI+BMMSC)とヒト月経血間葉系幹細胞移植群(MI+MMC)を記す。心筋誘導効率の違いと比例して、左室収縮率は骨髄と比して有意に増大し、心筋梗塞巣も有意に縮小した。またこの際心電図記録では明らかな不整脈や、経過中の突然死等は存在しなかった。たとえ心筋誘導効率が改善したとしても、成熟した心筋細胞から生じる不整脈性は強く無い物と確認された。

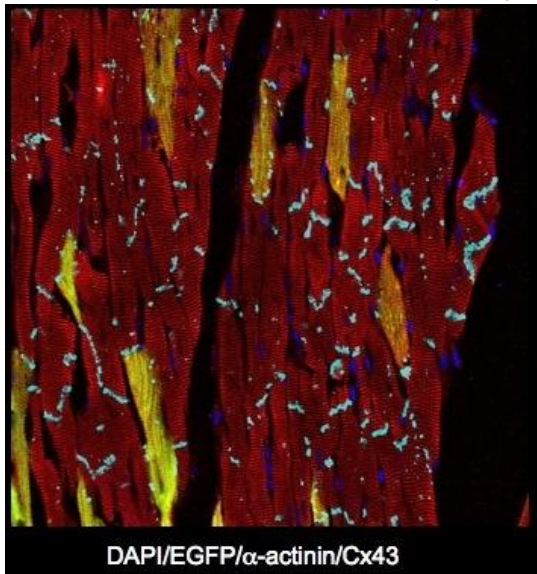
(3) invitro心筋誘導アッセイシステムを用いて、2種類の薬剤と2種類のサイトカインが心筋誘導効率を改善させる事を確認した。サイトカインについては、特許申請上の都合公開出来ないが、前者は, peroxisome proliferator activated receptor - gamma (PPAR -)活性化薬で、糖尿病治療薬として

知られる pioglitazone と、各種 Angiotensin receptor blocker (ARB)であった。Pioglitazone はヒト骨髄間葉系幹細胞の心筋誘導効率を 0.3%から 20-40%まで増加させ、ARB は 10%前後まで増加させる事が判明した。

(4) GFP 蛍光ラベルした月経血由来間葉系幹細胞シートをヌードラット心筋梗塞巣・心外膜面に移植し、2週間後に心臓摘出して心臓トロポニンIにて免疫染色にて観察した(下図)



移植した細胞は心臓表面に残存していたが、GFP 陽性細胞は、トロポニンIを発現しておらず、局所での心筋分化は生じていなかった。一方で、移植部位とは離れた部位で(下図)



心筋へ多数分化している像が確認できた(DAPI 青、GFP 緑、sarcomeric actinin 赤、connexin43 シアン)。元来、間葉系幹細胞は移動能があるといわれているが、移植したシート片から心筋内を移動して心筋に分化したか否かは、更なる検証が必要であろう。

(5) ヒト間葉系幹細胞シートは残念ながら今回の検討では局所では心筋にならず。そのため本検討は断念した。

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 12 件)

1. S Miyoshi(10/12), /Images in cardiovascular medicine. Pseudonormal position of an atrial pacemaker lead associated with a contralateral pneumothorax: where is the atrial lead? /Circulation /117(17)/;2297-2298, /2008/(査読あり)
2. N.Hida(1/17 巻頭表紙), S Miyoshi(3/17 Corresponding Au), /Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. /Stem Cells /26(7)/;1695-1704/2008/(査読あり)
3. 三好俊一郎(1/13 Corresponding Au)/, 骨髄以外のヒト間葉系細胞からの心筋分化/心電図 /28(3) /37-48, /2008/(査読無し)
4. 三好俊一郎(1/12 Corresponding Au), 肥田直子(8/12) /心筋再生と不整脈 心筋細胞シート移植片のホストとの電氣的同期現象 /心電図 /28(4) /309, /2008/(招待、査読なし)
5. S Miyoshi(2/12 Corresponding Au), /SHP2-mediated signaling cascade through gp130 is essential for LIF-dependent Ca^{2+} transient, and APD increase in cardiomyocytes. /J Mol Cell Cardiol /43(6):/710-6, /2007/(査読あり)
6. S Miyoshi(2/21), N.Hida(4/21), /'Working' cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells. /Exp Cell Res. /313(12): /2550-2562, /2007/(査読あり)
7. S Miyoshi(2/12 Corresponding Au), N.Hida(3/12), /The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. /Stem Cells. /25(8) /2017-2024, /2007/(査読あり)
8. S Miyoshi(10/16) /Sema3a maintains normal heart rhythm through sympathetic innervation patterning. /Nat Med. /13(5) /604-612, /2007/(査読あり)
9. S Miyoshi(1/6 Corresponding Au) /Cardiac cell therapy and arrhythmias. /Circ J /71; /A45-49, /2007/(査読あり)
10. S Miyoshi(6/9) /Application of mesenchymal stem cell-derived cardiomyocytes as bio-pacemakers: current status and problems to be solved. /Med Biol Eng Comput /45(2):/209-220, /2007/(査読あり)
11. 三好俊一郎(1/15 Corresponding Au), /心筋再生と不整脈 再生医療の将来と不整脈 /心臓 /39(11) /1017-1022,

- /2007 (招待、査読あり)
12. S Miyoshi(4/6) /Tissue engineering analyses of cell viability and metabolism in novel 3-dimensional tissues composed of multi-layered cell sheets/人工臓器 /36(2) /s14, /2007 / (査読あり)

〔学会発表〕(計 14 件)

1. S Miyoshi(3/17 Corresponding Au), /Human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cell acquired immune tolerance by HLA-G expression and differentiated into cardiomyocyte in vivo. /JACC /51(10); /A182, /2008/(シカゴ、2008年3月30日)
2. S Miyoshi(2/14 Corresponding Au), /Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells acquired immunologic tolerance and transdifferentiated into cardiomyocytes in vivo. /ESHRE 2008 /poster award 賞受賞(バルセロナ、2008年7月9日)
3. S Miyoshi(1/1) /Non marrow-derived human mesenchymal cells are promising cellular source for cardiac stem cell therapy. /韓国 Gwangju Boston /Joint Cardiology Symposium 2007 (South Korea/2007/11/17) (招待講演)
4. S Miyoshi(3/9 Corresponding Au) /Human Amniotic Membrane-derived Stem Cell with no HLA-DR Expression can be a Promising Cellular Source for Cardiac Stem Cell Therapy. /Circ J 71; 177, 2007(神戸、2007年3月15日)
5. S Miyoshi(2/14 Corresponding Au) /In Situ Cardiomyogenic Transdifferentiation Potential of Human Uterine Endometrium-derived Mesenchymal Cell. /Circ J 71; 299, 2007(神戸、2007年3月17日)
6. S Miyoshi(3/15 Corresponding Au), /Human Mesenchymal Stem Cell from Human Chorionic Villi is a New Cell Source for Autologous Cardiac Stem Cell Therapy. /Circ J 71; 464, 2007(神戸、2007年3月17日)
7. S Miyoshi(2/10 Corresponding Au), /Serum-independent Cardiomyogenic Differentiation in Human Endometrial-derived and Menstrual Blood-derived Mesenchymal Stem Cells for Drug Screening System. /Circ J 71; 466, 2007(神戸、2007年3月17日)
8. 三好俊一郎 (1/15 Corresponding Au), /

- 心筋再生と不整脈 /再生医療の将来と不整脈 / (頻拍症カンファレンス 2007、シンポジスト)(名古屋、2007年10月5日)
9. 三好俊一郎 /骨髓医学のヒト間葉系細胞からの心筋分化 /第22回犬山不整脈カンファレンス /(2007/8/25)/(招待講演)
 10. 三好俊一郎 /ヒト間葉系幹細胞由来、心筋細胞の電気生理学的特性 /第5回昭和再生医学医療研究会 /(2007/9/28) (招待講演)
 11. S Miyoshi (1/16 Corresponding Au), /Human menstrual blood-derived mesenchymal stem cell can restore impaired cardiac function by cardiomyogenesis in vivo /JACC 49(9); 83A, 2007(ニューオリンズ、2007年3月26日)
 12. S Miyoshi (3/9 Corresponding Au) /Human amniotic membrane-derived stem cell with lack of HLA-DR expression can be a promising cellular source for cardiac stem cell therapy /JACC 49(9); 47A, 2007(ニューオリンズ、2007年3月25日)
 13. S Miyoshi (2/16 Corresponding Au), /In situ cardiomyogenic transdifferentiation potential of human uterine endometrium-derived mesenchymal cell. / JACC 49(9); 42A, 2007(ニューオリンズ、2007年3月25日)
 14. S Miyoshi (3/15 Corresponding Au), /Human mesenchymal stem cell from human chorionic villi is a new cell source for autologous cardiac stem cell therapy. /JACC 49(9); 53A, 2007(ニューオリンズ、2007年3月25日)

〔図書〕(計 1 件)

1. 三好俊一郎(1/5 Corresponding Au) /【再生医学とリプロダクション】胎盤由来の間葉系幹細胞の心筋分化産 /婦人科の世界 /59(3) /243-250, /2007 (招待・査読なし)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

1. 名称: 「心筋細胞分化誘導促進剤及びその使用方法」
 発明者: 三好俊一郎
 権利者: 三好俊一郎、小川聡、梅澤明弘
 種類: 特許
 番号: 特願 2007-315920
 出願年月日: 平成 19 年 12 月 6 日
 国内外の別: 国内

2. 名称：「心筋細胞分化誘導促進剤及びその
使用方法」
発明者：三好俊一郎
権利者：三好俊一郎、小川聡、梅澤明弘
種類：特許
番号：特願 2007-315921、
出願年月日：平成 19 年 12 月 6 日
国内外の別：国内

取得状況（計 1 件）

1. 名称：「細胞噴射装置」
発明者：三好俊一郎
権利者：三好俊一郎、小川聡、梅澤明弘
オリンパス株式会社
種類：特許
番号：P2007-283025A
取得年月日：平成 19 年 11 月 1 日公開
国内外の別：国内

〔その他〕

1. 「月経血心筋の母」朝日新聞朝刊 34 頁、
2008/4/18（査読無し）
2. 「月経血から心筋細胞」読売新聞朝刊 33
頁、2008/4/20(査読無し)
3. Scientists say menstrual blood can
repair hearts, Yahoo News AFP 通信
2008/4/24(査読無し)

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

なし