

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08824

研究課題名(和文)血管新生因子を搭載した人工型エクソソームによる、難治性心疾患の新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development for intractable heart disease for modified exosomes

研究代表者

藏澄 宏之(KURAZUMI, Hiroshi)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50645116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウス心筋梗塞モデルを使用して、梗塞領域または梗塞領域周辺に特異的に発現している細胞表面抗原分子を探索する研究を行った。マウス心筋梗塞モデルに対して2通りの方法で、梗塞領域または梗塞領域周辺に特異的に発現している細胞表面抗原分子を探索したところ、アレイ解析では、発現レベルが高い遺伝子候補を得ることが出来たが、その後のqPCR解析や免疫染色で発現レベルを確認したところ、発現レベルが高い遺伝子を得ることは出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドナー不足において、虚血性心疾患に対する治療法の開発が望まれている。近年は、細胞移植による再生医療だけでなく、細胞が分泌するエクソソームを使用した治療の開発が行われている。エクソソームを使用した治療法も、エクソソームの使用法により、投与方法も多様である。本研究は、将来、経静脈投与によりエクソソームを虚血状態の心臓組織に集積する方法を確立するための、基礎研究の一環として実施された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted research to explore cell surface antigens specifically expressed in infarct areas and around the infarct area using mouse myocardial infarction model in two ways. Although we gained gene candidates with high expression levels based on mRNA array analysis, in subsequent detailed analysis, we did not gain gene candidates with high expression levels based on qPCR analysis and immunostaining analysis.

研究分野：再生医療

キーワード：虚血性心疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患に対して、細胞移植による血管新生療法が行われている。静脈投与による細胞移植では、移植した細胞が心臓に到達する率が高くないため、細胞移植の方法としては、開胸による細胞移植や、カテーテルによる細胞移植が実施されている。開胸による細胞移植では、細胞シートを心臓の表面への移植、細胞懸濁液などの場合は、心臓表面に注射針による投与が実施されている。また、カテーテルによる細胞懸濁液などの移植も、心臓に対して注射針による投与が試みられている。

近年、動物実験で細胞移植と同等の効果を示す治療法として、エクソソーム治療が報告されている。これは、移植する細胞が分泌するエクソソームを単離して、細胞移植の代わりに、エクソソームを投与するものである。

また、エクソソームは免疫原性がないとも報告されていることから、他家細胞が分泌するエクソソームを治療薬として使用することが期待されている。

研究代表者が所属する研究室では、エクソソーム投与のメリットを活かす方法として、目的部位への筋肉注射ではなく、経静脈投与により、エクソソームが目的の部位に到達する方法が必要であると考えた。そのため、研究代表者が所属する研究室では、先行研究として、重症下肢虚血組織周囲に発現している分子を解析し、その分子に対するリガンドを発現するエクソソームを作製し、マウス下肢虚血モデルに対して経静脈投与を行ったところ、目的の部位である虚血組織周辺に集積している結果を得ている。

そこで、研究代表者は、虚血性心疾患に対するエクソソーム治療の基盤となる技術を確立できないかと考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心筋梗塞領域や、その周辺領域に特異的に発現している細胞表面抗原分子を、マウスモデルで特定することを試みることであった。

3. 研究の方法

(1) 梗塞領域を含む心臓組織における細胞表面抗原分子の解析

心臓組織の準備

イソフルラン吸入麻酔、挿管により人工呼吸器で管理されたマウスの左開胸により LAD を結紮し、MI モデルとした。Sham は開胸のみとした。2 日後に、犠牲死させ、MI モデルにおいて、梗塞領域を含む心臓組織を切り出して、RNA 保存液に浸漬した。また、MI モデルで切り出した心臓組織と同じ部位を、Sham モデルの心臓組織から切り出して、RNA 保存液に浸漬した。MI モデルおよび Sham モデルは、それぞれ 4 匹ずつ実施した。

RNA 抽出から RNA アレイ解析まで

RNA 保存液に保存していた心臓組織から、RNeasy Mini Kit を使用して、total RNA を抽出し、RNA 濃度を測定した。RNA アレイ解析は、プールサンプルで実施するために、MI モデルの 4 匹、および、Sham モデルの 4 匹の total RNA をそれぞれ等量ずつ入れた RNA サンプルを作製し、RNA アレイ解析を東レに委託した。

qPCR 解析による RNA 発現の確認

アレイ解析のデータから細胞表面抗原分子と予測される 6 個の遺伝子を選択し、MI モデルの 4 匹、および、Sham モデルの 4 匹の total RNA から作製した cDNA に対して qPCR で発現レベルを確認した。

(2) MI モデルにおける梗塞領域組織と梗塞領域周辺組織における細胞表面抗原分子の解析

梗塞領域組織と梗塞領域周辺組織の準備

イソフルラン吸入麻酔、挿管により人工呼吸器で管理されたマウスの左開胸により LAD を結紮し、MI モデルとした。2 日後に、犠牲死させ、同一の MI モデルにおいて、梗塞領域組織と梗塞領域周辺組織を切り出して、RNA 保存液に浸漬した。MI モデルは 3 匹実施した。

RNA 抽出から RNA アレイ解析まで

(1) と同様の方法で実施した。

qPCR 解析による RNA 発現の確認

アレイ解析のデータから細胞表面抗原分子と予測される 11 個の遺伝子を選択し、梗塞領域組織と梗塞領域周辺組織の total RNA から作製した cDNA に対して qPCR で発現レベルを

確認した。

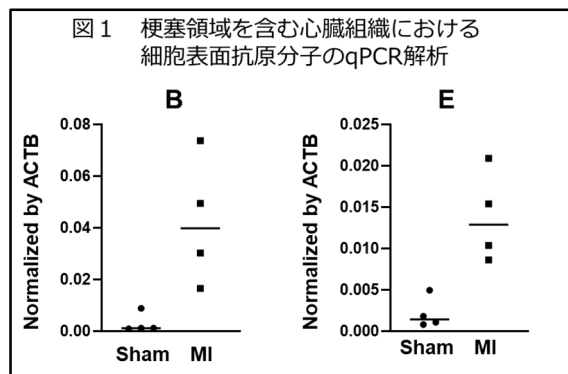
4. 研究成果

(1) 梗塞領域を含む心臓組織における細胞表面抗原分子の解析

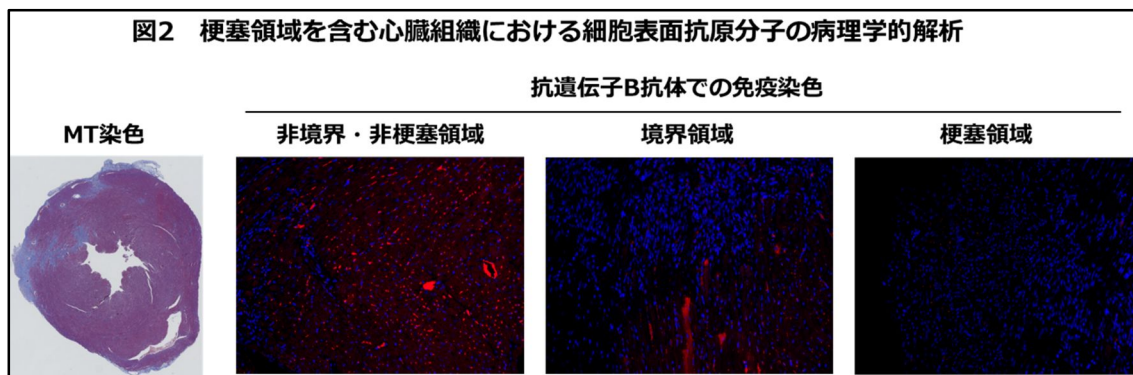
RNA アレイ解析から、Sham 群と比較して、MI モデル群で、発現レベルが 50 倍以上になった遺伝子は 23 個あった。その中で、細胞表面抗原分子と予測される遺伝子は、6 個であった為(表 1) 6 遺伝子の発現レベルを qPCR で解析したところ、遺伝子 B と遺伝子 E は、Sham 群と比較して、MI モデル群で発現レベルが高い結果となった(図 1)。他の遺伝子は、Sham 群と MI モデル群で、発現レベルに差はなかった。

表 1 梗塞領域を含む心臓組織における細胞表面抗原分子のアレイ解析

遺伝子	ratio
A	247.51
B	91.21
C	73.77
D	72.03
E	64.73
F	61.64



遺伝子 B に対して、MI モデル 2 日後における心臓組織に対して免疫染色を行った(図 2)。図 2 の左は、マツソントリクローム染色(MT 染色)である。この心臓組織に対して、抗遺伝子 B 抗体を使用して免疫染色を行ったところ、非境界・非梗塞領域では、染色される範囲が広く観察された。境界領域では、一部の範囲で染色が観察された。梗塞領域では、染色された範囲を観察できなかった。



(2) MI モデルにおける梗塞領域組織と梗塞領域周辺組織における細胞表面抗原分子の解析

RNA アレイ解析から、梗塞領域周辺組織と比較して、梗塞領域組織で、発現レベルが 10 倍以上になった遺伝子は 46 個あった。その中で、細胞表面抗原分子と予測される遺伝子は、11 個であった為(表 2) 11 遺伝子の発現レベルを qPCR で解析したところ、梗塞領域周辺組織と比較して、梗塞領域組織で発現レベルが、明らかに上昇していると確認できる遺伝子はなかった。

表 2 梗塞領域組織と梗塞領域周辺組織における細胞表面抗原分子のアレイ解析

遺伝子	ratio
G	19.82
H	14.11
I	12.66
J	10.96
K	10.84
L	10.70
M	10.56
N	10.55
O	10.28
P	10.24
Q	10.24

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Saito Toshiro, Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Matsunaga Kazumasa, Tsubone Sarii, Lv Bochao, Kobayashi Sei, Nagase Takashi, Mizoguchi Takahiro, Samura Makoto, Suehiro Kotaro, Harada Takasuke, Morikage Noriyasu, Mikamo Akihito, Hamano Kimikazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Perivascular Adipose Tissue Is a Major Source of Nitric Oxide in Saphenous Vein Grafts Harvested via the No Touch Technique	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e020637
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.120.020637	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Soichi Ike, Koji Ueno, Masashi Yanagihara, Takahiro Mizoguchi, Takasuke Harada, Kotaro Suehiro, Hiroshi Kurazumi, Ryo Suzuki, Tomoko Kondo, Tomoaki Murata, Bungo Shirasawa, Noriyasu Morikage, Kimikazu Hamano	4. 巻 14
2. 論文標題 Cryopreserved allogenic fibroblast sheets:development of a promising treatment for refractory skin ulcers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Translational Research	6. 最初と最後の頁 3879-3892
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsuno Yutaro, Yanagihara Masashi, Ueno Koji, Saito Toshiro, Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Katsura Shunsaku, Oga Atsunori, Hamano Kimikazu	4. 巻 12
2. 論文標題 Dry preserved multilayered fibroblast cell sheets are a new manageable tool for regenerative medicine to promote wound healing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-16345-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Nawata Ryosuke, Yokoyama Toshiki, Tsubone Sarii, Mikamo Akihito, Hamano Kimikazu	4. 巻 15
2. 論文標題 Impact of the no-touch harvesting technique on the vessel diameter of saphenous vein grafts for coronary artery bypass grafting	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JTCVS Techniques	6. 最初と最後の頁 87 ~ 94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xjtc.2022.07.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Ryo, Mikamo Akihito, Tsubone Sarii, Matsunaga Kazumasa, Matsuno Yuutaro, Kurazumi Hiroshi, Hamano Kimikazu	4. 巻 36
2. 論文標題 Preoperative evaluation of aortic calcification by computed tomography in thoracic aortic disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cardiac Surgery	6. 最初と最後の頁 62 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jocs.15154	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 Iwamoto K, Saito T, Takemoto Y, Ueno K, Yanagihara M, Furuya-Kondo T, Kurazumi H, Tanaka Y, Taura Y, Harada E, Hamano K	4. 巻 13
2. 論文標題 Autologous transplantation of multilayered fibroblast sheets prevents postoperative pancreatic fistula by regulating fibrosis and angiogenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Transl Res	6. 最初と最後の頁 1257-1268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Mizoguchi T, Suehiro K, Ueno K, Ike S, Nagase T, Samura M, Harada T, Kurazumi H, Suzuki R, Harada K, Takami T, Morikage N, Hamano K	4. 巻 13
2. 論文標題 A pilot study using cell-mixed sheets of autologous fibroblast cells and peripheral blood mononuclear cells to treat refractory cutaneous ulcers.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Transl Res	6. 最初と最後の頁 9495-9504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Suehiro Kotaro, Fujita Motoki, Morikage Noriyasu, Harada Takasuke, Samura Makoto, Suzuki Ryo, Kurazumi Hiroshi, Tsuruta Ryosuke, Hamano Kimikazu	4. 巻 14
2. 論文標題 Hyperbaric Oxygen Therapy Is an Effective Adjunctive Therapy to Manage Treatment-Resistant Venous Leg Ulcers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Vascular Diseases	6. 最初と最後の頁 273 ~ 276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3400/avd.cr.21-00030	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 Ueno Koji, Ike Soichi, Yamamoto Naohiro, Matsuno Yutaro, Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Katsura Shunsaku, Shirasawa Bungo, Hamano Kimikazu	4. 巻 28
2. 論文標題 Freezing of cell sheets using a 3D freezer produces high cell viability after thawing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101169 ~ 101169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101169	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 Suehiro Kotaro, Mizumoto Yukie, Morikage Noriyasu, Harada Takasuke, Samura Makoto, Nagase Takashi, Takeuchi Yuriko, Mizoguchi Takahiro, Suzuki Ryo, Kurazumi Hiroshi, Hamano Kimikazu	4. 巻 -
2. 論文標題 Hardness Sensed by Skin Palpation in Legs with Lymphedema Is Predominantly Correlated with Dermal Thickening	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lymphatic Research and Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/lrb.2020.0133	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15件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Hiroshi Kurazumi, Akihito Mikamo, Ryosuke Nawata, Toshiki Yokoyama, Sari Tsubone, Yutaro Matsuno, Ryo Suzuki, Bungo Shirasawa, Kimikazu Hamano
2. 発表標題 Impact of the no-touch harvesting technique on vessel diameter of saphenous vein grafts for coronary artery bypass grafting
3. 学会等名 ASCVTS2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木亮、上野耕司、池創一、山本直宗、松野祐太郎、藏澄宏之、桂春作、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 3Dフリーザーによる細胞シート凍結の可能性
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木亮、美甘章仁、坪根咲里依、松永一真、藏澄宏之、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 経カテーテル大動脈弁留置術 (TAVI) の治療成績及びTAVI後心臓再手術を要した症例の検討
3. 学会等名 第51回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藏澄宏之、美甘章仁、坪根咲里依、松永一真、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胸部大動脈 open repair の治療成績
3. 学会等名 第51回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坪根咲里依、美甘章仁、松永一真、藏澄宏之、鈴木亮、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 当院における僧帽弁複雑病変に対する僧帽弁形成術の治療成績の比較
3. 学会等名 第51回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松永一真、美甘章仁、坪根咲里依、藏澄宏之、鈴木亮、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 当科の急性A型大動脈解離における frozen elephant trunk の適応とその手術成績
3. 学会等名 第51回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 縄田良祐、美甘章仁、横山俊貴、坪根咲里依、松永一真、藏澄宏之、鈴木亮、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 咯血を来した胸部大動脈瘤肺内穿破に対し開胸手術を行い救命し得た2例
3. 学会等名 第64回関西胸部外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横山俊貴、美甘章仁、縄田良祐、松永一真、坪根咲里依、松野祐太郎、藏澄宏之、鈴木亮、濱野公一
2. 発表標題 人工血管食道瘻に対し、内視鏡的治癒ののち人工血管再置換術および瘻孔直接閉鎖術を行うことで根治し得た1例
3. 学会等名 第64回関西胸部外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 縄田良祐、美甘章仁、横山俊貴、坪根咲里依、松野祐太郎、藏澄宏之、鈴木亮、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 大伏在静脈を中枢側吻合としたfree graftによるV composite graftを用いた冠動脈バイパス術の治療成績
3. 学会等名 第26回日本冠動脈外科学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藏澄宏之、美甘章仁、横山俊貴、縄田良祐、坪根咲里依、松野祐太郎、鈴木亮、濱野公一
2. 発表標題 当院におけるNon-touch SVGの早期・中期成績
3. 学会等名 第26回日本冠動脈外科学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木亮、美甘章仁、縄田良祐、横山俊貴、坪根咲里依、藏澄宏之、白澤文吾、濱野 公一
2. 発表標題 StanfordA型急性大動脈解離手術における断端形成法 Intimal protected adventitial inversion technique (iPAIT) は術後の偽腔血栓化を促進するか?
3. 学会等名 第74回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藏澄宏之、美甘章仁、縄田良祐、横山俊貴、坪根咲里依、松野祐太郎、鈴木亮、濱野公一
2. 発表標題 TAVIで治療できない高齢AS患者に対するSAVRの治療成績
3. 学会等名 第74回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松野祐太郎、美甘章仁、縄田良祐、横山俊貴、坪根咲里依、藏澄宏之、鈴木亮、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 当科における急性A型大動脈解離の治療戦略の検討
3. 学会等名 第74回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坪根咲里依、美甘章仁、縄田良祐、横山俊貴、松野祐太郎、藏澄宏之、鈴木亮、白澤文吾、濱野 公一
2. 発表標題 心房細動合併僧帽弁疾患例に対する不整脈治療の効果
3. 学会等名 第74回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松永一真、美甘章仁、縄田良祐、横山俊貴、坪根咲里依、藏澄宏之、鈴木亮、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 低左心機能症例に対する血行再建 ONCAB vs OPCAB
3. 学会等名 第74回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021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	鈴木 亮 (SUZUKI Ryo) (10570319)	山口大学・大学院医学系研究科・助教 (15501)	
研究分担者	美甘 章仁 (MIKAMO Akihito) (30372709)	山口大学・大学院医学系研究科・准教授 (15501)	
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	齊藤 寿郎 (SAITO Toshiro) (60648484)	山口大学・医学部附属病院・助教 (15501)	削除：2022年12月31日

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
---------	---------