

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月29日現在

機関番号：14401
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23791568
研究課題名（和文） 心筋線維芽細胞による心筋再生機序を応用した重症心不全治療の検討
研究課題名（英文） Investigation of cellular function of cardiac fibroblasts in cardiac regeneration
研究代表者 福嶋 五月（FUKUSHIMA SATSUKI） 大阪大学・医学系研究科・助教 研究者番号：80596867

## 研究成果の概要（和文）：

本研究は重症不全心における心筋の線維化に焦点をあて、不全心の機能改善に関わるメカニズムを解明するものである。まず、左室補助人工心臓を装着した重症心不全患者の装着前および心臓移植時の心筋を採取し検討したところ、心機能と線維化との間に相関は見られなかったものの、心機能と細動脈の壁厚に相関がみられた。一方、ラット重症心不全モデルに再生型治療を行ったところ、線維合成や分解に関わる様々な因子が治療後にダイナミックに動き、心機能の向上と線維化の軽減をもたらすことが証明された。

## 研究成果の概要（英文）：

This study was to explore mechanisms related to improvement in cardiac function of advanced heart failure with a specific focus on fibrosis in the cardiac tissue. Firstly, cardiac tissue was surgically sampled from the patients having advanced heart failure at the time of left ventricular device implantation and at the time of cardiac transplantation. As a result, mechanical support by the device improved cardiac function but not reduced cardiac fibrosis. In contrast, regenerative treatment for a rat advanced heart failure model induced dynamic up-regulation and down-regulation of the factors related to synthesis and degradation of the fibrosis, consequently reducing cardiac fibrosis, indicating the importance of cardiac fibrosis in advanced heart failure.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：重症心不全、心筋線維化、補助人工心臓、細胞治療

## 1. 研究開始当初の背景

細胞移植や補助人工心臓装着あるいは、これらの組み合わせによる自己心臓の回復を目指した重症心不全の治療戦略は、心臓移植や

永久的人工心臓装着に比べて、患者にかかる負担、医療経済上の問題という点で優れているため、かかる期待は大きく様々な基礎研究、臨床研究が行われてきたが、その効果は一定でなく治療方法の更なる改良が必要であると

考えられている。

当科は、心不全に対する細胞移植の基礎研究を10年以上にわたって行い、骨髄由来幹細胞あるいは骨格筋芽細胞の移植による不全心機能改善のメカニズムとして、当初期待されたように注入された細胞が機能的な筋細胞へと分化するのではなく、幹細胞が様々なGrowth factor、Cytokine等を分泌することによって不全心の線維化の軽減、血管新生の促進、筋細胞機能の向上をもたらす、結果として心機能を改善するというParacrine効果があることを証明した。またそのParacrine効果は、骨格筋芽細胞をシートに増殖させた細胞シートの不全心への移植がより効果的であることを示し、末期的心不全患者に対してこの方法による臨床試験を近年開始した。

一方、重症慢性心不全治療の臨床現場においては、薬物治療中に急激な血行動態の悪化をきたし、補助人工心臓装着を余儀なくされ長期間心移植を待機することがしばしばである。しかし同時に、この人工心臓補助の間に不全心の機能が改善することがあることが知られており、当科においても不全心機能の改善により人工心臓を離脱しえた症例を経験してきた。さらに人工心臓補助下の心機能改善の程度は、人工心臓装着時の心拡大、左心収縮能、さらに心筋間質の線維化の程度と相関があることを見出した。これらの細胞移植、補助人工心臓装着の基礎的臨床的経験から、心筋の線維化の程度が重症心不全の予後ならびに治療効果を決定し、線維化の進んだ末期的心不全患者に対する治療を開発するには、線維化に関する基礎的な研究が欠かせないと考えられた。

心臓線維芽細胞は、心臓を構成する最も主要な細胞成分であるにもかかわらず詳細に解析されることは少なかったが、近年心機能の維持あるいは心不全の進展における役割の重要性が着目されつつある。心臓線維芽細胞は、心筋細胞や血管内皮細胞と相互に協調しながら細胞外Matrixを構成する蛋白質を生合成することによって心筋間質の線維化の程度を決定していると考えられている。慢性重症不全心においては容量負荷と圧負荷に伴い、線維芽細胞および心筋細胞からのTransforming Growth Factor (TGF)・の分泌が促進され、線維芽細胞の一部は・Smooth Muscle Actin (・S・)陽性の筋線維芽細胞へと形質転換し、この筋線維芽細胞が間質の線維化を亢進させ心室のRemodellingの進行に中心的な役割を果たしていると報告されている。しかし、一方では、筋線維芽細胞は収縮能を有し、消失した心筋細胞の機能を代替しているという

一見相反した報告もされており、その機能、役割については一定の見解が得られていない。

当施設における、細胞移植の基礎研究及び補助人工心臓装着の臨床研究から、筋芽細胞シート移植あるいは補助人工心臓装着により、機能の改善した慢性不全心では、心筋梗塞による癒痕部において筋線維芽細胞数が著明に増加しているという興味深い知見を得ている。また、当施設における細胞移植や心不全の基礎研究より不全心機能を改善する方向に働くことを見出したHGFは、心筋線維芽細胞の働きや形質転換に重要な役割を果たしていると報告された。以上より、線維芽細胞の重症不全心における機能と役割を細胞分子レベルで解明しそれを改変することが、治療抵抗性の末期的不全心の機能回復を目指した治療戦略につながるかと考えている。

## 2. 研究の目的

臨床材料ならびに小動物モデルを用いて、現行の細胞移植や補助人工心臓装着による不全心機能の改善のメカニズムを、最近その自己心臓回復への関与が示唆されている心臓線維芽細胞に焦点を当てて解明するとともに、自己心臓の回復により効果的な新しい治療戦略を検討することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床検体を用いた検討

末期的心不全のため、心臓移植目的に左室補助人工心臓を装着する患者の左室心筋を、人工心臓装着時および心臓移植時に採取し、ホルマリン固定とし、パラフィン切片を作成した(N=24)。切片に対して、マッソントリクローム染色、免疫染色を行い顕微鏡下およびコンピュータソフトを用いて、線維化の程度、間質の血管などを定性的、定量的に検討した。また、人工心臓装着中の心臓機能の推移を、心臓超音波検査を用いて検討した。

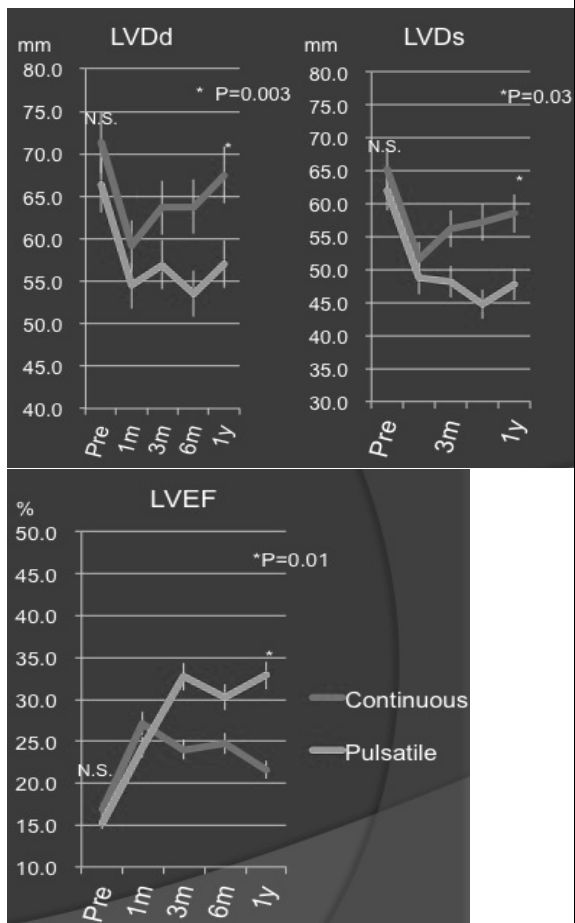
### (2) 動物モデルによる検討

① ラット重症心筋症モデルを作成し、これに対して治療効果があることが知られている骨格筋芽細胞を移植し、心臓機能と心筋線維化の程度の推移、相関を、心臓超音波検査、免疫組織学的検査、分子生物学的検査、統計学的手法を用いて検討した。

② (1)にて採取した心筋より間質細胞を単離培養することで、心筋線維芽細胞が多く含まれる細胞シートを作成した。これを、ラット及びブタの重症心筋症モデルに移植することにより、この心筋間質細胞が心機能に及ぼす効果を、心臓超音波検査、免疫組織学的検査、分子生物学的検査、統計学的手法を用いて検討した。

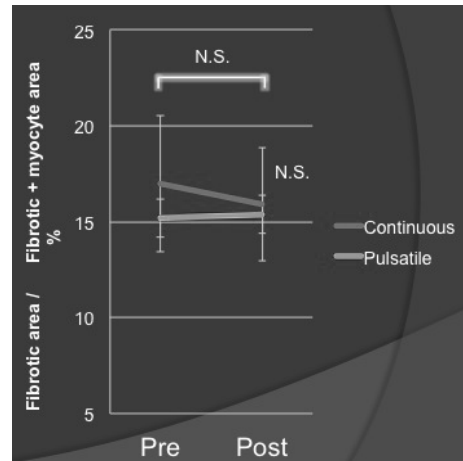
#### 4. 研究成果

(1) 末期的心不全における心筋線維化  
人工心臓装着後、人工心臓の種類により程度の差はあるもののほぼ全ての患者において左室駆出率の向上を認めた(図1)。



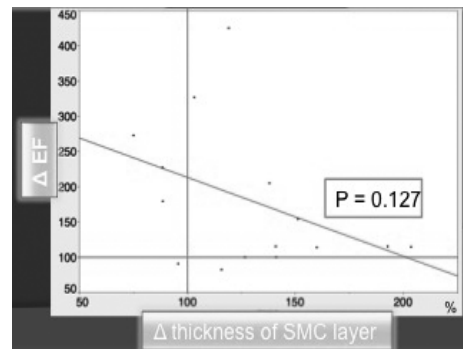
(図1) 人工心臓装着中の心機能の推移

マッソントリクローム染色による検討においては、人工心臓装着中の心機能の変化と線維化の程度の変化の間に統計学的な相関は見られなかった(図2)。



(図2) 人工心臓装着中の心筋線維化の程度の推移

同時に興味深い知見として、人工心臓補助中に心筋内微小血管のリモデリングが生じており、これが線維化の軽減と心機能の向上に関与することが証明できた(図3)。

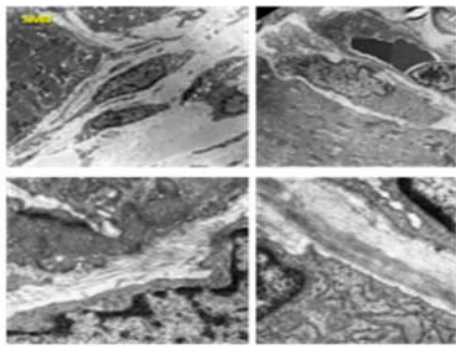


(図3) 人工心臓装着中の左室駆出率の変化と血管平滑筋層の壁厚の変化の相関

同内容を、平成24年度米国心臓学会総会において一般口演発表した(学会発表業績6)。現在、原著論文として専門学術雑誌に投稿中である。

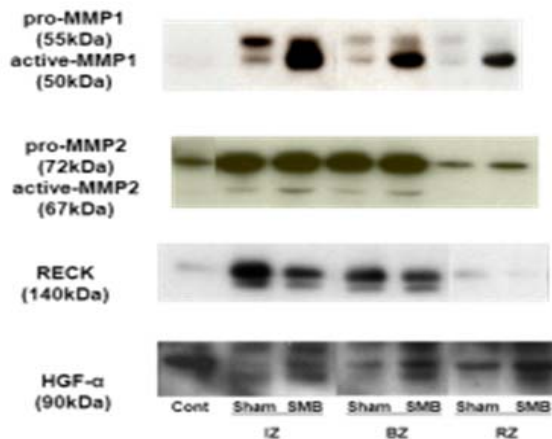
#### (2) 線維化を伴う心不全に対する細胞治療の効果

GFP発現ラットより採取培養した骨格筋芽細胞を細胞シート化し、同種同系ラットの虚血性心筋症モデルの梗塞心表面に移植した。心筋の組織学的変化を経時的に観察したところ、細胞シート移植後に線維化が軽減し、同時に筋線維芽細胞数が減少することが、免疫組織染色および電子顕微鏡にて観察できた(図4)。

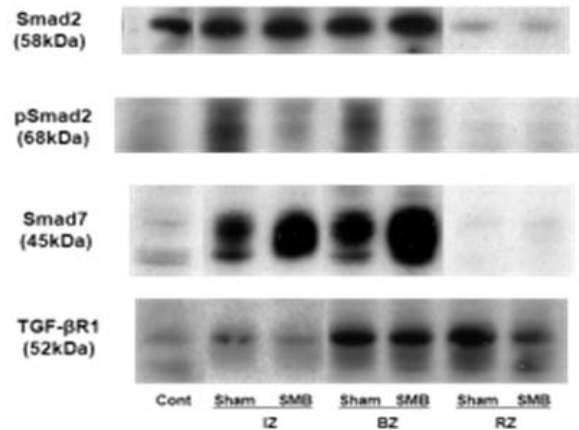


(図4) 骨格筋芽細胞移植後の心筋内筋線維芽細胞の分布

このメカニズムを解明するために、コラーゲンの合成および分解経路を Western blotting、real-time PCR、免疫組織染色にて検討した。コラーゲン合成に関わる HGF、MMP1/2 は細胞シート移植後に増加していたが、RECK の発現は減少していた (図5)。一方、コラーゲンの分解に関わるリン酸化 Smad2 や TGF- $\beta$ 1 は細胞シート移植後に減少していたが、Smad7 は増加していた (図6)。以上より、細胞シートの移植により、線維芽細胞の形質転換を促しコラーゲンの合成と分解の双方の経路がダイナミックに動くことで、心筋線維に変化が生じることが証明された。



(図5) 骨格筋芽細胞移植後の心筋内コラーゲン合成経路の変化



(図6) 骨格筋芽細胞移植後の心筋内コラーゲン分解経路の変化

同内容を平成24年度日本循環器学会および平成24年度日本再生医療学会にて一般演題として発表した (学会発表業績 2、4)。現在、原著論文として専門学術雑誌に投稿準備中である。

### (3) 心臓線維芽細胞が心機能に及ぼす効果の検討

ヒト心筋組織から単離培養した心筋間質細胞から、温度感応性培養皿を用いて、細胞シートを作成した。この細胞シートを、ヌードラットの重症心筋症モデルに移植したところ、心機能の回復とともに心筋線維化の軽減が見られた (論文業績 3)。続いて、同細胞シートを免疫抑制剤投与下のミニブタ重症心筋症モデルに移植したところ、同様に心機能の回復とともに心筋線維化の軽減や心筋血流の増加が見られた (論文業績 2)。以上より、重症心不全において、心臓線維芽細胞は心筋線維化の軽減を介して心機能の回復に寄与していることが示唆された。

### 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6件)

(査読のある専門学術雑誌のみ)

- ① Alshammary S, Fukushima S, Miyagawa S, Matsuda T, Nishi H, Saito A, Kamata S, Asahara T, Sawa Y. Impact of cardiac stem cell sheet transplantation on myocardial infarction. Surg Today. 2013 Mar 5. doi: 10.1007/s00595-013-0528-2

- ② Kamata S, Miyagawa S, Fukushima S, Nakatani S, Kawamoto A, Saito A, Harada A, Shimizu T, Daimon T, Okano T, Asahara T, Sawa Y. Improvement of Cardiac Stem Cell-Sheet Therapy for Chronic Ischemic Injury by Adding Endothelial Progenitor Cell Transplantation: Analysis of Layer-Specific Regional Cardiac Function. *Cell Transplant*. 2013 Apr 3. <http://dx.doi.org/10.3727/096368913X665602>
- ③ Fukushima S, Sawa Y, Suzuki K. Choice of cell-delivery route for successful cell transplantation therapy for the heart. *Future Cardiol*. 2013;9:215-27. doi:10.2217/fca.12.85.
- ④ Shudo Y, Miyagawa S, Nakatani S, Fukushima S, Sakaguchi T, Saito A, Asanuma T, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Myocardial layer-specific effect of myoblast cell-sheet implantation evaluated by tissue strain imaging. *Circ J*. 2012 Dec 29. 12-0615
- ⑤ Saito S, Miyagawa S, Sakaguchi T, Imanishi Y, Iseoka H, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Saito A, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Myoblast sheet can prevent the impairment of cardiac diastolic function and late remodeling after left ventricular restoration in ischemic cardiomyopathy. *Transplantation* 2012; 93:1108-15. doi: 10.1097/TP.0b013e31824fd803.
- ⑥ Imanishi Y, Miyagawa S, Maeda N, Fukushima S, Kitagawa-Sakakida S, Daimon T, Hirata A, Shimizu T, Okano T, Shimomura I, Sawa Y. Induced adipocyte cell-sheet ameliorates cardiac dysfunction in mouse myocardial infarction model - A novel drug delivery system for heart failure. *Circulation* 2011; 124:S10-7 doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.009993.

[学会発表] (計5件)

- ① Tetsuya Saito. Effect of Continuous-Flow Mechanical Support on Microvasculature Remodeling of the Failing Heart. American Heart Association Scientific Meeting 2012. 2012年11月3-7. ロサンゼルスコンベンションセンター 米国
- ② 塩崎元子. ラット慢性心不全梗塞モデルにおける筋芽細胞シート移植による細胞外基質の reverse remodeling 効果に関する検討. 第11回日本再生医療学会. 2012年6月12-14. パシフィコ横浜
- ③ 鎌田創吉. 虚血性心筋症に対する心筋幹細胞シート移植及び血管内皮前駆細胞併用療法の有用性の検討. 第11回日本再生医療学会. 2012年6月12-14. パシフィコ横浜
- ④ Motoko Shiozaki. Skeletal Myoblast Sheet Transplantation Attenuates Myocardial Fibrosis in a Rat OMI Model; Significance of MMP/RECK and TGF- $\beta$ /Smad Signal. 第76回日本循環器学会. 2012年3月16-18 福岡国際会議場
- ⑤ Sokichi Kamata. Optimizing Cardiac Progenitor Cell-Sheet Therapy by Adding Endothelial Progenitor Cell Transplantation for Ischemic Cardiomyopathy; An Analysis of Layer-Specific Regional Cardiac Function. American Heart Association Scientific Meeting 2011. 2011年11月12-16. オーランドコンベンションセンター 米国

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福嶋 五月 (FUKUSHIMA SATSUKI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：80596867