

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890211

研究課題名（和文） c-kit 陽性ヒト心臓幹細胞（CSC）の単離と培養：日本初の臨床試験実施へ向けて

研究課題名（英文） Isolation and culture of c-kit-positive human cardiac stem cells (CSCs): Aiming for the first clinical trial in Japan

研究代表者

細田 徹 (HOSODA TORU)

東海大学・創造科学技術研究機構・准教授

研究者番号：50608601

研究成果の概要（和文）：c-kit 陽性ヒト心臓幹細胞(CSC)を用いた国内での臨床試験実施を見据えて、成人・小児の開心術で切離される心臓組織片より小細胞分画を単離し、c-kit 陽性 CSC を抽出することに成功し、安定した培養システムを確立した。また、c-kit に対する免疫染色によって細胞選別の特異性を確認した他、細胞の倍加時間、BrdU 陽性率、クローン生成能などの生物学的性質を探究した。これらが各種の臨床データとどのように相関するかを引き続き検討している。

研究成果の概要（英文）：In order to prepare for a potential domestic clinical trial, adult and pediatric heart tissues resected during cardiac surgeries were obtained. I have succeeded in reproducing the methods to isolate and culture c-kit-positive human cardiac stem cells. Additionally, immunostaining against c-kit was carried out to confirm the specificity of the sorting procedure. Moreover, population doubling time, BrdU positivity, clonogenicity of the stem cells were examined. These data are compared with clinical information to retrieve correlations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：再生医学、体性幹細胞、心臓幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年まで、心臓は終末分化臓器とみなされ、個々の心筋細胞は生後間もなく増殖能力を失い、収縮を繰り返しつつ個体の死まで生き続けると信じられて来た。この考えに拠れば壊死心筋などは置き換えられず、薬物治療等で心機能が維持できなければ、補助人工心臓や心臓移植が残された治療手段とみなされ

る。しかし脳死ドナーの不足、移植後の拒絶反応、免疫抑制剤による副作用、医療費の増加など、多くの問題を抱えている。

2003年、ラット成体の心臓に組織幹細胞、即ち心臓幹細胞(Cardiac Stem Cell; CSC)が存在することが示された。CSCは幹細胞因子の受容体 c-kit を発現し、心筋・血管平滑筋・血管内皮・線維芽細胞に分化する。CSC を急

性心筋梗塞の境界領域に移植すると、心筋・血管が再生され心機能が改善した。

ヒト心臓において、CSCは心臓ニッチに格納され、組織の需要に応じ分裂・分化してニッチを離れ、心臓の恒常性を維持している。ヒト CSC を免疫抑制状態のマウスやラットの急性心筋梗塞の境界領域に注入すると、心筋や血管が再生され心機能が改善した。その後、ブタを用いた前臨床試験を経て2009年、ヒト CSC を用いた世界初の第I相臨床試験を始動した。このSCIPIO試験は陳旧性心筋梗塞患者で冠動脈バイパス(CABG)手術を受ける者を対象とし、手術4ヶ月後に細胞治療を行い、2年間追跡する。まだ症例数は限られているものの、治療群の4ヶ月毎の左室駆出率は着実に改善し、CSC注入に伴う有害事象も認められなかった。

## 2. 研究の目的

近い将来、日本でc-kit陽性ヒトCSCの自家移植による心不全治療を実現するため、開心術で体外に切離される組織片を用い、東海大学においてCSCの単離・培養法を確立することを主たる目的とした。それに付随して、患者の年齢・性別・基礎心疾患・罹患期間・組織の採取部位といった臨床データと、得られたCSCの増殖能やアポトーシスの割合とに相関が見られるか検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

成人及び小児の開心修復手術に伴って必然的に体外に切り離される心臓組織片を生体材料として譲り受ける。組織を細切した後、コラゲナーゼ溶液中で処理して単離された小細胞分画を、約2~3週間かけて前培養する。続いて、ヒトc-kitに対する抗体とマグネティック・ビーズを用いてCSCを選別し培養する。蛍光免疫細胞染色により、c-kit陽性細胞の割合を調べ、細胞選別の特異度を検討する。

心臓組織片からのCSCの単離・培養のプロセスが確立された時点で、来たるべき臨床試験で用いることが予想される約5継代目の細胞を用いて、細胞増殖能を検討する。具体的には、培養CSC数の定期的な計測による細胞倍加時間の測定と、BrdUの短期投与とその染色を行う。これらの結果が、臨床情報(年齢・性別・基礎心疾患と罹患期間・組織採取部位等)とどのように相関するかを解析する。

## 4. 研究成果

c-kit陽性ヒト心臓幹細胞(CSC)を用いた国内での臨床試験実施を見据えて、榊原記念病院より、成人約20例・小児2例の開心術で切離された心臓組織片を得た。当初、小細胞の培養過程が難航したが、組織の処理の仕

方を調整し、解決した。単離された小細胞分画からc-kit陽性CSCを抽出することに成功し、安定した培養システムを確立した。

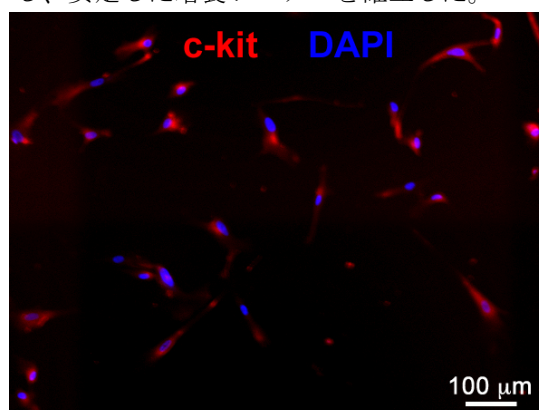


図. c-kit蛋白を発現するヒト心臓幹細胞

また、c-kitに対する免疫染色によって細胞選別の特異性を確認した(図)。他、細胞の倍加時間、BrdU陽性率、クローン生成能などの生物学的性質を探究した。これらのデータについては、依然安定した値を得るに到っていないが、解析結果が各種の臨床データとどのように相関するかを引き続き検討している。

## 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19件)

1. Dey D, Han L, Bauer M, Sanada F, Oikonomopoulos A, Hosoda T, Unno K, De Almeida P, Leri A, Wu JC. Dissecting the molecular relationship among various cardiogenic progenitor cells. *Circ Res* 2013; 112:1253-62. (査読有) DOI:10.1161/CIRCRESAHA.112.300779
2. 林 恵美子、細田 徹. 再生医療-細胞移植治療の進歩と展望-. *カレントテラピー* 2013; 31:406-11. (査読無)
3. 林 恵美子、田中千陽、細田 徹. 心臓幹細胞とエイジング. *Heart View* 2013; 17:379-84. (査読無)
4. 林 恵美子、細田 徹. 心臓組織幹細胞. *血管医学* 2013; 14:77-84. (査読無)
5. Kajstura J, Rota M, Cappetta D, Ogórek B, Arranto C, Bai Y, Ferreira-Martins J, Signore S, Sanada F, Matsuda A, Kostyla J, Caballero MV, Fiorini C, D'Alessandro DA, Michler RE, Del Monte F, Hosoda T, Perrella MA, Leri A, Buchholz BA, Loscalzo J, Anversa P. Cardiomyogenesis in the aging and failing human heart. *Circulation* 2012; 126:1869-81. (査読有) DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.1183

6. Kajstura J, Bai Y, Cappetta D, Kim J, Arranto C, Sanada F, D' Amario D, Matsuda A, Bardelli S, Ferreira-Martins J, **Hosoda T**, Leri A, Rota M, Loscalzo J, Anversa P. Tracking chromatid segregation to identify human cardiac stem cells that regenerate extensively the infarcted myocardium. *Circ Res* 2012; 111:894-906. ( 査 読 有 ) DOI:10.1161/CIRCRESAHA.112.273649
  7. **細田 徹**. 心臓幹細胞の臨床への応用. *心臓* 2012; 44:1095-8. (査読無)
  8. **細田 徹**. MicroRNAによるc-kit陽性心臓幹細胞の分化制御. *循環器内科* 2012; 71:355-9. (査読無)
  9. Ferreira-Martins J, Ogórek B, Cappetta D, Matsuda A, Signore S, D' Amario D, Kostyla J, Steadman E, Ide-Iwata N, Sanada F, Iaffaldano G, Ottolenghi S, **Hosoda T**, Anversa P, Leri A, Kajstura J, Rota M. Cardiomyogenesis in the developing heart is regulated by c-kit-positive cardiac stem cells. *Circ Res* 2012; 110:701-15. ( 査 読 有 ) DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.259507
  10. **Hosoda T**. Editorial: The Heart heals itself. *Anatom Physiol* 2012; 2:e112. ( 査 読 有 ) DOI:10.4172/2161-0940.1000e112
  11. Kajstura J, Rota M, **Hosoda T**, Anversa P, Leri A. Response to Bergmann et al: Carbon 14 Birth Dating of Human Cardiomyocytes. *Circ Res* 2012; 110:e19-e21. ( 査 読 有 ) DOI:10.1161/CIRCRESAHA.111.259721
  12. **Hosoda T**. C-kit-positive cardiac stem cells and myocardial regeneration. *Am J Cardiovasc Dis* 2012; 2:58-67. (査読 有 ) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3257153/>
  13. Bolli R, Chugh AR, D' Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, Beache GM, Wagner SG, Leri A, **Hosoda T**, Sanada F, Elmore JB, Goichberg P, Cappetta D, Solankhi NK, Fahsah I, Rokosh DG, Slaughter MS, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomized phase 1 trial. *Lancet* 2011; 378:1847-57. (査読有) DOI:10.1016/S0140-6736(11)61590-0
  14. **Hosoda T**, Zheng H, Cabral-da-Silva MC, Sanada F, Ide-Iwata N, Ogórek B, Ferreira-Martins J, Arranto C, D' Amario D, Del Monte F, Urbanek K, D' Alessandro DA, Michler RE, Anversa P, Rota M, Kajstura J, Leri A. Response to letter regarding article, "Human cardiac stem cell differentiation is regulated by a mircrine mechanism". *Circulation* 2011; 124:e457. (査読有) DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.051110
  15. Leri A, **Hosoda T**, Kajstura J, Anversa P, Rota M. Identification of a coronary stem cell in the human heart. *J Mol Med* 2011; 89:947-59. (査読有) DOI:10.1007/s00109-011-0769-8
  16. **細田 徹**. 心臓幹細胞による劇的な再生医療～ボストンから世界初の報告、神奈川県から全国への発信. *MRTC* 2011; 321. ( 査 読 無 ) <http://medg.jp/mt/2011/11/vol321.html>
  17. Cesselli D, Beltrami AP, D' Aurizio F, Marcon P, Bergamin N, Toffoletto B, Pandolfi M, Puppato E, Marino L, Signore S, Livi U, Verardo R, Piazza S, Marchionni L, Fiorini C, Schneider C, **Hosoda T**, Rota M, Kajstura J, Anversa P, Beltrami CA, Leri A. Effects of age and heart failure on human cardiac stem cell function. *Am J Pathol* 2011; 179:349-66. (査読有) DOI:10.1016/j.ajpath.2011.03.036
  18. **Hosoda T**, Rota M, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Role of stem cells in cardiovascular biology. *J Thromb Haemost* 2011; 9 Suppl 1:151-61. (査読 有 ) DOI:10.1111/j.1538-7836.2011.04363.x
  19. D' Amario D, Cabral-Da-Silva MC, Zheng H, Fiorini C, Goichberg P, Steadman E, Ferreira-Martins J, Sanada F, Piccoli M, Cappetta D, D' Alessandro DA, Michler RE, **Hosoda T**, Anastasia L, Rota M, Leri A, Anversa P, Kajstura J. Insulin-like growth factor-1 receptor identifies a pool of human cardiac stem cells with superior therapeutic potential for myocardial regeneration. *Circ Res* 2011; 108:1467-81. (査読有) DOI:10.1161/CIRCRESAHA.111.240648
- [学会発表] (計18件)
1. **Hosoda T**. The Third-Generation Cardiac Stem Cells Defined by Asymmetric Chromatid Segregation and

- “Miracrine” Mechanism Contributing to Myocardial Regeneration. 第77回日本循環器学会学術集会 2013年3月15日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
2. **細田 徹**. 心臓幹細胞が創出する医療イノベーション. 医療分野におけるイノベーションの社会・経済評価研究会 2013年2月21日 東京大学・本郷
  3. **細田 徹**. 心臓幹細胞が形作る未来. 日本医師会生涯教育講座 2013年1月25日 旭市ホテルサンモール (千葉)
  4. **Hosoda T.** Clinical Applications of Cardiac Stem Cells. 第3回 東海大学テニユアトラック制度シンポジウム 2012年12月14日 東海大学高輪校舎(東京)
  5. **細田 徹**. トピックス/心臓幹細胞による心不全治療. 第16回 核医学フォーラム 2012年11月10日 東京コンファレンスセンター・品川
  6. **細田 徹**. 心臓幹細胞による心不全治療. 第13回 Vascular and Brain Conference 2012年11月10日 大阪帝国ホテル
  7. **細田 徹**. 心臓幹細胞が形作る未来. 第8回 総合医学研究所研修会 2012年10月12日 湯河原 (神奈川県)
  8. **細田 徹**. 心臓幹細胞による心不全治療. 第51回 幹細胞治療研究フォーラム 2012年9月20日 東京大学医科学研究所 (東京)
  9. **細田 徹**. 心臓幹細胞が形作る未来. 第45回 M&Bホスピタル・ソリューション会 2012年7月18日 NTT西日本本社 (大阪)
  10. **細田 徹**. 心血管再生医療の臨床応用. 新宿Cardiovascular Seminar 2012年6月29日 榊原記念病院 (東京)
  11. **細田 徹**. Say hello to 心臓幹細胞. ボストン日本人研究者交流会 2012年4月21日 マサチューセッツ工科大学(米国)
  12. **Hosoda T.** “Second-Generation” Cardiac Stem Cell Therapy for the Failing Heart. 第76回 日本循環器学会学術集会 2012年3月16日 福岡国際会議場
  13. **細田 徹**. 心臓幹細胞による心不全治療. 循環器エキスパートミーティング 2012年1月24日 慶應義塾大学・信濃町
  14. **Hosoda T.** Pursuit of the “Second-Generation” Cardiac Stem Cell Therapy. 第2回 東海大学テニユアトラック制度シンポジウム 2011年12月19日 東海大学校友会館 (東京)
  15. **Hosoda T.** Myocardial regeneration utilizing “superior” cardiac stem cells. 第28回 国際心臓研究会 日本部

会学術集会 2011年12月3日 学術総合センター (東京)

16. **細田 徹**. 心臓幹細胞と再生. 第4回 Translational Research Conference 2011年8月9日 日本大学医学部・板橋
17. **Hosoda T.** Myocyte Turnover in the Adult Human Heart. 第75回 日本循環器学会学術集会 2011年8月3日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
18. **Hosoda T.** Two Distinct Subpopulations of Adult Human Cardiac Stem Cells Contribute to the Therapeutic Regeneration of the Failing Heart. 第23回 国際血栓止血学会学術集会 2011年7月26日 国際会議場 (京都)

[その他]

ホームページ等

[http://www.u-tokai.ac.jp/tuiist/tt/announcement\\_hosoda.html](http://www.u-tokai.ac.jp/tuiist/tt/announcement_hosoda.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細田 徹 (HOSODA TORU)

東海大学・創造科学技術研究機構・准教授  
研究者番号：50608601

以上