

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249070

研究課題名(和文) 心不全心筋組織における「やわらかさ」の意義とその応用による外科的治療法の開発

研究課題名(英文) The development of surgical treatment targeting myocardial stiffness in damaged myocardium

研究代表者

澤 芳樹 (SAWA, Yoshiki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00243220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、様々な動物モデル(ラット心筋梗塞モデル、拡張型心筋症のイヌモデル等)に筋芽細胞シート及びプロスタサイクリン製剤を投与し、心機能の変遷、特に拡張性の改善をターゲットとして、研究を行った。筋芽細胞シートを心不全モデルに移植したところ、MMP、TGF- β 等の線維化をコントロールする因子により、心筋組織の線維化が抑制され、左室の拡張性が改善された。また、プロスタサイクリン製剤は血管内皮のIPレセプターに作用し、様々な血管新生サイトカイン(HGF, VEGF, SDF-1等)を分泌し、線維化を抑制することにより、左室拡張性が改善されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We implanted autologous myoblast sheets or prostacyclin agonist to animal heart failure model (rat infarction model, DCM canine model) and analyzed serial changes of cardiac performance especially diastolic function and histological modulation. Myoblast sheet ameliorate cardiac fibrosis by the control of several factors such as MMP and TGF- β etc, leading to improvement of cardiac performance especially diastolic function. Prostacyclin impact on IP receptors expressed on endothelial cells and stimulation of this receptor enhance the expression of several cytokines, resulting in improvement of diastolic function by the reduction of fibrosis in DCM or infarction animal model.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：心筋梗塞 細胞外マトリックス リモデリング プロスタサイクリン

1. 研究開始当初の背景

近年の生活習慣の欧米化や高齢化により、心不全の患者数は医学の発展した現代においても増加傾向にあり、現在その数は100万人と推定されている。心不全全体の5年生存率は50%、なかでも虚血性心筋症や拡張型心筋症などの重症心不全の3年生存率は30%と予後は不良である。このような心不全において、これまでは左心室の収縮性の低下が主な原因として考えられていたが、収縮性が維持されていても心不全を呈する患者や、収縮性が著明に低下しているにも関わらず、心不全症状が顕在化しない患者が認められる。また、これまで我々は、重症拡張型心筋症の患者や虚血性心筋症の患者に左室補助人工心臓を装着し、全例において人工心臓を止めて、離脱テストを行っている。本離脱テストにおいて、心臓の“やわらかさ”の指標として、水負荷テストを行い、肺動脈楔入圧をモニターし、人工心臓より離脱の可能性を模索しているが、“Bridge to Recovery”には、心臓自体の収縮性よりも、拡張性が重要であることが分かっている。このような臨床の現場で認められる現象を鑑みて、心不全の発症のメカニズムには心臓の収縮性のみではなく、心臓の“やわらかさ”が重要であると思われるが、心臓のかたさに関するメカニズムの解明やその治療法の開発は十分ではない。

現在のところ、心臓をやわらかくする治療は、これまで、ACE inhibitor等の内科的治療が行われており、その臨床効果が報告されているが、重症の心不全における内科的治療には限界があるものと推測され、外科的治療の介入の余地があるものと考えられる。

心臓の硬さをもたらす要因として、1. 心筋細胞の性状の変化 2. 細胞外基質の量及び質の変化 が考えられ、心不全において、これらの要因を解明することは重要であり、そのメカニズムに基づいた、心臓の収縮能・拡張能の改善も視野に入れた治療法の開発が必須であるものと思われる。

2. 研究の目的

心不全の病態として、心臓の収縮性はもちろんのこと、拡張性の障害が主な要因であることが知られている。拡張不全を避けるために、内科的薬物治療が行われているが、病勢の進行を抑える効果はあるものの、重症の心不全のように、完成してしまった硬い心臓に関しては、その治療効果は薄く、有効な治療法もないのが現状である。本研究の目的は、心不全における心臓の硬さの機序を解明すると同時に、収縮力のみならず、硬くなった不全心の拡張性をも改善させる新しい外科的治療を模索することである。

3. 研究の方法

これまで、我々は、細胞シートの基礎的研究および臨床研究を行っており、当治療法の安全性、有効性に関するデータを蓄積して

いる。また最近では、プロスタサイクリン製剤を用いた“体内再生型治療”の開発を行っており、新しい心不全治療となりうると考えている。本プロスタグランジン製剤は、in vitro、in vivoにおいて、平滑筋細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞に作用し、肝細胞増殖因子、VEGF、Stromal derived factor-1等の心筋再生サイトカインを産生させ、血管新生等の効果をもたらすことが知られている。しかし、これらの新しい心不全治療法は左室のreverse remodelingをもたらすことが実験的に判明しているが、心不全の心臓をやわらかくするかは全く検討されておらず、このプロジェクトで提案している治療概念に当てはまる方法であるか、解析されていない。よって、本プロジェクトでは、小動物疾患モデルに、筋芽細胞シートやプロスタサイクリン製剤を投与することにより、心臓のやわらかさを獲得することができるか検証する。心不全小動物モデルは、拡張型心筋症、および慢性期心筋梗塞モデルを用いて、大動物は拡張型心筋症イヌを用いて実験を行う。

A. 筋芽細胞シートの心不全モデル動物への投与実験

1. モデル動物の作成及び筋芽シート移植施行

2. 移植後の心機能の評価

梗塞作成後又は未処置の sham の左室収縮・拡張機能・左室容積を、心臓超音波、Millar社製カテーテルを用いて評価。

3. シート移植の心筋サンプルの解析

1) 組織染色

H&E/エラスチカワンギーソン/マッソントリクローム染色を用いて、線維化の程度を評価。

2) 免疫染色

Collagen Type / / 、MMP 及び TGF-等の細胞外基質関連蛋白の発現を解析。心筋構造蛋白の発現・分布の解析を行う。

3) ELESA

HGF、VEGF等を定量し血管新生の誘導との関連性を解析。

B. プロスタサイクリンの心不全動物への投与実験

1. 小動物、大動物拡張不全モデルに対して、プロスタグランジン製剤を含浸させたアテロコラーゲンシートを開胸下に移植する。

2. 大動物拡張不全モデルの作成

高速ペーシングによるイヌ拡張型心筋症モデルを作成する。

3. プロスタグランジン製剤を含浸したアテロコラーゲンシートの移植

イヌ拡張型心筋症に対してプロスタグランジン製剤を含浸させたアテロコラーゲンシートを、左側方開胸にて移植する。

4. 心機能、特に心臓拡張性の評価

心臓超音波にて、左室収縮性、拡張性を、カテーテルにて収縮性、拡張性を評価する。

5. 心筋組織の物理的やわらかさの評価

心筋サンプルをテンシロンにかけ、心臓の物理的拡張性を評価する。また、前年度までの基礎的研究で確立した拡張性に関わる蛋白を免疫染色、western blotting, 電子顕微鏡にて詳細に解析する。

4. 研究成果

様々な心不全動物に対する筋芽細胞シート移植

4-1

ラット梗塞モデルに対する筋芽細胞シート移植

ラット梗塞モデルに筋芽細胞シートを移植したところ、MMP2 の発現の増強、RECK 遺伝子の発現抑制、Smad7 の発現増強、TGF の発現低下を認めた。線維化率はシートの移植枚数を増加するにつれ、線維化率は有意に低下した(図1)。HGF 抗体を投与したところ、上記効果は減弱された。

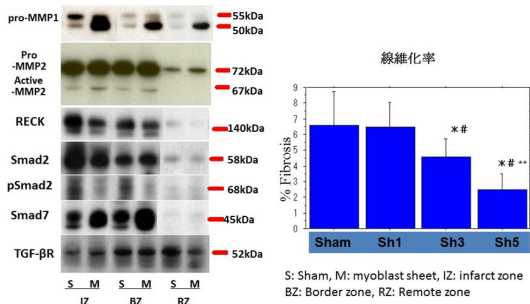


図1.ラット梗塞モデルへの筋芽細胞シート移植による線維化への効果

4-2 拡張型心筋症犬に対する筋芽細胞シート移植

拡張型心筋症犬に対して筋芽細胞シートを移植し、線維化の変遷、特に Collagen 1/3 の比率と拡張能に着目し、解析を行った。

筋芽細胞シートを移植することにより、左室の拡張性は改善するとともに(図2)、左心室の線維化率の低下を認め、治療群においては、左室壁厚の肥厚化、左室内腔の拡大抑制効果が認められた(図3)。また Collagen1/3 は有意に低下し、同数値は様々な拡張性の指標とよい相関を示した(図4)。心臓の拡張性を左右する細胞外基質は Collagen と の比率であることが判明した。

4-3 DCM ハムスターに対するプロスタサイクリン投与

拡張型心筋症ハムスターに対して、プロスタサイクリン製剤を浸透させたアテロコラーゲンシートを開胸下に心表面に移植したところ、様々な心筋構造蛋白(d-sarcoglycan, b-sarcoglycan) の発現は投与群にて維持されており、左室機能の低下も投与群で抑制さ

れていた。また、薬剤投与群にて生命予後の延長効果が認められた。薬剤投与検体にて、HGF 等のサイトカインの発現は高値であり、線維化の抑制、ミトコンドリアの形態も維持されていた(図5)。

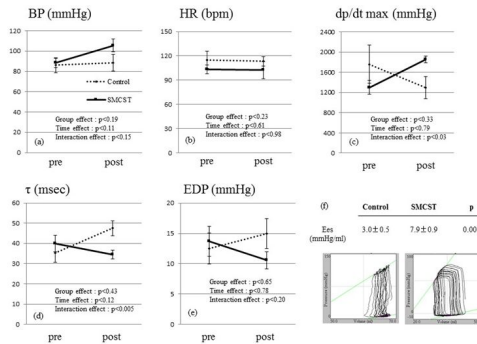


Figure 2

図2 左室拡張能に対する効果

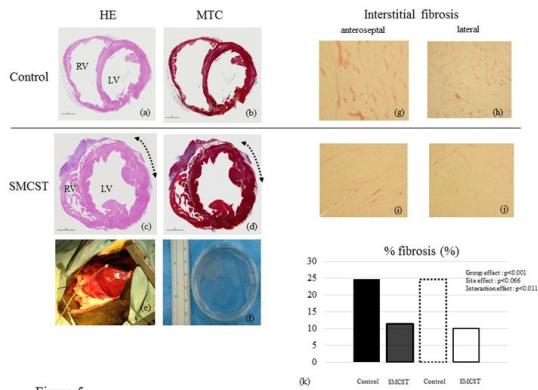


Figure 5

図3. 左室壁厚の肥厚化、左室内腔の変化

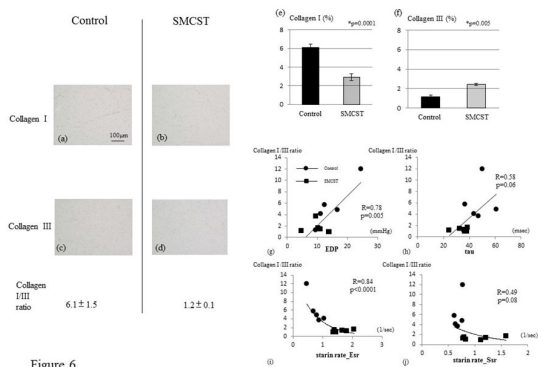


Figure 6

図4.筋芽細胞シート移植によるコラーゲンと拡張能の変化

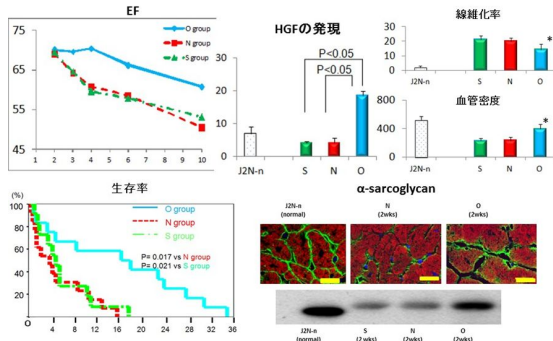


図5 .プロスタサイクリン剤の局所投与の影響

4 - 4 拡張型心筋症犬に対するプロスタサイクリン製剤投与

プロスタサイクリンを平滑筋細胞に投与すると、HGF、VEGF、SDF-1の発現が向上した(図6)。拡張型心筋症犬にプロスタサイクリン製剤を心筋注入したところ、収縮能とともに拡張能も改善し(図7)左室のリバースリモデリングは抑制された。特に、投与群での線維化率は有意に減少した(図8)

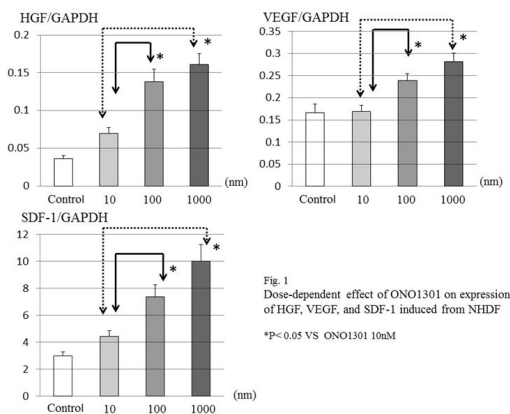


Fig. 1
Dose-dependent effect of ONO1301 on expression of HGF, VEGF, and SDF-1 induced from NHDF
*P<0.05 VS ONO1301 10nM

図6 .プロスタサイクリンアゴニストによる増殖因子の発現

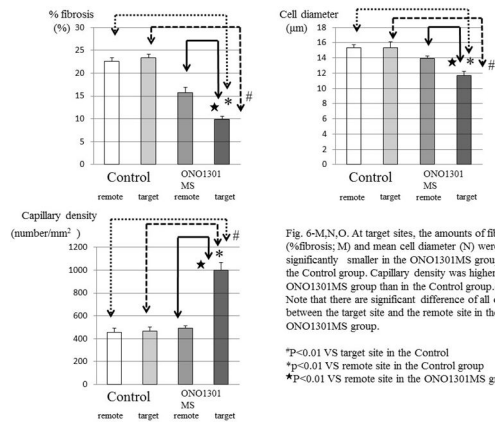


Fig. 6-M,N,O. At target sites, the amounts of fibrosis (%Fibrosis; M) and mean cell diameter (N) were significantly smaller in the ONO1301MS group than in the Control group. Capillary density was higher in the ONO1301MS group than in the Control group.(O) Note that there are significant difference of all of them between the target site and the remote site in the ONO1301MS group.

*P<0.01 VS target site in the Control
*P<0.01 VS remote site in the Control group
*P<0.01 VS remote site in the ONO1301MS group

図7 .収縮能、拡張能に対する効果

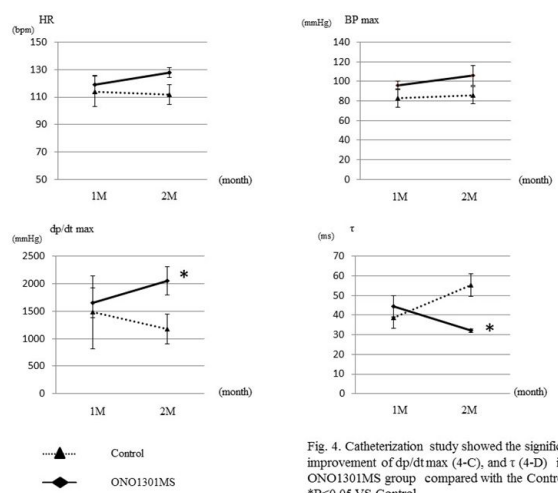


Fig. 4. Catheterization study showed the significant improvement of dp/dt max (4-C), and τ (4-D) in the ONO1301MS group compared with the Control group
*P<0.05 VS Control

図8 .線維化率の変化

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 5 件)

- 1) Fukushima S, Miyagawa S, Sakai Y, Sawa Y. A sustained-release drug-delivery system of synthetic prostacyclin agonist, ONO-1301SR: a new reagent to enhance cardiac tissue salvage and/or regeneration in the damaged heart. Heart Fail Rev. 2015 Feb 24. DOI 10.1007/s10741-015-9477-8 査読有
- 2) Yoshiki Watanabe, Shigeru Miyagawa, Satsuki Fukushima, Takashi Daimon, Yukitoshi Shirakawa, Toru Kuratani, Yoshiki Sawa, Development of a prostacyclin-agonist-eluting aortic stent graft enhancing biological attachment to the aortic wall. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2014Nov;148(5):2325-2334.e1,doi: 10.1016/j.jtcvs.2014.04.024. 査読有
- 3) Kubota Y, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Watabe H, Daimon T, Sakai Y,

- Akita T, Sawa Y. Impact of cardiac support device combined with slow-release prostacyclin agonist in a canine ischemic cardiomyopathy model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014 Mar;147(3), 1081-7, doi: 10.1016/j.jtcvs.2013.05.035. 査読有
- 4) Ishimaru K, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Sakai Y, Ueno T, Sawa Y. Synthetic prostacyclin agonist, ONO1301, enhances endogenous myocardial repair in a hamster model of dilated cardiomyopathy: a promising regenerative therapy for the failing heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013 Dec;146(6):1516-25. doi: 10.1016/j.jtcvs.2013.02.045. 査読有
- 5) Shirasaka T, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Shiozaki M, Kawaguchi N, Matsuura N, Nakatani S, Sakai Y, Daimon T, Okita Y, Sawa Y. A slow-releasing form of prostacyclin agonist (ONO1301SR) enhances endogenous secretion of multiple cardiotherapeutic cytokines and improves cardiac function in a rapid-pacing-induced model of canine heart failure. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013 Aug;146(2):413-21. doi: 10.1016/j.jtcvs.2012.10.003. 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

- 1) 渡辺芳樹、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、酒井芳紀、上野高義、戸田宏一、倉谷徹、澤芳樹. 自己組織化を促進する ONO1301 溶出性ステントグラフトの開発 第 45 回日本心臓血管外科学会、2015/2/18, 一般口演 国立京都国際会館 京都府 京都市
- 2) 宮川繁, プロスタサイクリンアゴニストを用いた心筋再生治療の開発, 第 41 回日本臓器保存生物医学学会学術集会 2014.11/2 ランチョンセミナー 千里ライフサイエンスセンター 大阪府 豊中市
- 3) 溝口裕規、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、酒井芳紀、今西悠基子、西宏之、吉川泰司、上野高義、戸田宏一、倉谷徹、澤芳樹 ミニブタ虚血性心筋症に対するプロスタサイクリンアゴニストの心臓局所投与は虚血境界領域の心筋血流を改善する - 13N-NH3 PET を用いた実験的検討 - 第 67 回日本胸部外科学会、2014/10/1, ポスター 福岡国際会議場 福岡県 福岡市
- 4) 溝口裕規、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、酒井芳紀、今西悠基子、西宏之、吉川泰司、上野高義、戸田宏一、倉谷徹、澤芳樹 虚血性心筋症に対する長期作用型プロスタサイクリンアゴニストの心臓局所投与法の心筋再生に関する実験的検討、第 114

- 回日本外科学会、京都、2014/4/4、一般演題 京都国際会館 京都府 京都市
- 5) 溝口裕規、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、酒井芳紀、今西悠基子、西宏之、吉川泰司、上野高義、戸田宏一、倉谷徹、澤芳樹 Slow-release Prostacyclin Agonist Promise Angiogenesis and Improve Regional Cardiac Function by Using Speckle-tracking Analysis in a Porcine Chronic Myocardial Infarction 2014/3/23 第 78 回日本循環器学会、ポスター 東京国際フォーラム 東京 千代田区
- 6) 溝口裕規、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、酒井芳紀、今西悠基子、西宏之、吉川泰司、上野高義、戸田宏一、倉谷徹、澤芳樹. 虚血性心筋症に対するプロスタサイクリンアゴニストによる血管新生に関する実験的検討、2014/3/4 口演 第 13 回日本再生医療学会 国立京都国際会館 京都府 京都市
- 7) 渡辺芳樹、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、酒井芳紀、上野高義、戸田宏一、倉谷徹、澤芳樹. 自己組織化を促進する薬剤溶出性ステントグラフトの開発、第 13 回日本再生医療学会、2014/03/04 ポスター 国立京都国際会館 京都府 京都市
- 8) 溝口裕規、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、酒井芳紀、今西悠基子、西宏之、吉川泰司、上野高義、戸田宏一、倉谷徹、澤芳樹. 長時間作用型 Prostacyclin agonist の心臓局所投与法の開発・効果に関する実験的検討、第 44 回日本心臓血管外科学会、2014/2/19 会長要望演題(口演) ホテル日航熊本 熊本県 熊本市
- 9) Watanabe Y, Miyagawa S, Fukushima S, Daikon T, Shirakawa Y, Kuratani T, Sawa Y. Development of a Prostacyclin-Agonist Eluting Aortic Stent Graft Enhancing Biological Attachment to the Aortic Wall. AHA(米国心臓病学会議) 2013. 11.16, Poster Dallas (USA),
- 10) Hiroki Mizoguchi, Shigeru Miyagawa, Hiroyuki Nishi, Yassushi Yoshikawa, Satsuki Fukushima, Daisuke Yoshioka, Tetsuya Sato, Takayoshi Ueno, Toru Kuratani, Yoshiki Sawa. New regional drug delivery system by direct epicardial placement of slow-release prostacyclin agonist promise therapeutic angiogenesis in a porcine chronic myocardial infarction AHA(米国心臓病学会議) 2013.11.16, Poster Dallas (USA),
- 11) 溝口裕規、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、酒井芳紀、今西悠基子、西宏之、吉川泰司、上野高義、戸田宏一、倉谷徹、澤芳樹 虚血性心筋症に対する長時間作用

型プロスタサイクリンアゴニストの心臓局所投与法の心筋再生作用に関する実験的検討 第66回日本胸部外科学会定期学術集会、2013.10.18 口演 仙台国際センター 宮城県 仙台市

- 12) 渡辺芳樹、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、酒井芳紀、上野高義、戸田宏一、倉谷徹、澤芳樹。自己組織化を促進する薬剤溶出性ステントグラフトの開発 第66回日本胸部外科学会定期学術集会、2013.10.18 プレナリーセッション 仙台国際センター 宮城県 仙台市
- 13) Imanishi Y, Miyagawa S, Fukushima S, Sakai Y, Sawa Y. A Prostacyclin Analogue ONO-1301 Enhances Bone Marrow Derived Cell Recruitment and Attenuates Cardiac Dysfunction Following Acute Myocardial Infarction in Mice"第77回日本循環器学会学術集会、2013.3.16、ポスター パシフィコ横浜 神奈川県 横浜市
- 14) 福嶋五月、宮川繁、鎌田創吉、今西悠基子、齋藤充弘、福嶋教偉、澤芳樹。新規合成プロスタサイクリン製剤(ONO1301)を用いた心筋保護法の開発 第39回日本臓器保存生物医学学会学術集会 2012.11.16-17 口演 コラッセふくしま 福島県 福島市
- 15) Kubota Y, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Toda K, Sawa Y. Impact of a Novel Hybrid Device by Combination of Cardiac Support Net and Prostacyclin Agonist in a Canine Ischemic Cardiomyopathy Model: A Preclinical Trial of SaveHeart, American Heart Association Scientific Sessions AHA(米国心臓病学会議) ,2012.11.4 Poster Los Angeles, USA,
- 16) 石丸和彦、宮川繁、福嶋五月、井手春樹、平将生、小澤秀登、酒井芳紀、小垣滋豊、上野高義、澤芳樹。拡張型心筋症ハムスターにおけるプロスタサイクリンアゴニスト(ONO1301)の心室リモデリング抑制作用の検討第48回日本小児循環器学会総会・学術集会 2012.7.5 会長賞候補講演 国立京都国際会館 京都府 京都市
- 17) 石丸和彦、宮川繁、福嶋五月、今西悠基子、原田明希摩、塩崎元子、井手春樹、平将生、酒井芳紀、上野高義、澤芳樹。PGI2 アゴニスト(ONO1301)含有 atelocollagen sheet による拡張型心筋症の心室リモデリング抑制作用の検討。第11回日本再生医療学会総会。横浜 2012.6.12 口演 パシフィコ横浜 神奈川県 横浜市
- 18) 今西 悠基子、宮川繁、福嶋五月、酒井芳紀、澤芳樹。重症心不全に対するプロスタサイクリン作動薬 ONO-1301 投与

による骨髄由来細胞動員効果に関する検討。第12回日本再生医療学会、横浜 2012.6.12Poster パシフィコ横浜 神奈川県 横浜市

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

名称: 薬剤溶出性ステントグラフト

発明者: 澤芳樹、倉谷徹、戸田宏一、上野高義、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、渡邊芳樹、酒井芳紀、

権利者: 大阪大学、小野薬品

番号: WO2015/056504

出願年月日: 2014年9月10日

国内外の別: 国内

名称: 肺疾患特異的治療剤

発明者: 澤芳樹、宮川繁、平将生、酒井芳紀、

権利者: カルディオ

番号: WO2014/069401

出願年月日: 2014年5月8日

国内外の別: 国内

名称: 心筋・血管再生デバイスとしての重不全治療材

発明者: 澤芳樹、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、酒井芳紀、松田和久、丸山隆幸

権利者: 大阪大学、小野薬品、ニプロ

番号: WO2014 / 046065

出願年月日: 2013年9月13日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

澤 芳樹 (SAWA, Yoshiki)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 00243220

(2)研究分担者

西 宏之 (NISHI, Hiroyuki)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 00529208

(H26より削除)

吉川 泰司 (YOSHIKAWA, Yasushi)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号: 40570594

宮川 繁 (MIYAGAWA, Shigeru)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号: 70544237

福嶋 五月 (FUKUSHIMA, Sarsuki)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 80596867