

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390325

研究課題名(和文) 脂肪組織幹細胞由来心筋細胞シート移植—大動物心不全モデルによる前臨床試験—

研究課題名(英文) Preclinical evaluation of cardiomyocyte sheet implantation constructed from adipose tissue derived stem cell using large animal heart failure model

研究代表者

松宮 護郎 (MATSUMIYA, Goro)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20314312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では前臨床試験としてヒト脂肪幹細胞由来の心筋シートを大動物モデルに移植しその効果を評価した。ブタ虚血性心筋症モデルを作成し、4週間後に心エコーにて左室収縮能、さらに梗塞部位の局所心機能をSonometric transducerを用いて評価した。その後、ADSC由来心筋シートを重層(3層)化して梗塞部位全体を覆うように移植した。12週後の評価でシート移植部分の局所収縮能が改善し、組織学的にはシート内に線維性組織の産生、血管新生が認められた。遺残心筋は豊富には認められなかった。

研究成果の概要(英文)：The present study was designed as preclinical evaluation of sheet implantation of cardiomyocyte-like cell from human ADSC in large animal model of ischemic cardiomyopathy. Ten pigs underwent occlusion of left anterior descending coronary artery with ameroid ring implantation. Five pigs underwent sheet implantation of cardiomyocytes induced from ADSC 4 weeks later. Sheets were implanted in 3 layers to cover the whole infarcted area. Functional evaluation was performed 12 weeks later. Echocardiogram demonstrated improved LV ejection fraction and regional systolic function at anteroseptal area only in sheet transplant group. Histological analysis demonstrated that sheet implanted area was occupied with fibrous component and scant cardiomyocytes, but some angiogenic reaction was observed.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：重症心不全 心筋再生療法 脂肪組織由来幹細胞 細胞シート 虚血性心疾患

### 1. 研究開始当初の背景

心疾患の最終病態である心不全は循環器領域における最も大きな克服すべき課題である。種々の薬物療法やインターベーションの発達にもかかわらず心不全患者は年々増え、現状の治療が無効な no option 症例も増加している。こういった重症心不全に対する最終的な治療法として補助人工心臓あるいは心臓移植などの置換型治療が行われているが、ドナー不足などにより一部の患者しか恩恵を得ることができていない。一方、近年心不全に対し、遺伝子工学や細胞組織工学、再生医学等を駆使し再生型治療が新規治療法として注目されている。

間葉系幹細胞の重症心筋虚血や心不全に対する有効性は多くの研究で示されてきた。なかでも骨髄由来幹細胞 (BM-MSC) は最も早くから注目され、*in vitro* において心筋を含む種々の細胞に分化しうることや、心筋梗塞や心不全動物モデルでの移植の有効性が示されてきた。しかしながら、臨床応用においては細胞採取に全身麻酔を必要とし、合併症のリスクを伴うこと、幹細胞の収率が必ずしも良好ではないことが問題となる。一方、近年脂肪組織由来の多能性幹細胞 (adipose tissue derived stem cell: ADSC) の存在が注目され、BM-MSC 同様心筋を含む種々の細胞に分化しうることを示された。細胞収率の上では BM-MSC に比べ良好であること、多くの患者で局所麻酔下に容易に細胞採取が行いいうという利点がある。したがって、より苦痛なく採取しうる ADSC を再生医療に用いることができれば、再生治療が特定の医療研究機関のみではなく、汎用的な治療となるうる可能性があり多くの患者さんにとって光明となると考えられる。

研究分担者である松山らは再生医療に用いる細胞供給源として早くから脂肪組織に注目し、脂肪組織より体性幹細胞を採取単離培養貯蔵する方法を確立し、その安全性の評価技術の確立をはじめ、脂肪細胞、幹細胞、インスリン分泌細胞への分化培養法の確立を進めてきた。さらに ADSC から心筋細胞への分化誘導に成功、*in vitro* で心筋細胞転写因子、心筋細胞骨格蛋白の発現を向上させうることを見出した。また、これらの細胞をシート化して、ラット慢性期梗塞モデルに移植したところ、*in situ* において心筋細胞へと分化、長期にわたり心機能改善効果が維持されることを見出した。(Okura et al. Tissue eng, Part C, Methods. 2010)。これらの知見を受け、慢性期ブタ梗塞モデルに同細胞を経冠動脈的に投与、その臨床効果を確認している。

したがって、ADSC は心筋へと分化する能力を有しており、広範な心筋脱落による心不全にも有効性が期待され、当該細胞の採取は簡易かつ安全であることから、心筋細胞再生への細胞供給源として心筋再生治療に画期的な進歩をもたらすと期待される。

### 2. 研究の目的

ADSC を用いた重症心不全に対する再生型治療法の前臨床試験として大動物実験にてその手法を確立することを目指す。すなわち、大動物心筋梗塞モデルにおいて ADSC の単離と心筋細胞への分化に関する検討を行い、本研究者が開発に携わってきた心筋シート作製の技術を用い、心筋細胞を心臓へ移植することによる効果を検討し、ADSC の心筋再生治療における有効性を明確にする。長期の観察を行うことにより心機能改善効果が継続的に得られるか否か、心筋細胞の長期生着が得られるかまたそれらが心機能の改善にいかに関与するか明らかにする。

### 3. 研究の方法

ADSC を用いた心筋再生治療法の臨床応用にむけた大動物試験を行った。

- (1) ブタ慢性虚血心不全モデル作製
  - (2) 細胞シート移植 (移植群 5 例、コントロール群 5 例)
  - (3) 組織学的、分子生物学的検討
- の 3 工程から構成され、それぞれ後述する。

#### (1) ブタ慢性虚血心不全モデル作製

クラウン種 (6 月齢、20 kg 程度) のミニブタに対し Butorphanol (0.2 mg/kg) と Medetomidine (40 µg/kg) を筋注して鎮静し、十分な換気の下、Isoflurane (3~5%) および酸素 (4 L/min) で吸入麻酔を行い心機能評価を行った。まず経胸壁心臓超音波 (PHLIPS 社製) を用いて、長軸像 M-mode で Teichholz 法により左室収縮率 (LVEF) を計測、次に二腔像もしくは四腔像 Simpson 法で LVEF を計測した。また短軸像にて、左室断面積 (EDA、ESA)、左室前後壁厚を計測した。術前心機能評価施行後、Propofol (0.20 ~ 0.25 mL/kg) で深鎮静をかけ succinylcholine (1 mg/kg) にて筋弛緩を行い経口挿管施行した。Ampicillin (500 mg) 投与後、左第 3 ~ 4 肋間開胸でブタの心臓に到達した。冠動脈 (左前下行枝) を確認し、#7 灌流領域に Sonomicrometric transducer を植え込み壁厚変化を計測した。同様にコントロールとして後壁での壁厚変化も計測した。次に Sonomicrometric transducer を心尖部・心基部・前壁・後壁に植え込み直し、Millar 社製カテーテルを用いて、左室圧および容積を測定し、PV-loop を作成し、心収縮能、拡張能を測定した。その後、左前下行枝 #7 の第一対角枝分枝後の付近にアメロイドリング (1.25 mm or 1.5 mm) を装着した。心臓内洗浄後、1-0 Vicryl plus を用いて閉胸を行い、Ampicillin (500 mg)、Atipamezole (Medetomidine の 4 倍量) 投与後、十分な覚醒を待って抜管した。アメロイドリング装着 4 週後に、同様に経胸壁心臓超音波による心機能評価により左前下行枝灌流領域を中心として左室収縮性が低下した慢性虚血心不全状態となっていることを確認した。

## (2) 細胞シート移植

すでに研究分担者らが確立している ADSC 採取 (凍結ヒト細胞 ( $2.0 \times 10^6$  cells/mL/vial) 55 歳女性乳房 oval P4)、培養法および心筋細胞への分化誘導法を用いて ADSC 由来心筋細胞シートを作製した (Okura et al. Biochem Biophys Res Commun, 859-865, 2012)。アメロイドリング装着 4 週後、慢性虚血心不全状態を確認した後、全麻下で左第 4~5 肋間開胸施行し、壁運動の低下した #7 灌流領域および健常な後壁にそれぞれ Sonomicrometric transducer を植え込み壁厚変化を計測した。次に Sonomicrometric transducer を心尖部・心基部・前壁・後壁に植え込み直し、Millar 社製カテーテルを用いて、左室圧および容積を測定し、PV-loop を作成し、心収縮能、拡張能を測定した。そして作製された心筋細胞シート ( $4.0 \times 10^6$  cells/6 cm dish) を収縮低下領域心表面に広く重層性 (3 層) に移植した。同様の閉胸操作後、免疫抑制剤 (Cyclosporine A 0.1 mg/kg) を筋注で 90 日間連日投与した。移植 12 週後、経胸壁心臓超音波にて心機能評価し、全麻下に胸骨正中切開施行し、同様に移植部位および健常部位の壁厚変化を計測後、Millar 社製カテーテルを用いて、左室圧および容積を測定し、PV-loop を作成し、心収縮能、拡張能を測定した。この時点で、深鎮静後 KCL ( $1 \sim 2$  mmol/kg) 急速静注し安楽死させた。

## (3) 組織学的、分子生物学的検討

ADSC 由来心筋シート移植群および、コントロール群各 5 例を作成し、摘出心は HE 染色、マッソントリクロム染色ならびに、特殊免疫染色を用いて、組織学的、分子生物学的検討を加えた。

## 4. 研究成果

ADSC 由来心筋シート移植群および、コントロール群はいずれも、アメロイドリング装着後に慢性虚血心不全状態を呈しており、左室駆出率および前壁の梗塞領域の局所壁運動は明らかに低下を認めていた。シート移植後 12 週後の時点で、コントロール群ではさらなる左室駆出率の低下を認めたが、シート移植群では左室駆出率および、シート移植された梗塞領域の局所壁運動の改善が認められた。

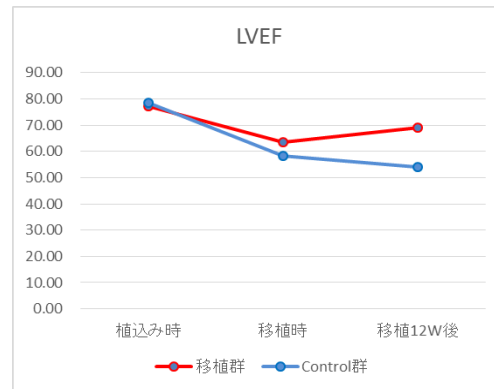


図1 心エコーによる左室駆出率の変化

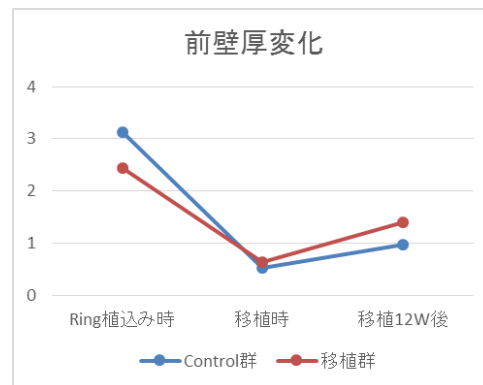


図2 Sonomicrometric transducer による左室前壁 (梗塞シート移植部位) の局所壁運動能の変化

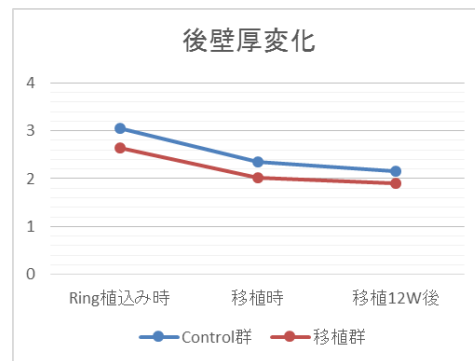


図3 Sonomicrometric transducer による左室後壁 (非梗塞健常部位) の局所壁運動能の変化

非虚血部位である後壁の局所壁運動はシート移植群とコントロール群で変化なく、アメロイドリング装着前に比べ軽度低下にとどまった。

組織学的にはシート移植部分の壁厚がコントロールに比べ増加し、シート内に線維性組織の産生、血管新生が認められた。遺残心筋は豊富には認められなかったが、現在特殊染色にて確認中である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

〔その他〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松宮 護郎 (MATSUMIYA, Goro)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：20314312

(2) 研究分担者

石田 敬一 (ISHIDA, Keiichi)  
千葉大学・大学院医学研究院・  
特任准教授  
研究者番号：40375671

黄野 皓木 (KOUNO, Hiroki)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：40375803

松山 晃文 (MATSUYAMA, Akifumi)  
独立行政法人医薬基盤研究所・難病・疾  
患資源研究部・研究リーダー  
研究者番号：10423170

石坂 透 (ISHIZAKA, Toru)  
千葉大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：10372616  
(2013年度まで研究分担者として参画)

(3) 研究協力者

太田 裕子 (OHTA, Yuko)  
千葉大学・医学部附属病院・技術補佐員