

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592072

研究課題名(和文)死体心の脱細胞化三次元細胞骨格とヒト胎児由来間葉系細胞を用いた移植心の創造

研究課題名(英文)Creation of transplant heart with decellularized heart and mesenchymal stem cell

研究代表者

北原 大翔(KITAHARA, HIROTO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70594729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は独自の心臓脱細胞化システムを構築し、効率的なブタ心臓脱細胞化法を定型化した。脱細胞化心臓の病理組織学的評価により、三次元構造を保つ細胞外マトリックスが十分に残存し、細胞成分が効果的に除去されていることを証明した。又、脱細胞化心臓を他のブタの腹部大動脈、下大静脈にそれぞれ端側吻合し異所性移植を行い、吻合可能な強度を持つ血管構造が保たれていることを証明するとともに、血管内造影検査にて冠動脈および心腔内の血流を確認した。今後、適切な再細胞化工程・移植モデルの定型化などを構築する一方で、長期における血栓化の予防などの検討を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：At present, the only treatment for severe heart failure is heart transplantation. However, shortage of donor heart has raised a long waiting list and limited its benefit. As an alternative of heart transplantation, regeneration of heart with organ decellularization technique has been applied. Our ultimate goal is to create a whole beating heart fabricated based on an organ scaffold for human heart transplantation.

A porcine heart was harvested and decellularized by perfusion. The whole-heart scaffold was transplanted in a pig by surgical anastomosis using vessel grafts. The transplanted heart scaffold was harvested on day three after transplantation. Histological report showed that blood clot was accumulated in coronary artery. However, blood perfusion was maintained through left to right intra-cardiac shunt.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：脱細胞化 再細胞化 異所性移植

1. 研究開始当初の背景

心臓の細胞移植治療に対する期待は年々高まってはいるものの未だ実用化にはほど遠いのが現状である。肝臓領域では臓器移植に代わって少ないドナーから多くの患者を救うために肝細胞移植研究が世界的に試みられたが、(IJ Fox, N Engl J Med, 1998) その長期的機能保持の限界から新しい治療法として確立するには至らなかった。この結果は細胞機能を保持する上での生体に本来あるべき細胞外マトリックス構造の重要性を示唆した。細胞外マトリックスの構成成分を融合させた肝臓動物モデルは一定の機能を発現するに至ったが(Ohashi K, Nat Med, 2007) 複雑な微細血管系や、胆汁排泄など胆管特有の機能の構築は困難であり、未だに臨床応用可能なモデルの出現を妨げている。心臓移植においても同様の問題が立ち上がる事が予想される。この状況を打破すべく本申請代表者はOttらのRat心臓を用いた脱細胞化によるマトリックスの保持・臓器の作製法に習い(Ott HC, Nat Med, 2008) 共同研究者の慶應義塾大学医学部一般・消化器外科の八木らがすでに肝臓で確立した脱細胞化・再細胞化のプロトコルを応用して、ブタ心臓の脱細胞化に成功した。

2. 研究の目的

本研究では、生体組織の脱細胞化技術を用いて作成した死体心の心臓三次元スキャフォールドに、ヒト胎児付属物(卵膜、胎盤、臍帯、子宮内膜)由来の間葉系細胞を生着させ、心筋分化誘導分子により高率な心筋分化を促すことで、移植心を作成することで、脳死ドナーに頼らない心臓移植治療の実現化を目指して研究を遂行する。ヒト胎児付属物由来間葉系細胞と心筋分化誘導分子を用いることで、心筋への分化誘導効率の向上が得られ、ポンプ機能に優れた移植心が得られる。心臓移植において深刻かつ最大の問題である移植心不足の解消への切り札として移植心の創造をゴールとする。

3. 研究の方法

最適な脱細胞化のプロトコルを得られるよう、温度、流速、圧など環境の計測を行える独自の効率的なシステムを開発し(図1)この脱細胞化システムを用いて、チャンバー内での心臓の脱細胞化を定型化している(図2)



図1. 脱細胞化システム(ローラーポンプ、圧モニター、冷温水槽、マイクロフィルタ、心臓容器)

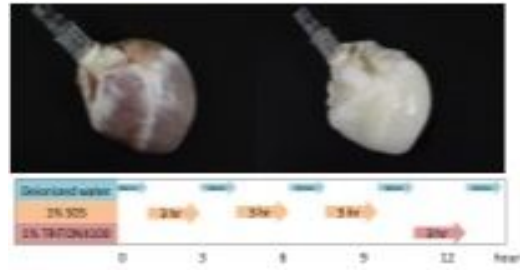


図2. 心臓脱細胞化過程

得られた脱細胞化心臓三次元細胞骨格が細部に渡り十分に細胞を保持するマトリックス構造を有しているか、吻合可能な強度を持つ血管構造が保たれているか、これまで評価されていない内部血管構造の詳細について、遺残DNA解析・免疫染色・電子顕微鏡を用いて評価してきた。

4. 研究成果

脱細胞化心臓の病理組織学的評価により、三次元構造を保つ細胞外マトリックスが十分に残存し、細胞成分が効果的に除去されていることが示された。又、脱細胞化心臓を他のブタの腹部大動脈、下大静脈にそれぞれ端側吻合し異所性移植を行い(図3)吻合可能な強度を持つ血管構造が保たれていることを証明するとともに、血管内造影



図3. 脱細胞心臓の異所性移植

検査にて冠動脈および心腔内の血流を確認した(図4)。今後、適切な再細胞化工程・移植モデルの定型化などを構築する一方で、長期における血栓化の予防などの検討を行う予定である。

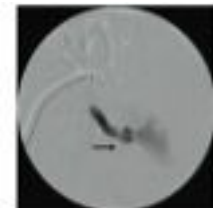


図4. 移植後血管内造影検査

今後の研究内容について言及する。

(1) 血管内皮細胞の再細胞化による移植心の作製

先の研究で確立されたプロトコルをもとに脱細胞心臓を作成。清潔環境下での培養液の還流ルートを経冠動脈的に構築し、ブタ心臓細胞骨格に段階的に血管内皮細胞を注入し再内皮細胞化を行う。再細胞化後の病理学的評価から生着率の検討を行い、心臓三次元細胞骨格への培養方法の標準化をはかる。

(2) 再内皮細胞化心臓 3次元細胞骨格の異所性移植

得られた再内皮細胞化心臓を他ブタの腹部大動脈・下大静脈間に異所性移植して、生体内での耐圧能、血管の疎通性についての検討を、移植心臓の上行大動脈にあらかじめ留置しておいた pigtail カテーテルによる血圧測定・移植心冠動脈造影検査にて行う。移植心臓を採取し、冠動脈の開存度、内皮細胞の生着度に関して病理学的に評価を行う。

(3) 間葉系細胞の生着・分化による心筋の再生

ヒト胎児付属物由来の間葉系幹細胞を使用し、心臓 3次元細胞骨格への生着、培養、心筋への分化誘導を生体外、及び生体内の移植心臓を培地として用いて行う。共同研究者の岡本は既に骨髄、子宮内膜、月経血、羊膜、臍帯血等の組織から 30 種類以上のヒト間葉系幹細胞の樹立法を確立している(図 5. Okamoto K, Exp Cell Res, 2007)。脱細胞心臓細胞骨格が心筋細胞の生着、培養に適した培地であるかを病理学的手法により検証する。移植心筋に微小電極を縫着し、電気学的刺激による反応を測定する。

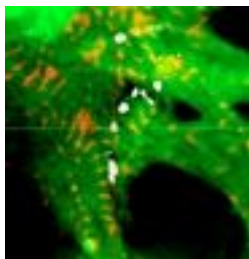


図 5. 間葉系幹細胞

(4) 心臓移植の治療効果の検討

移植心臓の生体内での心機能の生理学的評価を行う。移植後の生着、機能発揮、組織構築能に関する検討、重症心不全モデルへの心臓移植後の心機能の評価により、心臓 3次元細胞骨格と血管内皮細胞、間葉系細胞分化心筋細胞で作製した心臓を用いた心臓移植の臨床応用を裏付ける基礎データを蓄積する(図 6)。

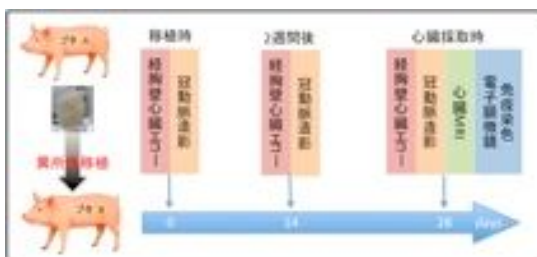


図 6. 移植後の評価

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 8 件)

1. Yoshitake A, Hachiya T, Itoh T, **Kitahara H**, Kasai M, Kawaguchi S, Shimizu H. Nonvisualized Type III Endoleak Masquerading as Endotension: A Case Report. Ann Vasc Surg. 2015;29(3):e15-7. 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=25596403>

2. **Kitahara H**, Kudo M, Okamoto M, Inaba Y, Sasaki A, Shimizu H. Management of Right Atrial Hemangioma in a Patient with Antithrombin Deficiency. Ann Thorac Surg. 2015;99(3):e53-5. 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=25742857>

3. Iida Y, Ito T, **Kitahara H**, Takebe M, Nemoto A, Nagumo M, Saito K, Yamaya T, Kanno H, Misumi T. A Case of In-Site Reconstruction with a Rifampicin-Bonded Gelatin-Sealed Woven Dacron Graft for Prosthetic Graft Infection with Pseudoaneurysms after Ascending Aortic Replacement for Type A Dissection. Ann Vasc Dis. 2014;7(1):68-71. 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=24719667>

4. Kudo M, Yozu R, **Okamoto K**. Recurrent Mitral Regurgitation Due to Rupture of PTFE Neochordae after Mitral Valve Repair by the Loop Technique: A Report of Case. Ann Thorac Cardiovasc Surg. 2014 Jan 15. 査読有

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Recurrent+Mitral+Regurgitation+Due+to+Rupture+of+PTFE+Neochordae+after+Mitral+Valve+Repair+by+the+Loop+Technique+A+Report+of+Case>

5. Misfeld M, Borger M, Byrne JG, Chitwood WR, Cohn L, Galloway A, Garbade J, Glauber M, Greco E, Hargrove CW, Holzhey DM, Krakor R, Loulmet D, Mishra Y, Modi P, Murphy D, Nifong LW, **Okamoto K**, Seeburger J, Tian DH, Vollroth M, Yan TD. Cross-sectional survey on minimally invasive mitral valve surgery. *Ann Cardiothorac Surg*. Nov 2013;2(6):733-738. 査読有

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cross-sectional+survey+on+minimally+invasive+mitral+valve+surgery>

6. Iida Y, Ito T, **Kitahara H**, Takebe M, Nemoto A, Shimokawa R, Yoshitake A, Misumi T. Successful Detection and Surgical Treatment of Cardiac Hemangioma With Right Ventricular Invasion. *Ann Thorac Surg*. 2013 Oct;96(4):1481-3. 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=24088470>

7. Kimura T, Miyoshi S, **Okamoto K**, Fukumoto K, Tanimoto K, Soejima K, et al. The effectiveness of rigid pericardial endoscopy for minimally invasive minor surgeries: cell transplantation, epicardial pacemaker lead implantation, and epicardial ablation. *Journal of cardiothoracic surgery*. 2012 Nov 9;7(1):117. 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The+effectiveness+of+rigid+pericardial+endoscopy+for+minimally+invasive+minor+surgeries%3A+cell+transplantation%2C+epicardial+pacemaker+lead+implantation%2C+and+epicardial+ablation.>

8. Aeba R, Kudo M, **Okamoto K**, Yozu R. Bridging annuloplasty for left atrioventricular valve of partial atrioventricular septal defect. *Ann Thorac Surg*. 2012 May;93(5):e137-9. 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bridging+annuloplasty+for+left+atrioventricular+valve+of+partial+atrioventricular+septal+defect.>

〔学会発表〕(計 10件)

1. Investigation of predictive value for aortic regurgitation after transcatheter aortic valve implantation. **Kitahara H**, Yoshitake A, Hachiya T, **Okamoto K**, Kawaguchi S, Inaba Y, Hayashida K, Inohara T, Yashima F, Fukuda K, Shimizu H. *Complex Cardiovascular Therapeutics*, 2014/10/30~2014/11/1 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

2. 工藤 樹彦, **岡本 一真**, 川口 新治, **北原 大翔**, 平野 暁教, 稲葉 佑, 林 可奈子, 山川 輝記. 高齢者僧帽弁閉鎖不全症に対する手術手技選択: 第一選択は僧帽弁形成. 第67回日本胸部外科学会定期学術集会 2014/10/2 福岡国際会議場・福岡サンパレスホテル/ホール(福岡県博多市)

3. **岡本 一真**, **北原 大翔**, 川口 新治, 灰田 周史, 稲葉 佑, 林 加奈子, 山川 輝記, 四津 良平, 工藤 樹彦. 右小開胸心臓手術の積極的標準手術化. 第67回日本胸部外科学会定期学術集会 2014/10/1 福岡国際会議場・福岡サンパレスホテル/ホール(福岡県博多市)

4. Endovascular Treatment For Primary Aortobronchial Fistulas
Kitahara H, Yoshitake A, Hachiya T, Kawaguchi S, Haida H, Hirano A, Shimizu H. The 67th Annual Scientific Meeting of The Japanese Association for Thoracic Surgery, 2014/9/30~2014/10/3 福岡国際会議場・福岡サンパレス & ホテル(福岡県博多市)

5. **Kazuma Okamoto**. The use of Loop in Loop technique in mitral valve repair
2014 Shanghai Heart Valve Summit,
2014/6/29, TBA (To Be Announced) / TBC
(To Be Confirmed) (Shanghai/China)

6. **Kazuma Okamoto**, Mikihiko Kudo, Mio Kasai, Akinori Hirano, Takahito Ito, Shinji Kawaguchi, Ryohei Yozu, **Hiroto Kitahara**, Video-assisted right minithoracotomy cardiac surgery as a routine approach, 17th Annual Meeting International Society for Minimally Invasive Cardiothoracic Surgery (ISMICS), 2014/5/28, Marriott Copley Place(Boston/America)

7. Surgical treatment for annuloaortic ectasia with marfan syndrome
Kitahara H, Shimizu H, Yoshitake A, Kawaguchi S, Ito T, Hirano A, Kasai M, Yozu R. The 42nd Annual Meeting of Japanese Society for Vascular Surgery, 2014/5/21~2014/5/23 リンクステージョンホール青森【青森文化会館】・ホテル青森(青森県青森市)

8. Comparison between Transcatheter and Minimally Invasive Surgical Closure of Secundum Atrial Septal Defect in Adults.
Masaki Kodaira, **Kazuma Okamoto**, Akio Kawamura, Kentaro Hayashida, Shinsuke Yuasa, Yuichiro Maekawa, Rhohei Yozu, Keiichi Fukuda. Euro PCR 2014 2014/5/21, Paris

4. Surgical Treatment for an Infective Endocarditis with Aortic Annular Abscess

9. **岡本一真** 工藤樹彦 川口新治 **北原大翔** 伊藤隆仁 平野暁教 河西未央 四津良平 人工腱索再建を軸にした僧帽弁形成を実現する 'Loop-in-Loop'Technique ビデオワークショップ3「房室弁形成術.新生児から高齢者まで。」第114回日本外科学会定期学術集会 2014/4/4 国立京都国際会館 (京都府京都市)

10.Kitahara H, Kudo M, Shimizu H, **Okamoto K**, Kawaguchi S, Ito T, Hirano A, Kasai M, Yozu R.22nd Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery, 2014/4/3~2014/4/6 ISTANBULCOVENTION &EXHIBITION(ISTANBUL)

6 . 研究組織

(1)研究代表者
北原 大翔 (KITAHARA HIROTO)
慶應義塾大学医学部・助教
研究者番号：70594729

(2)研究分担者
岡本 一真 (OKAMOTO KAZUMA)
慶應義塾大学医学部・講師
研究者番号：10338064