

骨髄間葉系幹細胞移植による心不全改善機序に関する基礎的研究

分担研究者 盛 英三 国立循環器病センター研究所 心臓生理部 部長
永谷 憲歳 国立循環器病センター研究所 再生医療部 部長

骨髄間葉系幹細胞 (MSC) は種々の細胞への多分化能を有し、再生治療の細胞源として期待できる。我々は同細胞を心筋組織中に移植することにより心筋・血管が再生し、また拡張型心筋症や心筋梗塞の動物モデルにおいて心機能を改善することを明らかにした。しかし、これらモデルにおいて心機能が改善する機序は不明であり、今後の解明を必要とする。我々は今回、MSC を急性心筋梗塞モデルの境界領域に移植し、MSC が形態的にも機能的にも成熟した心筋細胞を再生すること、MSC が移植部位周囲の心筋組織にパラクライン的に作用し、残存心筋細胞のアポトーシスを抑制すること、心筋細胞の増殖を促進すること等を証明した。また MSC は VEGF, HGF, IGF-1, SDF-1 α 等の血管新生作用、抗アポトーシス作用のあるサイトカインを大量に分泌し、周囲心筋組織に対し、上記のようなパラクライン効果を及ぼしていると考えられた。

A. 研究目的

骨髄間葉系幹細胞 (MSC) は心筋細胞・血管内皮細胞・血管平滑筋細胞等、種々の細胞への多分化能を有する細胞である。我々はこれまでに MSC を心筋組織中に移植すると①心筋や血管が再生すること、②心筋梗塞、拡張型心筋症モデルにおいて心機能を改善することを明らかにした (Nagaya N et al. *Circulation* 2005;112:1128-1135)。しかし、これら動物モデルにおいて MSC 移植が心機能を改善する機序については明らかでない。今回我々は、その機序を解明するため、①MSC より再生される心筋細胞の収縮機能、②MSC が移植部位周囲の心筋組織に及ぼすパラクライン効果とその機序について検討した。

B. 研究方法

Mesenchymal stem cells (MSC)

Green fluorescent protein (GFP) transgenic rat の骨髄細胞を採取し、ディッシュ付着細胞を培養・増殖後、細胞移植に使用した。

ラット心筋梗塞モデル

180-200g の雌 SD ラットの左冠動脈を結紮することにより心筋梗塞モデルを作製した。

細胞移植

冠動脈結紮後 1 時間にて梗塞心筋の境界領域の心筋組織内に 26G 注射針を用い、 5×10^6 cells の

GFP 陽性の MSC を細胞移植した。

単一心筋細胞の分離

細胞移植後 1 週間においてラット心臓を摘出後、大動脈より冠動脈を介し、酵素溶液 (コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ) を心筋組織中に灌流することにより単一心筋細胞を分離した。

単一心筋細胞の収縮機能

心筋細胞を蛍光顕微鏡下に電気刺激し、edge detection 法にて心筋細胞長を連続記録することにより心筋細胞の収縮能を測定した。

MSC によるパラクライン効果の機序の検討

(1) 移植部位周囲の心筋細胞のアポトーシスに対する効果を検討した (TUNEL 法)。

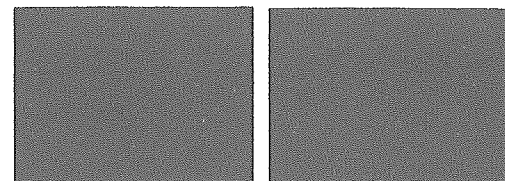
(2) 移植部位周囲の心筋細胞の増殖に対する効果を検討した (Ki-67 染色)。

(3) MSC より分泌されるサイトカインを測定した (ELISA 法)。

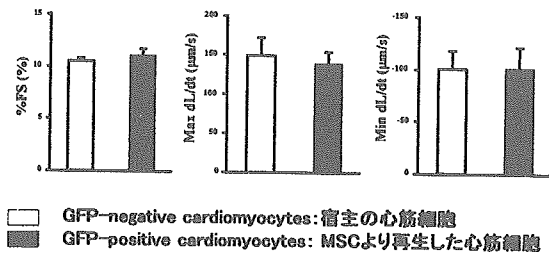
C. 研究結果

(1) MSC は形態的にも機能的にも成熟した心筋細胞を再生した (図1, 図2)。

(図1) MSC より再生した GFP 陽性の心筋細胞

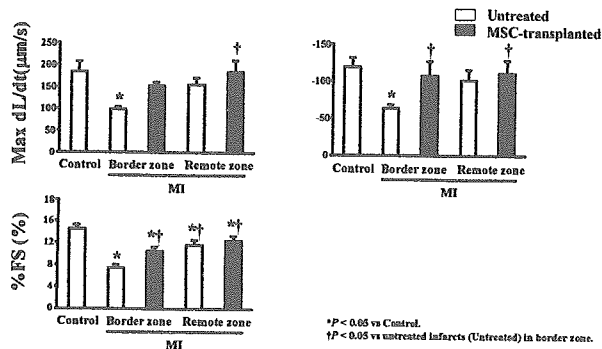


(図 2) MSC より再生した心筋細胞の収縮機能



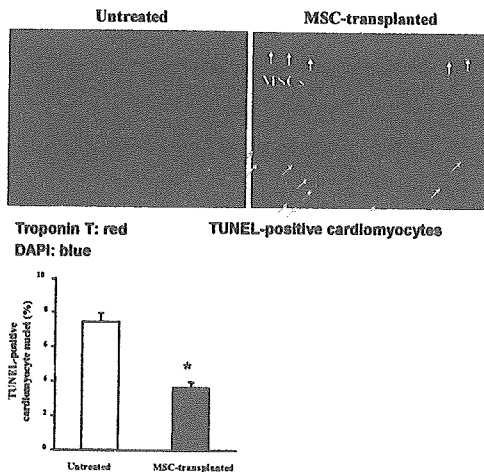
(2) MSC は心筋梗塞モデルにおいて移植部位周囲の残存心筋細胞の収縮機能を改善した(図3)。

(図3) 心筋梗塞後の残存心筋細胞の収縮機能に対する MSC のパラクライン効果



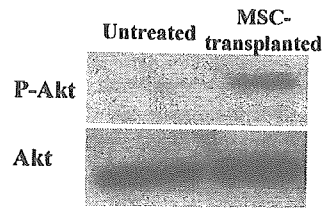
(3) MSC は移植部位周囲の残存心筋細胞のアポトーシスを抑制した(図4)。

(図4)



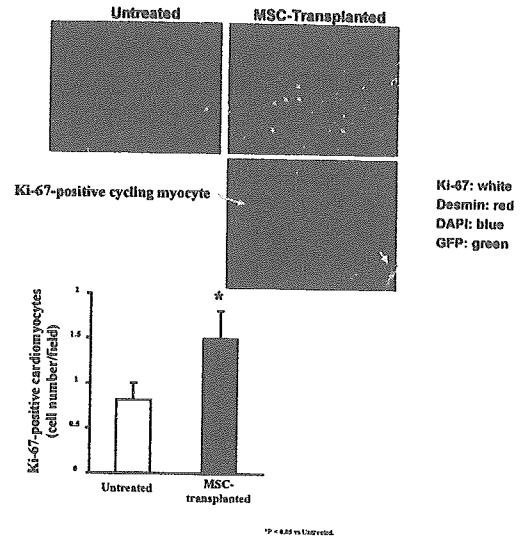
(4) MSC は移植部位の Akt 活性を高めることにより心筋細胞のアポトーシスを抑制したと考えられた(図5)。

(図5) MSC 移植部位の Akt 活性



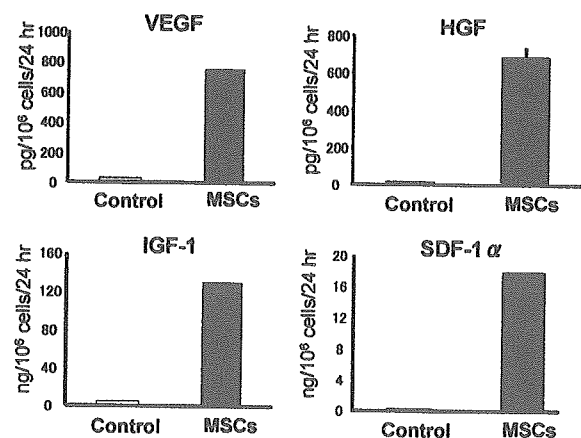
(5) MSC は、移植部位周囲の心筋細胞の増殖を促進した(図6)。

(図6) MSC 移植部位の増殖心筋細胞 (Ki-67 陽性心筋細胞)



(6) MSC は VEGF・HGF・IGF-1・SDF-1 α 等の血管新生作用、抗アポトーシス作用のあるサイトカインを多量に分泌し、周囲心筋組織に対し、上記のようなパラクライン効果を及ぼしていると考えられた(図7)。

(図7)



D. 考察

① MSC が形態的にも機能的にも成熟した心筋細胞を再生すること、② MSC が移植部位周囲の心筋組織にパラクライン的に作用し、心機能を改善する

ことを証明した。移植した MSC が再生する心筋細胞数は比較的少ないため、①のみでは心機能改善機序の説明が困難であり、②の機序、すなわち MSC によるパラクライン効果が心機能改善の機序として重要と考えられた。

E. 結論

MSC は形態的にも機能的にも成熟した心筋細胞を再生した。MSC は VEGF, HGF, IGF-1, SDF-1 等のサイトカインを分泌することにより移植部位周囲の心筋細胞にパラクライン的に作用し、心筋細胞のアポトーシスを抑制し、また心筋細胞の増殖を促進し、心不全心筋の心機能を改善したと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2005;112:1128-1135.

2) Fujii T, Nagaya N, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Nishigami K, Ishibashi-Ueda H, Shirai M, Itoh T, Ishino K, Sano S, Kangawa K, Mori H. Adrenomedullin enhances therapeutic potency of bone marrow transplantation for myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H1444-H1450.

3) Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Ishibashi-Ueda H, Yamagishi M, Miyatake K, Matsumoto T, Kitamura S, Kangawa K. Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia. *Circulation* 2005;11:356-362.

2. 学会発表

1) Tanaka K, Nagaya N et al. Bone marrow mesenchymal stem cells not only regenerate

functional cardiomyocytes but also have paracrine effects on resident cardiomyocytes in the infarcted myocardium. Scientific sessions 2005, American Heart Association, 2005, Dallas, USA.

2) Tanaka K, Mori H, Nagaya H. Mesenchymal stem cells not only regenerate functional cardiomyocytes but also have paracrine effects on resident myocytes in the infarcted myocardium. 第 70 回日本循環器学会学術総会、2006、名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

間葉系幹細胞移植と IGF-1 の併用療法

分担研究者 宮武邦夫 大阪南医療センター 院長

研究要旨 梗塞後心不全モデルにおいて、間葉系幹細胞（MSCs）移植時にインスリン様増殖因子（IGF-1）を併用皮下投与すると、MSC 移植単独治療よりも高い心機能改善効果が得られた。これらの効果は、IGF-1 の持つ抗アポトーシス作用及び細胞増殖促進作用により、虚血心筋内に移植した MSCs の生着率を増加させたことによると考えられた。IGF-1 の皮下投与はすでに臨床でも行われていることを考慮すると、IGF-1 投与は細胞移植の効果増強法として有効な治療手段となる可能性がある。

A. 研究目的

失われた心筋組織を再生させる目的で、近年骨髄細胞移植が試みられるようになってきた。心筋細胞や血管内皮細胞への分化能を持つ間葉系幹細胞（MSCs）は、体外で容易に分離・培養できる体性幹細胞であり、細胞移植治療の有望な細胞ソースの一つとして期待されている。しかし、移植後の MSCs の生着率が低いために心機能改善効果には限界がある。インスリン様増殖因子（IGF-1）は様々な細胞の増殖、生存及び分化に関わるポリペプチドで、特にその強力な抗アポトーシス作用で知られる。虚血性及び拡張型心筋症モデルに IGF-1 を投与すると、心筋細胞のアポトーシスを抑制することが証明されている。そこで、我々はラットの急性心筋梗塞モデルを用いて、MSCs 移植と IGF-1 の併用効果について検討した。

B. 研究方法

ラットの大腿骨から採取した少量の骨髄液を培養し、増殖させることにより MSCs を得た。ラットの左冠動脈結紮 1 時間後に 5×10^6 個の MSCs を梗塞周囲心筋に直接注入し、引き続き IGF-1 を 2mg/kg/day で 14 日間投与した。術後 4 週間目に心エコー、心カテーテル及び組織学的検討を行った。また、MSCs に対する IGF-1 の作用機序を明らかにするために、RT-PCR、Western blotting、MTS 及び TUNEL Assay 等の *in vitro* 研究を施行した。

C. 研究結果

梗塞 4 週間後に MSCs 移植と IGF-1 の併用治療群は、それぞれの単独治療群に比して有意に梗塞領域を減少させ、心収縮力及び拡張能においても優れた改善効果を示した。組織学的検討では、併用治療群の移植 MSC の生着率が MSCs 単独治療群に対して約 50% 増加した。免疫組織染色では、生着した MSCs の 30% は心筋特異的酵素である troponin T 陽性であり、血管内皮特異的な von Willbrand 因子陽性の MSCs も 30% 認めた。しかし、IGF-1 投与により、これらの率は変化しなかった。

In vitro では MSCs に IGF-1 レセプターの mRNA の発現を認めた。Western blotting では、増殖及びアポトーシスに深く関わる phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) と mitogen-activated protein kinase kinase-1 (MEK1) シグナル経路において、それぞれ中心的な役割を果たす Akt 及び ERK1/2 のリン酸化を強く認めた。更に、MTS 及び TUNEL Assay により、IGF-1 が MSCs に対して濃度依存性の増殖促進効果及び抗アポトーシス効果を示した。しかもこれらの効果は、Akt 及び ERK1/2 の inhibitor である wortmannin 及び PD98059 を培養液中に加えることで著明に抑制された。

D. 考察

In vivo 及び *in vitro* の結果より、IGF-1 は移植 MSCs の増殖を促進、アポトーシスを抑制するこ

とで生着率を増大させ、その結果 MSCs 移植の心機能改善効果を増強することが確認された。また、これらの効果は PI3k-Akt 及び MEK-ERK1/2 シグナル経路を介したものであることも明らかになった。最近、遺伝子組換え技術により、Akt 遺伝子を過剰発現させた MSCs をラット急性心筋梗塞モデルに移植することで MSCs の生着率が著明に増大し、MSCs の心筋保護効果により心機能がほぼ正常化したという報告がなされた (Mangi AA et al Nat Med 2003;9:1195-201)。この戦略は、強力な survival factor である Akt の活性化という点で、我々の IGF-1 併用療法と共通するものである。我々は、成長ホルモン欠乏症や小人症等で既に臨床での使用実績がある IGF-1 を単に皮下投与することで、同等の効果を得ることができた。更に、MSCs 移植と IGF-1 の併用療法は、移植細胞と宿主残存心筋の両者に対して抗アポトーシス・増殖促進効果が得られる利点がある。IGF-1 の皮下投与はすでに臨床でも行われていることを考慮すると、IGF-1 投与は細胞移植の効果増強法として有効な治療手段となる可能性がある。

E. 結論

心筋梗塞後不全心に対する MSC 移植に IGF-1 投与を併用投与すると、PI3K-Akt 及び MEK1-ERK1/2 シグナル経路を介して移植した MSC の生着率が高まり心機能改善効果が増強されることが明らかとなった。IGF-1 投与は細胞移植の効果増強法として有効な手段となる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Ishino K, Miyatake K, Sano S, Kitamura S, Mori H. Insulin-like Growth Factor-1 Enhances Therapeutic Potency of Mesenchymal Stem Cell Transplantation for Myocardial Infarction. Journal of American Colleague of Cardiology (revised).
2. Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Ishibashi-Ueda H, Yamagishi M, Miyatake K, Matsumoto T, Kitamura S, Kangawa K. Adrenomedullin Enhances

Angiogenic Potency of Bone Marrow Transplantation in a Rat Model of Hindlimb Ischemia. Circulation. 2005; 111(3): 356-362

3. Hanabusa K, Nagaya N, Iwase T, Itoh T, Murakami S, Shimizu Y, Taki W, Miyatake K, Kangawa K. Adrenomedullin Enhances Therapeutic Potency of Mesenchymal Stem Cells After Experimental Stroke in Rats. Stroke. 2005; 36(4): 853-858
4. Nagaya N, Kangawa K, Otoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S. Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in a Rat Model of Dilated Cardiomyopathy. Circulation. 2005; 112(8): 356-362
5. Nagaya N, Itoh T, Murakami S, Oya H, Uematsu M, Miyatake K, Kangawa K. Treatment of Cachexia With Ghrelin in Patients With COPD*. CHEST. 2005; 128(3): 1187-1193
6. Maruo T, Nakatani S, Kanzaki H, Kakuchi H, Yamagishi M, Kitakaze M, Ohe T, Miyatake K. Circulation variation of endothelial function in idiopathic dilated cardiomyopathy. Am J Cardiol. 2006 Mar 1; 97(5): 699-702. Epub 2006 Jan 9

2. 学会発表

宮原義典、宮武邦夫、永谷憲歳、盛英三：Insulin-like Growth Factor-1 Enhances Therapeutic Potency of Mesenchymal Stem Cell Transplantation for Myocardial Infarction. 第70回記念日本循環器学会学術集会（2006年3月25日）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

研究協力者

永谷憲歳（国立循環器病センター再生医療部）

盛英三（国立循環器病センター心臓生理部）

間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生療法 心疾患への応用

分担研究者 中谷武嗣 国立循環器病センター臓器移植部

研究要旨 左心補助人工心臓（LVAS）装着を必要とする末期的心不全患者における自己心機能を検討し、77例中7例で自己心機能の改善が得られLVASより離脱した。間葉系幹細胞移植を併用により離脱可能例の増加が期待される。

A. 研究目的

左心補助人工心臓（LVAS）装着を必要とする末期的心不全患者の自己心機能回復に対する間葉系幹細胞移植の効果を検討する。

B. 研究方法

心臓移植対象で、心不全増悪によりLVAS装着を必要とする患者において、LVAS装着後の自己心機能の推移を検討する。心機能の改善が得られた症例では離脱を試みる。また、離脱不可能例では付加療法の可能性を検討する。

（倫理面への配慮）

患者、家族に充分インフォームドコンセントを行なう。

C. 研究結果

これまで77例の慢性心不全急性増悪例に対し、各種LVAS装着を行ない、7例で計画的離脱が可能であった。、離脱不能例においても、拡張型心筋症例で心機能回復傾向を認める症例があった。

D. 考察

離脱例は全例拡張型心筋症の若年者で、1例はIGF-1併用で離脱可能となった。間葉系幹細胞移植の併用効果の検討が必要である。

E. 結論

LVAS装着を必要とする末期心不全患者において、間葉系細胞移植を併用効果が期待される。

F. 健康危険情報

現状では特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 中谷武嗣、永谷憲歳、富田伸司：心筋再生。
総合臨牀 54:91-97, 2005.
- ② 中谷武嗣：日本における心臓移植の現況。今日の移植 18:287-293, 2005.
- ③ Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Yutani C, Kitamura S. Endogenous bone-marrow-derived stem cells contribute only a small proportion of regenerated myocardium in the acute infarction model. J. Heart Lung Transplant. 24:67-72, 2005.

2. 学会発表

- ① 中谷武嗣、庭屋和夫、花谷彰久、小林順二郎、坂東 興、田鎖 治、中嶋博之、今中秀光、塚野慎也、津田悦子、光武耕太郎、宮田茂樹、真野暁子、八木原俊克、北村惣一郎：Management of pre-and post-heart transplant patients at National Cardiovascular Center. 第58回日本胸部外科学会定期学術集会、岡山、10.5-7, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：研究協力者

加藤倫子 国立循環器病センター臓器移植部
真野饒子 国立循環器病センター臓器移植部
庭屋和夫 国立循環器病センター心臓血管外科

間葉系細胞シート移植による小児心不全治療の開発

分担研究者 八木原 俊克 国立循環器病センター心臓血管外科

研究要旨 従来の心筋内直接注入による細胞移植法では、移植細胞が心筋組織内で散乱し、その多くが長期間生存できないため心機能改善効果は少ない。そこで、単層間葉系幹細胞シート移植の不全心筋への効果を動物実験で検討した。今後、大動物による前臨床試験を経て、薬物・手術治療が有効でない終末期小児心不全患者への臨床応用を行っていく。

A. 研究目的

失われた心筋組織を再生させる目的で、これまで心筋内直接注入による細胞移植法が報告されているが、この方法では移植細胞が心筋組織内で散乱し、その多くが長期間生存できないため心機能改善効果は少ない。当センター研究所再生医療部では、温度応答性培養皿を用いて単層間葉系幹細胞シートの開発を行い、これを不全心筋に貼付し、心機能及び予後改善への有効性を研究してきた。そこで我々は、同部と協力しこの細胞シート移植技術の小児心不全治療への応用を検討する。小児への心筋組織再生療法を考慮するとき、成人に比して心筋量が少ないため、細胞シート移植で大きな治療効果が得られる可能性がある。対象疾患としては、薬物・手術治療が有効でない小児心不全患者を予定している。

B. 研究方法

皮下脂肪組織からの間葉系幹細胞を用いた細胞シートを作成し、ラット心筋梗塞モデルへの移植により、心不全に対する単層間葉系細胞シートの有効性とその改善機序の解析を行った。

さらに、前臨床試験として成長過程を観察できる幼少なブタ慢性心不全モデルを用いて、単層間

葉系幹細胞シート移植の安全性・有効性を検証し、小児心不全治療のための細胞シート移植治療の技術を確立する。

C. 研究結果

ラット心筋梗塞モデルへの移植では間葉系幹細胞シートは移植後速やかに生着し、血管内皮増殖因子（VEGF）や肝細胞増殖因子（HGF）などの増殖因子を多く分泌した。これに加えて、自身の血管内皮・平滑筋細胞への分化能により、移植グラフト内に多くの血管網を構築、わずかな心筋分化も伴いながら、約600 μ mにおよぶ厚い組織を形成した。間葉系幹細胞シートは梗塞領域の壁厚を増し、心不全ラットの収縮・拡張能を改善、致死的不整脈を生じることもなく、生命予後を有意に改善させた。

この小動物モデルでの研究結果を踏まえて、幼少なブタ慢性心不全モデルを用いての前臨床試験を予定している。

D. 考察

間葉系幹細胞シートは高い血管新生因子分泌能をもつため、自身の血管組織への分化のみならず、宿主の細胞を誘導することで新生血管網を構

築する。その結果、移植部位の厚みが増し、拡張期の wall stress が減少することで、心機能が改善したと考えられる。また、間葉系幹細胞のソースとして用いられた皮下脂肪組織からの間葉系幹細胞は、高い増殖能をもち、脂肪吸引等の低侵襲な手技により、かつ少量の採取でシートへの応用が可能である。

小児領域においても、先天性心奇形、血管奇形や心筋症により、薬剤や手術療法が有効でない重症心不全例が存在し、間葉系幹細胞シート移植はこれらの患児への新たな治療法として大いに期待できる。

E. 結論

脂肪由来間葉系幹細胞シート移植は、心不全の進行を遅らせ、生命予後を著明に改善しうる画期的な治療法となる可能性があり、薬物・手術治療が有効でない小児心不全患者への応用が期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

①小林順二郎 冠疾患手術の現状と将来展望
心臓血管麻酔の進歩 2005;1:255-265

②中嶋博之、小林順二郎、田鎖治、北村惣一郎 冠動脈バイパス術の進歩 外科治療 2005;92:447-452

③Nakajima H, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K, Niwaya K, Kitamura S. Functional angiographic evaluation of individual, sequential, and composite arterial grafts. Ann Thorac Surg. 2006;81:807-14.

④Matsuura K, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K, Niwaya K, Nakajima H, Yagihara T, Kitamura S.

Off-pump coronary artery bypass grafting using only arterial grafts in elderly patients. Ann Thorac Surg. 2005 Jul;80(1):144-8.

⑤小林順二郎 Editorial comment 遠隔期開存性からみた OPCAB におけるグラフト選択 心臓 2005;37:36-7

2. 学会発表

①小林順二郎 current status of OPCAB in National Cardiovascular Center 18th Annual meeting of World Society of Cardiothoracic Surgeons 長野 2005.7.7

②田鎖治、小林順二郎、坂東興、庭屋和夫、中嶋博之、中谷武嗣、八木原俊克、北村惣一郎 Total arterial OPCAB-pitfalls and tips. Symposium 第35回日本心臓血管外科学会静岡

③Nakajima H, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K, Niwaya K, Miyazaki S, Yagihara T, Kitamura S. Reversal and competitive flow in arterial composite grafts; The crucial role of interactions of sequenced anastomotic site. Oral Annual Meeting of the Society of Cardiothoracic Surgeons of Great Britain and Ireland, UK, 2005.3.6

④Nakajima H, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K, Niwaya K, Miyazaki S, Yagihara T, Kitamura S. Reversal and competitive flow in arterial composite grafts: The effect of graft arrangement for prevention. Plenary session, 4th EACTS-ESTS Joint Meeting, Spain. 2005.9.26

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

研究協力者

永谷憲歳

心臓超音波による経皮的細胞移植の機能評価に関する研究

分担研究者 山岸正和 金沢大学大学院医学系研究科・循環器内科学

研究要旨 本研究では、臨床レベルにおけるヒト内皮前駆細胞の障害心筋への移植の臨床応用を目指、安全性の検証と共に、治療前後での心機能の評価から、臨床応用への途を開かんとするものである。本年度は心臓超音波エコー法により、細胞移植前後での心臓機能評価を行い、本治療法の有効性の検討を試みたものである。その結果、骨髄間葉系幹細胞の心筋移植により、臨床例でも心機能の改善を認めた。今後は局所機能の変化や長期に渡る効果についての検証を進める必要がある。

A. 研究目的

拡張型心筋症や拡張相肥大型心筋症は、病態が進行すると著しい心機能の低下に伴う治療抵抗性の心不全を合併する。これは、心移植を施行しなければ予後不良であり、また例え、心不全急性期に救命し得ても、慢性期でのカテコラミンの持続投与や補助循環からの離脱が困難なことが多く、社会復帰の面でも問題視されてきた。心筋症の病態進展においては、未だ原因不明の局所細胞の障害、消失が第一義的に重要であるが、同一人より採取可能な間葉系細胞を効率よく移植可能となれば、心機能の改善が期待される。最近、動物実験レベルでは、間葉系細胞を障害心筋に移植すると、局所機能の改善が認められることが明らかとなった。本研究では、臨床レベルにおけるヒト内皮前駆細胞の障害心筋への移植の臨床応用を目指、安全性の検証と共に、治療前後での心機能の評価から、臨床応用への途を開かんとするものである。本年度は心臓超音波エコー法により、細胞移植前後での心臓機能評価を行い、本治療法の有効性の検討を試みた。

B. 研究方法

骨髄間葉系幹細胞移植の適応と判定された症例

を対象とした。本治療前、治療一週間後、1ヶ月後の心臓機能を心臓超音波エコーで解析した。今回は、通常的手法に加えて、組織ドプラ法を応用した、心臓僧帽弁輪移動速度から心臓収縮能を評価した。

C. 研究結果

僧帽弁輪移動速度は一例では、治療1週間後から増加し、1ヵ月後でもこれを維持した。他例では治療一週間後に一旦移動速度の低下をみたが、自覚症状の改善と共に、1ヵ月後には増加に転じた。

D. 考察

本研究者は、これまで心臓疾患画像診断の分野での研究を進めてきた。中でも、超音波法を用いての心機能評価の分野では、新手法を開発するなど、この分野での主導的役割を果たしてきた。今回は、これらの難治性心不全患者から、細胞移植適応症例を抽出し、細胞移植前後での心機能の変化を、超音波法を用い検証したものである。その結果、臨床例においても、動物モデルで観察されたように、細胞移植治療後に心臓収縮機能の改善をみた。今回は、局所心機能については解析しなかったが、今後はことに細胞移植部位を中心とした局所機能の変化について評価を進める必要がある。

間葉系細胞移植による心筋虚血血管再生療法の臨床評価

分担研究者 小林順二郎 国立循環器病センター 心臓血管外科部長

研究要旨 従来の治療法で改善困難な領域を有する重症虚血性心疾患患者を対象として、冠動脈バイパス術による外科的血行再建と同時に、自己骨髄より採取培養された間葉系細胞の移植を行う。虚血や心機能への効果と本治療法の安全性を評価する。これまで2例に同方法にて移植を行った。死亡、合併症はなく、有害事象も生じていないことから安全性には問題は無いものと考えられた。有効性の確立には更なる症例の蓄積と経過観察が必要である。

A. 研究目的

従来の治療法では改善困難な心筋虚血に対し自己骨髄より得た間葉系細胞を培養し、冠動脈バイパス術と同時に移植し心筋虚血改善効果および安全性を検証する。

B. 研究方法

自己骨髄を15ml採取し自己血液で3週間無菌培養する。冠動脈バイパス術時に心外膜側より心筋に注入する。安全性は随時評価し2ヵ月後に機能評価を行う。

（倫理面への配慮）

倫理委員会の審査承認通り、予想される利益、不利益、合併症を説明の上で被検者の自由意志による書面での同意を得る。

C. 研究結果

これまでに2例に冠動脈バイパス術2枝および細胞移植術を施行した。死亡、合併症はなく、有害事象をみとめなかった。バイパスグラフトの閉塞を各1枝に認め、1例にPTCAを施行した。1例では側副血行路の発育が示唆された。

D. 考察 E. 結論

外科的血行再建と同時に行う間葉系細胞移植は、これまでのところ、有害事象は生じておらず、手術手技自体の安全性に問題は無いと考えられる。しかしながら、これまでの2例では、明らかな有効性を呈するにはいたっておらず、さらなる症例の蓄積と経過観察が必要である。

F. 健康危険情報

本治療法を原因と有害事象の発生はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

①小林順二郎 冠疾患手術の現状と将来展望
心臓血管麻酔の進歩 2005;1:255-265

②中嶋博之、小林順二郎、田鎖治、北村惣一郎 冠動脈バイパス術の進歩 外科治療 2005;92:447-452

③Nakajima H, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K, Niwaya K, Kitamura S. Functional angiographic evaluation of individual, sequential, and composite arterial grafts. Ann Thorac Surg. 2006; 81; 807-14.

④Matsuura K, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K, Niwaya K, Nakajima H, Yagihara T, Kitamura S. Off-pump coronary artery bypass grafting using only arterial grafts in elderly patients. Ann Thorac Surg. 2005 Jul;80(1):144-8.

⑤小林順二郎 Editorial comment 遠隔期開存性からみた OPCAB におけるグラフト選択 心臓 2005;37:36-7

2. 学会発表

①小林順二郎 current status of OPCAB in National Cardiovascular Center 18th Annual meeting of World Society of Cardiothoracic Surgeons 長野 2005.7.7

②田鎖治、小林順二郎、坂東興、庭屋和夫、中嶋博之、中谷武嗣、八木原俊克、北村惣一郎

Total arterial OPCAB-pitfalls and tips. Symposium
第 35 回日本心臓血管外科学会静岡

③ Nakajima H, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K,
Niwaya K, Miyazaki S, Yagihara T, Kitamura S.
Reversal and competitive flow in arterial
composite grafts; The crucial role of interactions
of sequenced anastomotic site. Oral Annual
Meeting of the Society of Cardiothoracic Surgeons
of Great Britain and Ireland, UK, 2005.3.6

④ Nakajima H, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K,
Niwaya K, Miyazaki S, Yagihara T, Kitamura S.
Reversal and competitive flow in arterial
composite grafts: The effect of graft arrangement
for prevention. Plenary session, 4th EACTS-ESTS
Joint Meeting, Spain. 2005.9.26

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
研究協力者

間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生療法における NOGA システムの臨床的有用性

分担研究者 清水 渉 国立循環器病センター 心臓血管内科 医長

研究要旨 間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生療法における NOGA システムの有用性を臨床例で検討した。重症心不全を合併した拡張型および虚血性心筋症患者 3 例において、NOGA システムと細胞注入用 Myostar カテーテルを用いて、間葉系幹細胞の左室心筋への移植を施行した。NOGA システムで左室壁運動と左室心内膜電位を評価し、電位(起電力)は保たれているが収縮性が低下し解離を認め、心室筋の viability を認めると考えられた領域を中心に細胞注入を施行した。NOGA システムによる 3 次元表示ガイド下で、細胞注入用 Myostar カテーテルを用いることにより、合併症なく安全に細胞移植をすることが可能であった。

A. 研究目的

間葉系幹細胞移植は、重症心不全患者の心機能を改善する方法として注目されているが、細胞移植を安全に施行するシステムについては十分に評価されていない。そこで、NOGA システムと細胞注入用 Myostar カテーテルを用いた細胞移植の安全性と有効性を検討した。

B. 研究方法

既存の治療に抵抗性の重症心不全を合併した拡張型心筋症患者 2 例および虚血性心筋症患者 1 例の計 3 例を対象とした。NOGA システムにより、左室壁運動と左室心内膜電位を評価し、細胞注入用 Myostar カテーテルを用いて、左室心内膜側から間葉系幹細胞移植を施行した。

(倫理面への配慮)

間葉系幹細胞移植および NOGA システムの使用は、国立循環器病センター倫理委員会の承認を得て行った。研究成果の発表においては、患者のプライバシーを考慮し、人権擁護を保持する。

C. 研究結果

NOGA システムを用いて、左室心内膜側を 100 点以上マッピングし、各部位の左室壁運動と左

室心内膜電位を評価した。左室の収縮性を Linear local shortening map で、電位(起電力)を Voltage map で 3 次元表示し、起電力は保たれているが収縮性が低下し解離を認め、心室筋の viability を認めると考えられた領域を中心に、計 40 回の間葉系幹細胞の注入を施行した。NOGA システムによる 3 次元表示ガイド下に、細胞注入用 Myostar カテーテルを用いることにより、急性期および慢性期の合併症なく、安全に細胞移植をすることが可能であった。

D. 考察

NOGA システムは、電極カテーテル先端に入った磁石を 3 点からの磁場が感知することにより、カテーテル先端の位置情報と電位情報を非透視下にリアルタイムで同時記録することができる新しいマッピングシステムである。このシステムにより、心筋各部位の壁運動(収縮性)と電位(起電力)を同時に 3 次元表示することが可能である。今回、NOGA システムと細胞注入用の Myostar カテーテルを用いることにより、合併症なく安全に細胞移植が施行可能であった。さらに、起電力は保たれているが収縮性が低下し、心室筋の viability を認め、細胞移植がより有効と思われる領域を同定することが可能であった。今後、さらに症例を重ねて、

安全性とその臨床的有用性をさらに検討していく予定である。

E. 結論

間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生療法において、NOGA システムは臨床的に有用であった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(国外原著論文)

1. Shimizu W, et al: Curr Pharm Design 11: 1561-1572, 2005
2. Shimizu W: Cardiovasc Res 67: 347-356, 2005
3. Shimizu W, et al: Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2, 408-414, 2005
4. Shimizu W: J Electrocardiol 38 Suppl:22-25, 2005
5. Shimizu W: Internal Med 44: 1224-1231, 2005

(国外著書)

1. Shimizu W, et al: Molecular mechanisms of disease: an Encyclopedic reference, Springer, UK, -, 2006 (in press)

2. 学会発表

(国際学会のみ)

1. Shimizu W et al: Circulation 112: II-493, 2005. The 77th American Heart Association (AHA) meeting, Dallas, USA, 2005. 11

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

発明の名称：心室伝導障害または心室細動の遺伝的素因を検査する方法、およびそのための試薬

出願番号：特許出願 2005-197489 出願日：2005年7月6日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

多孔性高分子フィルムを用いた心筋組織・末梢血管組織の再生

分担研究者 西川 雄大 国立循環器病センター研究所

研究要旨 既存の多孔性高分子薄膜の作製に用いられる両親媒性高分子（ポリアクリルアミド誘導体）を新たに合成し、これを用いたフィルム作製を行った。本手法により、ポリ乳酸およびポリε-カプロラクトンから多孔性薄膜を作製できた。さらに多孔性薄膜を一軸延伸し、ライン状パターンを付与した細胞培養基材を作成することに成功した。このパターン化培養基材を用い、ヒト骨髄間葉系幹細胞の培養を行った。間葉系幹細胞はパターンに沿って配向し、かつ高密度な重層化細胞組織シートを得ることに成功した。

A. 研究目的

心筋組織の再生において、心筋細胞供給源および細胞培養基材の確保は重要な問題である。多孔性高分子薄膜を用いた細胞培養法により、間葉系幹細胞の心筋細胞への分化誘導と心筋組織の形成を同時に行えることが期待される。本研究は多孔性高分子フィルムの微細表面形状と細胞との相互作用に基づき、間葉系幹細胞を心筋細胞へと分化誘導し、シート状組織を得ることを目的とする。

B. 研究方法

多孔性高分子薄膜は高分子（ポリε-カプロラクトンと両親媒性ポリアクリルアミド）の希薄溶液を水面上に展開し、これに高湿度空気を吹き付けることにより作製した。得られた多孔性フィルムを水面上で一軸に延伸し、ライン状パターン化処理をフィルムに施した。このフィルムをテフロンフレームに移し培養基材とした。次に、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（Cambrex社より購入）を延伸多孔性薄膜の表面および裏面に3時間の初期接着において播種し、専用培地中で2週間培養した。

C. 研究結果

ポリε-カプロラクトンと両親媒性ポリアクリルアミドのブレンド溶液を水面上に展開し、高湿度空気を吹き付けることにより、孔径5マイクロメ

ータ程度の細孔がハニカム状に配列した多孔性フィルムが得られた。さらに、このフィルムを一軸に延伸することで、細孔の形状が一方向に伸び、ライン状のパターン構造を誘起することができた。

この延伸多孔性フィルム上でヒト骨髄由来間葉系幹細胞（hMSC）を培養した。その結果、hMSCはパターン化多孔性フィルムに接着、ラインにパターンに沿って伸展することが明らかとなった。また、hMSCはこの培養基材上で増殖し、高密度の配向化細胞シートを形成することが明らかとなった。

D. 考察

本研究により、hMSCは延伸多孔性フィルム上で高密度配向化細胞シート組織を形成することが明らかとなった。hMSCはパターン化細胞培養基材上で培養することで、脂肪細胞および骨芽細胞に分化することが報告されている。本研究で用いた延伸多孔性フィルム上で、hMSCはどのような分化マーカーを発現しているのだろうか。

E. 結論

延伸多孔性フィルムを培養基材として用いることで、ヒト骨髄間葉系幹細胞の高密度配向化細胞シートを作製することが可能であることを見出した。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

①西川雄大：自己組織化を用いた微細構造の作製および再生医療への応用. 第51回高分子研究発表会（高分子学会関西支部）、神戸、7月22日、平成17年.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし。

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Nishigami K., Nakatani T., Chiku M., Mori H.	A novel micro-angiography detecting angiogenesis, Application for autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in the patients with critical limb ischemia	Mori H., Matsuda H.	Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches	Springer	Tokyo	2005	191-199
知久正明、 西上和宏、 内藤博昭、 盛 英三、 佐藤英一	画像解析-微小血管造影-	田畑泰彦編集	遺伝子医学MOOK 1 再生医療へのブレイクスルー(その革新技术と今後の方向性)	メディカルドゥ		2005	223-227
中谷武嗣	心臓移植手術	出月康夫	「高度先進医療」からだの科学増刊	日本評論社	東京	2006	66-69
中谷武嗣	補助人工心臓は確立された治療法か?	三田村秀雄、 山科 章、 川名正敏、 桑島 巖	EBM 循環器疾患の治療 2006-2007	中外医学社	東京	2006	
Tomita S Nakatani T	Regeneration of myocardium using bone marrow cells	H.Mori, H. Matsuda.	「Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches」	Springer-Verlag	Tokyo	2006	31-42
Fujisato T, Minatoya K, Yamazaki S, Meng Y, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T Kitamura S	Preparation and recellularization of tissue engineered bioscaffold for heart valve replacement.	H.Mori, H. Matsuda.	「Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches」	Springer-Verlag	Tokyo	2006	84-49

Katsuda Y, Takeshita Y, Arima K, Saitoh Y, Imaizumi T, Asahara T, Nakatani T, Okano T, Kishida A, Ishibashi-U eda H, Shin'oka T, Nagai R, Sawa Y, Komeda M, Takewa Y, Matsuda H, Mori H	Clinical survey of cell therapy in Japan	H.Mori, H. Matsud	「Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches」	Springer- Verlag	Tokyo	2006	183-18 9
小林 順二郎	冠疾患手術の現状 と将来展望 心臓 血管麻酔の進歩		心臓血管麻酔の 進歩	真興交易 （株）医書出 版部	東京	2005	255-26 5
中嶋博之	冠動脈バイパス術 の進歩		外科治療	永井書店	大阪	2005	92 : 447-45 2
Nakajima H	Functional angiographic evaluation of individual, sequential, and composite arterial grafts.		Ann Thorac Surg	Elsevier Inc	米国	2006	81: 807-14
Matsuura K	Off-pump coronary artery bypass grafting using only arterial grafts in elderly patients.		Ann Thorac Surg	Elsevier Inc	米国	2005	80: 144-14 8
小林 順二郎	Editorial comment 遠隔期開存性から みた OPCAB にお けるグラフト選択		心臓	日本心臓 財団	東京	2005	37(1): 36-37

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujii T, Nagaya N, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Nishigami K, Ishibashi-Ueda H, Shirai M, Itoh T, Ishino K, Sano S, Kangawa K, Mori H.	Adrenomedullin enhances therapeutic potency of bone marrow transplantation for myocardial infarction in rats.	Am J Physiol Heart Circ Physiol.	288	H1444-1450	2005
Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Ishibashi-Ueda H, Yamagishi M, Miyatake K, Matsumoto T, Kitamura S, Kangawa K.	Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia.	Circulation.	11	356-362	2005
Hanabusa K, Nagaya N, Iwase T, Itoh T, Murakami S, Shimizu Y, Taki W, Miyatake K, Kangawa K.	Adrenomedullin enhances therapeutic potency of mesenchymal stem cells after experimental stroke in rats.	Stroke	36	853-858	2005
Nagaya N, Mori H, Murakami S, Kangawa K, Kitamura S.	Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy.	Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.	288	R1432-1437	2005
Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, Kangawa K, Kitamura S.	Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia.	Cardiovasc Res	66	543-551	2005
Murakami S, Nagaya N, Itoh T, Iwase T, Fujisato T, Nishioka K, Hamada K, Kimura H.	Adrenomedullin Regenerates Alveoli and Vasculature in Elastase-induced Pulmonary Emphysema in Mice.	Am J Respir Crit Care Med.	172	581-589	2005

Higashikita T, Yamagishi M, Higashi T, Nagata I, Iihara K, Miyamoto S, Ishibashi-Ueda H, Nagaya N, Iwase T, Tomoike H, Sakamoto A.	Altered expression balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human carotid plaque disruption: Results of quantitative tissue analysis using real-time RT-PCR method.	Atherosclerosis.	185	165-172	2006
Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S.	Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in a Rat Model of Dilated Cardiomyopathy.	Circulation.	112	1128-1135	2005
Murakami S, Nagaya N, Itoh T, Kataoka M, Iwase T, Horio T, Miyahara Y, Sakai Y, Kangawa K, Kimura H.	A prostacyclin agonist with thromboxane synthase inhibitory activity (ONO-1301) attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.	Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.	290	59-65	2005
Nagaya N, Itoh T, Murakami S, Oya H, Uematsu M, Miyatake K, Kangawa K.	Treatment of cachexia with ghrelin in patients with COPD.	Chest.	128	1187-1193	2005
Kataoka M, Nagaya N, Satoh T, Itoh T, Murakami S, Iwase T, Miyahara Y, Kyotani S, Sakai Y, Kangawa K, Ogawa S.	A Long-acting Prostacyclin Agonist with Thromboxane Inhibitory Activity for Pulmonary Hypertension.	Am J Respir Crit Care Med.	172	1575-1580	2005

Takaki H, Sakuragi S, Nagaya N, Suzuki S, Goto Y, Sato T, Sunagawa K.	Postexercise VO(2) "Hump" phenomenon as an indicator for inducible myocardial ischemia in patients with acute anterior myocardial infarction.	Int J Cardiol.			2005 In press
Kamiyama M, Usui N, Kamata S, Fukuzawa M, Nagaya N, Kangawa K.	Adrenomedullin is up-regulated in nitrofen-induced fetal pulmonary hypoplasia.	J Pediatr Surg.	40	1562-1567	2005
Yamagishi M, Higashikita T, Ishibashi-Ueda H, Sasaki H, Ogino H, Iihara K, Miyamoto S, Nagaya N, Tomoike H, Sakamoto A.	Sustained Upregulation of Inflammatory Chemokine and Its Receptor in Aneurysmal and Occlusive Atherosclerotic Disease –Results From Tissue Analysis With cDNA MAcroarray and Real-Time Reverse	Transcriptional Polymerase Chain Reaction Methods-.	69	1490-1495	2005
Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H.	Monolayered Mesenchymal Stem Cells Repair Scarred Myocardium After Myocardium Infarction.	Nature Medicine			2006 in press
Ohgushi H, Kitamura S, Kotobuki N, Hirose M, Machida H, Oshima	Culturing Human Mesenchymal Stem Cells on Bioceramics for Hard Tissue Regeneration	Key Eng Mater	284	603-606	2005
Ohgushi H, Kotobuki N, Funaoka H, Machida H, Hirose M, Tanaka Y	Tissue engineered ceramic artificial joint-ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis.	Biomaterials	26	4654-61	2005