

D. 考察

MSCは血管内皮細胞や心筋細胞への分化能を有するのみならず、パラクライン効果により心筋血管再生作用をもたらすことが知られている。今回、動物モデルに対してMSCを移植し、15例中5例で房室伝導が改善した。また、房室結節内の線維化およびTGF- β の発現が有意に抑制されていた。更に、間葉系幹細胞の培養上清はHGFやIL-10を多く分泌していた。これらのことから、MSCのパラクライン効果による線維化抑制が房室伝導の改善に大きく寄与していると考えられた。一方、移植されたMSCの一部は心組織内で伝導系マーカーを発現しており、刺激伝導系細胞への分化が示唆された。しかしながら、このフェノタイプを示す細胞は非常に少なく心組織内に散見されるのみであったため、病態改善への貢献度は低いと考えられた。

E. 結論

MSCの移植は動物モデルにおいて主に線維化抑制効果により房室ブロックを改善し、その進行を抑制できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohnishi S, Yanagawa B, Tanaka K, Miyahara Y, Obata H, Kataoka M, Kodama M, Ishibashi-Ueda H, Kangawa K, Kitamura S.

Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acutemyocarditis.

J Mol Cell Cardiol. 2007;42:88-97.

2. Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, Nagaya N.

Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells.

Stem Cells. 2007 (in press).

3. Jo JI, Nagaya N, Miyahara Y, Kataoka M, Harada-Shiba M, Kangawa K, Tabata Y.

Transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with myocardial infarction: benefit of a novel nonviral vector, cationized dextran.

Tissue Eng. 2006 (in press).

4. 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 myocardial infarction.

Nat Med. 2006;12:459-65.

2. 学会発表

Miki Yokokawa, Shunsuke Ohnishi, Hiroaki Obata, Noritoshi Nagaya. Transplantation of mesenchymal stem cells improves atrioventricular conduction in rat model of complete atrioventricular block. American Heart Association, Chicago, November 10-12, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特願

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

コントラストエコー法を用いた新生血管評価法の開発

分担研究者 宮武邦夫 独立行政法人国立病院機構 大阪南医療センター 院長
永谷憲歳 国立循環器病センター研究所再生医療部 部長

研究要旨 虚血性疾患に対する血管新生療法の評価法の開発を目的として、ラット下肢虚血モデルに対する骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)移植後の血管新生効果をコントラストエコー法により評価した。コントラストエコー法から得られた指標は対照群に比し、MSC 移植群で有意に改善しており、また下肢筋肉内血流量や毛細血管密度と良好な相関を認めた。コントラストエコー法を用いることで、微小血管新生を非侵襲的に評価できる可能性がある。

A. 研究目的

細胞移植などによる血管新生療法は虚血性疾患に対する有効な治療法の一つである。しかし、血管新生療法により新生される血管の径は非常に細く、非侵襲的に評価することは難しい。一方、近年開発されたコントラストエコー法は毛細血管レベルの組織灌流を非侵襲的に評価することができる。そこで、下肢虚血モデルラットを用い、骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)移植による血管新生の効果判定におけるコントラストエコー法の有用性について検討した。またコントラストエコー法から得られた指標を、従来からの血流評価法であるレーザードプラ法、侵襲的血流測定法であるマイクロスフェア法及び筋肉内毛細血管密度と比較検討した。

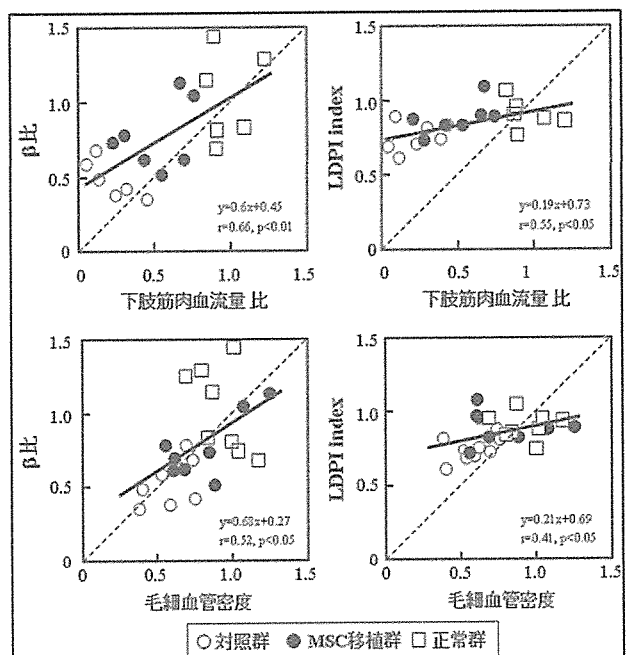
B. 研究方法

ラット大腿骨から骨髄を摘出し、間葉系幹細胞を抽出・培養した。下肢虚血モデルラットを作成し、手術翌日に左下肢筋肉に MSC を移植した。対照群にはリン酸緩衝生理食塩水を注入した。MSC 移植 2 週間後にレーザードプラ法、コントラストエコー法、マイクロスフェア法による血流測定及び毛細血管密度の定量を行った。レーザードプラ法とコントラストエコー法では、左右下肢それぞれの血流指標を測定し、左右比(LDPI index 及び β 比)を算出した。マイクロスフェア法から求めた血流量も同様に左右比を算出した。

C. 研究結果

LDPI index、コントラストエコー法から得られた β 比、マイクロスフェアから求めた下肢筋肉血流量比、毛細血管密度はいずれも MSC 移植群において、対照群に比し有意に高値であった。LDPI index 及び β 比はマイクロスフェア法で求めた下肢筋肉血流量比及び毛細血管密度と良好な相関を認めた(図)。しかしながら、その相関係数は LDPI index に比し、 β 比で高値であった。

図: 下肢血流指標と血流量・毛細血管密度の関係



D. 考察

従来、細胞移植等の血管新生療法の効果判定にはレーザードプラ法及び X 線造影検査が広く用いられてきた。しかしながら、レーザードプラ法は皮下ごく浅部の血流信号を画像化するため、下肢筋肉内の血流状態を直接評価することはできない。また、X 線造影検査は侵襲的であり、かつ細かな新生血管を評価することは難しい。一方、コントラストエコー法は循環器領域を始めとして、様々な臓器灌流の評価に有用であることが報告されており、また直径 10 μm 以下のマイクロバブルを造影剤として用いるため、下肢筋肉内の毛細血管レベルの灌流評価が可能である。その結果、LDPI index に比し、 β 比がマイクロスフェア法で求めた筋肉内血流量及び毛細血管密度と良好な相関を認めたと考えられた。

E. 結論

コントラストエコー法から算出される β 値は、細胞移植後の新生血管評価に有用である可能性が示唆された。今後、閉塞性末梢動脈疾患患者に対する血管新生療法の効果判定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. Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, Nagaya N. Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells. *Stem Cells* (in press).

2. Jo JI, Nagaya N, Miyahara Y, Kataoka M, Harada-Shiba M, Kangawa K, Tabata Y. Transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with myocardial infarction: benefit of a novel nonviral vector, cationized dextran. *Tissue Eng* (in press).

3. Ohnishi S, Yanagawa B, Tanaka K, Miyahara Y, Obata H, Kataoka M, Kodama M, Ishibashi-Ueda H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N. Transplantation

of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:88-97.

4. 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. *Nat Med* 2006;12:459-65.

2. 学会発表

第 10 回日本心血管内分泌代謝学会学術集会、福井、2006 年 11 月

第 32 回コントラストエコー研究会、大阪、2007 年 2 月

第 6 回日本再生医療学会総会、横浜、2007 年 3 月

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

なし。

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）装着を行った末期的心不全 83 例中多くの症例で自己心機能の改善がみられ、著明な改善をみた 8 例は LVAS より離脱した。間葉系幹細胞移植併用による心機能改善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における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 装着を行った患者において、LVAS 装着後の自己心機能の推移を検討する。著明な心機能改善が得られた症例では LVAS 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、家族に十分なインフォームドコンセントを行なう。

C. 研究結果

心臓移植対象で LVAS 装着を行った 83 例を管理してきたが、8 例で計画的離脱が可能であった。また、離脱不能例のなかで基礎疾患が拡張型心筋症である症例においては心機能回復傾向を認めた。

D. 考察

離脱例は全例病歴期間が短い拡張型心筋症の若年者であった。また、1 例では、離脱可能性の評価において離脱困難と判定され、IGF-1 を併用することで離脱可能となった。自己心機能増進のために間葉系幹細胞移植併用を行えば、離脱可能例が増す可能性があると考えられる。

E. 結論

LVAS 装着を必要とする末期心不全患者において、自己心機能回復による離脱において間葉系幹細胞移植の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、富田伸司、永谷憲歳：拡張型心筋症における心筋再生療法。CARDIAC PRACTICE、17(1):21-24、2006.

② 中谷武嗣：心臓移植。総合臨牀、55:2053-2062、2006.

③ Wada K, Takada M, Ueda T, Ochi H, Morishita H, Hanatani A, Nakatani T.: Pharmacokinetic study and limited sampling strategy of cyclosporine in Japanese heart transplant recipients. Circ J 70:1307-1311, 2006

2. 学会発表

① Nakatani T, Kitamura S: Clinical experience of ventricular assist systems and heart transplantation in Japan. ジョイントシンポジウム、第 10 回日本日本心不全学会学術集会、東京、2006.10.13-15.

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

真野暁子 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

船津俊宏 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 副院長

研究要旨 成長過程を観察できる幼少なブタを使用し、皮下脂肪組織から間葉系幹細胞を用いた細胞シートを作成した。一方同一のブタで慢性心不全モデルを作成し、細胞シートを移植し、その有効性と安全性を生理学的、病理組織学的、生化学的に評価した。対象数が少なく統計学的検討にいたっていないが、少数例の検討ではコントロール群と比して梗塞不全心の進行抑制が示唆された。今後対象数の増加を経て、シートの安全性と有効性の証明が必要である。

A. 研究目的

単層間葉系幹細胞シート移植の不全心筋への効果を、前臨床試験として大動物（ブタ）を使用し検討する。

B. 研究方法

成長過程を観察できる幼少なブタを使用し、皮下脂肪組織から間葉系幹細胞を用いた細胞シートを作成する。一方同一のブタで慢性心不全モデルを作成し、細胞シートを移植し、その有効性と安全性を生理学的、病理組織学的、生化学的に評価する。

（倫理面への配慮）

国立循環器病センター研究所の動物実験指針に従って行う。

C. 研究結果

現時点では細胞シートを移植したブタにおいて、生理学的、病理組織学的、生化学的評価をしたが、心不全の改善は認められていない。

D. 考察

対象数が少なく(n=3)、バラツキがみられ統計学的検討にいたっていない。少数例個々の検討では、コントロール群と比して梗塞不全心の進行の抑制が示唆された。

E. 結論

対象数の増加を経て、シートの安全性と有効性の証明が必要である。少数例の検討では梗塞不全心の進行抑制が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1, Watanabe K, Yagihara T, Echigo S, et al. : Possible role of adrenomedullin in the regulation of Fontan circulation: Mature form of plasma adrenomedullin is extracted in the lung in patients with Fontan procedure. Regul Pept. Jan 12. 2007

2, Saito S, Yagihara T, Kitamura S, et al.: Is extracorporeal life support contraindicated in elderly patients? Ann Thorac Surg. Jan; 83(1):140-5, 2007

3, Yasuda K, Yagihara T, Echigo S, et al.: Cardiorespiratory responses to exercise after anatomic repair of atrioventricular discordance with abnormal ventriculoarterial connection. Pediatr Cardiol. Jan-Feb; 28(1):14-20, 2007

4, Hamamoto M, Yagihara T, Kitamura S, et al.: Suppressive effect of phosphodiesterase type 4 inhibition on systemic inflammatory responses after cardiopulmonary bypass. J Artif Organs. 9(3):144-8, 2006

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
なし。

抗酸化遺伝子導入 MSC を用いた心筋梗塞モデルラットに対する 心不全治療の試み

分担研究者 山岸 正和 金沢大学大学院医学系研究科臓器機能制御学

研究要旨 臍島移植を中心とした細胞移植治療においては局所で過剰な酸化ストレスに曝されてグラフトが生着しない事が問題とされ、それに対し内因性抗酸化酵素ヘムオキシゲナーゼ1 (HO-1) の誘導の有効性が既に証明されている。今回我々はラット骨髄間葉系細胞 (MSC) に HO-1 を過剰発現させてから心筋梗塞モデルラットに移植する事で心筋細胞への分化効率を上げるべく検討を行った。MSC にリポフェクション法を用いて、ヒト HO-1 遺伝子を導入したところ、約 80% 効率で導入に成功し、mRNA レベルで HO-1 は 1 倍に発現が増大した。その機能変化や移植後の生体での生着性の検討が今後必要と思われる。

A. 研究目的

MSC に HO-1 を過剰発現させて心筋や血管への分化・生着効率を向上させる事を試みた。

B. 研究方法

ラット MSC にリポフェクションおよびエレクトロポレーションでヒト HO-1 遺伝子を導入し、至適条件を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では遺伝子組み換えは行なわない

C. 研究結果

Lipofectamine2000 を用いて 80% 程度の効率で遺伝子導入を行ない HO-1 の過剰発現に成功した。また、ラット心筋梗塞モデルに本細胞を移植した。現在のところ、本細胞移植に伴う、著しい心機能の悪化や死亡例は認めていない。

D. 考察

MSC は比較的容易に高い遺伝子導入効率を得

られる細胞である。今回の遺伝子導入による HO-1 の過剰発現は一過性に留まることが予想されるが、この期間はグラフト生着時に活性が高まっている事を考慮すると、本細胞の応用による生着率の向上が期待されよう。

E. 結論

ヒト HO-1 遺伝子をラット骨髄間葉系細胞に導入し、本分子の発現を確認した。HO-1 をはじめとする内因性抗酸化因子の導入により、移植細胞の生着効率向上が期待される。

F. 健康危険情報

特記すべき事なし。

G. 研究発表

研究協力者：

金沢大学大学院医学系研究科 八木邦公
同 坪川俊成
東北大学医学部医学系研究科 柴原茂樹

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い、いずれも外来で経過観察を行っている。合併症はなく、石灰化や不整脈などの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る。狭心症症状の軽減が得られており、さら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とともに、経過観察を行ってゆく。

（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、症状の改善が認められているが、細胞移植自体の効果については明らかでない。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 虚血性心疾患治療の新展開 OPCAB(Off-pump CABG)の現状 日本外科学会雑誌冠疾患手術の現状と将来展望 心臓血管麻酔の進歩 2006;107:9-14

② 小林順二郎 冠動脈疾患の外科治療 Technique&Technology、Composite graft 総説 Circ upto date 2006;1:74-82

③ 田鎖 治、小林順二郎、中嶋博之、北村惣一郎 低心機能の虚血性心疾患に対する血行再建 低左心機能症例に対する OPCAB 日本冠疾患学会雑誌 2006;12:166-70.

④ Nakajima H, Kobayashi J, Tagusari O, Niwaya K, Funatsu T, Kawamura A, Yagihara T, Kitamura S. Angiographic flow grading and graft arrangement of arterial conduits.

J Thorac Cardiovasc Surg. 2006;132:1023-29.

⑤ Nakajima H, Kobayashi J, Tagusari O, Niwaya K, Funatsu T, Brik A, Yagihara T, Kitamura S. Graft design strategies with optimum antegrade bypass flow in total arterial off-pump coronary artery bypass.

2. 学会発表

①中嶋博之、永谷憲歳、小林順二郎、野々木宏、八木原俊克、友池仁暢、北村惣一郎 外科的血行再建と間葉系細胞移植による難治性心筋虚血に対する血管再生療法 六甲カルデアックセミナー 大阪 2006年8月

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 DESには出来ない血行再建-OPCAB による動脈グラフトを使用した多枝バイパスと瀰漫性病変に対する onlay bypass grafting パネルディスカッション第59回日本胸部外科学会 東京 2006年10月

③Nakajima H, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K, Niwaya K, Miyazaki S, Yagihara T, Kitamura S. The Effect of bypass flow on early and intermediate-term

outcome in complete revascularization for three vessel disease using exclusively arterial grafts. EACTS/ESTS joint meeting Stockholm Sweden 2006.

④Nakajima H, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K, Niwaya K, Miyazaki S, Yagihara T, Kitamura S. Arterial graft fate; Angiographic grading and strategy for graft arrangement of arterial grafts. American heart Association Chicago 2006.

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

NOGA システムを用いた間葉系幹細胞による心筋血管再生療法

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 重症心不全を合併した拡張型および虚血性心筋症患者 6 例において、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検討した。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、虚血性心筋症患者では、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、拡張型心筋症患者では、左室全体に均一に、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

重症心不全患者の心機能を改善する方法として、間葉系幹細胞移植が注目されている。しかし、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。本研究では、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

対象は、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 4 例および虚血性心筋症患者 2 例の計 6 例である。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 3次元表示し評価した。Voltage map で左室の電位(起電力)を、Linear local shortening

mapで左室収縮性を 3次元表示し、虚血性心筋症患者では、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、拡張型心筋症患者では、左室全体に均一に、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、心筋各部位の壁運動(収縮性)と電位(起電力)を同時に 3次元表示することを可能とした新しいシステムである。すなわち、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を認識し、同時に電極カテーテルから電位情報を非透視下にリアルタイムで記録する。本研究では、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。特に虚血性心筋症患者では、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

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なNOGAシステムを用いて、間葉系幹細胞による心筋血管再生療法を安全に施行することができた。

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: J Cardiovasc Electrophysiol 17: 276-278, 2006
2. Bezzina CR, Shimizu W: Circulation 113: 338-344, 2006
3. Tan HL, Bardia A, Shimizu W, et al: Circulation 114: 2096-2103, 2006
4. Aiba T, Shimizu W, et al: J Am Coll Cardiol 47: 2074-2085, 2006
5. Shimizu W, et al: J Cardiovasc Electrophysiol 2007 (in press)
6. Shimizu W, et al: Circ J 2007 (in press)

(国外著書)

1. Shimizu W, et al: Molecular mechanisms of

disease: an Encyclopedic reference, Springer, UK, -, 2007 (in press)

2. Shimizu W, et al: Electrical Diseases of the Heart: Genetics, Mechanisms, Treatment, Prevention, Springer, UK, -, 2007 (in press)

2. 学会発表

(国際学会のみ)

1. Shimizu W: The 8th Biennial World Congress on Cardiac Arrhythmias. The 15th World Congress Cardiotim 2006, Nice, France, 2006. 6. 15
2. Shimizu W: The 8th Asian-Pacific Symposium on Cardiac Pacing and Electrophysiology, Jakarta, Indonesia, 2006. 8. 4
3. Shimizu W: CardioRhythm 2007, Hong Kong, China, 2007. 2. 2

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: 里見和浩、野田 崇

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 ポリε-カプロラクトンと両親媒性ポリマーのブレンド溶液を用い、多孔性薄膜を作製した。この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製した。パターン化培養基材を用い、ヒト骨髄間葉系幹細胞（hMSC）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、かつ高密度な細胞組織シートを得ることに成功した。さらに、分化誘導培地中でhMSCを培養することで、z帯を示す筋原繊維が発現することを見出した。hMSCの分化誘導において、細胞の形態制御のみならず培地などの環境因子の制御も必要であることが示唆された。

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に播種し、成長培地（MSCGM）および分化誘導培地（DMEM/F12をベースに各種成長因子および添加剤を加えたもの）を用いて培養実験を行った。

（倫理面への配慮）

特になし。

C. 研究結果

成長培地（MSCGM）を用いて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、ラインパターンに沿って伸展し、高密度の配向化細胞シートを形成した。延伸フィルム上で1週間培養したhMSCについて心筋細胞特異的マーカーであるナトリウム利尿ペプチド（ANP）の発現を免疫染色法で調べたところ、ANPの発現は認められなかった。そこで、hMSCの分化誘導を促進させる目的でDMEM/F12培地をベースにEGF、FGF、アスコルビン酸を添加した分化誘導培地-1を調整し、延伸フィルム上でのhMSCの培養実験を行った。この培養条件でも、ANPの発現は認められなかった。その一方で、z帯を示す筋原繊維としてα-アクチニンの発現が認められた。次に、このDMEM/F12分化誘導培地-1に対しデキサメタゾン添加した培地（分化誘導培地-2）を用い、hMSCの分化誘導実験をポリスチレンディッシュ、コラーゲンコーティングディッシュ（I型およびIV型）上で行った。コラーゲンコーティングディッシュ上のhMSCは顕著な増殖を示すと共に、z帯を示す筋原繊維の発現は見られず、ミオシン重鎖の発現した細胞とそうでない細胞の二種類が観察された。これに対し、ポリスチレンディッシュ上では増殖が抑制され、z帯を示す筋原繊維（α-アクチニンの免疫染色で確認）およびミオシン重鎖を発現し

た細胞のみが観察された。現在、多孔性フィルム上でのhMSCの培養実験を行い、hMSCの心筋細胞分化マーカーの発現を検討している。

D. 考察

本研究では、延伸多孔性フィルムのパターンによりhMSCの形態および配向性を制御することができた。しかし、成長培地中では心筋細胞特異的マーカー（ANP）を発現することは無かった。コラーゲンコーティングディッシュおよびポリスチレンディッシュを培養基材に用いた分化誘導培地中でのhMSCの培養実験より、hMSCの分化誘導において細胞増殖の制御が鍵となることを示唆し、多孔性フィルムを用いたhMSCの分化誘導に可能性を与える。

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（hMSC）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。hMSCの分化誘導については、細胞培養を行う基材表面のマイクロパターン構造以外に、種々の分化誘導剤を含む培地を用いる必要性が示唆された。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

①M. Suenaga, Y. Kaneko, J. Kadokawa, T. Nishikawa, H. Mori, M. Tabata, : “Amphiphilic Poly(*N*-propargylamide) Having Galactose and Lauryloyl Groups”. *Macromolecular Chemistry and Physics.* 6: 1009-1018、2006.

2. 学会発表

①西川雄大：「細胞足場材料の創製」：臨床医工学・情報科学技術者再教育ユニット・バイオマテリアル学コース/先端バイオマテリアル（大阪大学臨床医工学研究教育センター・吹田・2月10日・平成19年）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

研究協力

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
永谷憲歳	骨髄細胞移植による心不全治療		循環器科	科学評論社		2006	73-78
永谷憲歳 清水 渉 野田 崇 野口輝夫 土井 香 石田良雄 鎌倉史郎 北風政史 中谷武嗣 寒川賢治 盛 英三 友池仁暢 北村惣一郎	骨髄細胞移植による心不全治療		循環器病研究の 進歩	協和企画		2006	34-40
竹下 聡	VEGF/VEGF-E (末梢動脈疾患)		細胞増殖因子と 再生医療 (松本 邦夫・田畑泰彦 編, メディカル レビュー社, 大 阪)			2006	304-30 8
竹下 聡	閉塞性動脈硬化 症		循環器疾患の早 期発見の最前線 (モダンフィジ シャン)			2006	782-78 4
竹下 聡 知久正明	微小血管造影— 新生血管描出へ の応用—		Cardiac Practice			2006	387-39 0
清水達也	心筋に対する再 生医療		臨床看護			2006	1136-1 143
中谷武嗣	臨床心臓病学、 松崎益徳・吉川 純一編集、		心移植	文光堂	東京	2006	101-10 3

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
Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, Nagaya N.	Effect of Hypoxia on Gene Expression of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells and Mononuclear Cells.	Stem Cells.			2007 (in press)
Jo Ji, Nagaya N, Miyahara Y, Kataoka M, Harada-Shiba M, Kangawa K, Tabata Y.	Transplantation of Genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in Rats With Myocardial Infarction: Benefit of a Novel Nonviral Vector, Cationized Dextran.	Tissue Eng.			2007 (in press)
Miyamoto K, Nishigami K, Nagaya N, Akutsu K, Chiku M, Kamei M, Soma T, Miyata S, Higashi M, Tanaka R, Nakatani T, Nonogi H, Takeshita S.	Unblinded pilot study of autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with thromboangiitis obliterans.	Circulation.	114	2679-84	2006
Ohnishi S, Yanagawa B, Tanaka K, Miyahara Y, Obata H, Kataoka M, Kodama M, Ishibashi-Ueda H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N.	Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis.	J Mol Cell Cardiol.	42	88-97	2007
Miyahara Y, Ohnishi S, Obata H, Ishino K, Sano S, Mori H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N.	Beraprost sodium enhances neovascularization in ischemic myocardium by mobilizing bone marrow cells in rats. Biochem Biophys	Res Commun.	349	1242-1249	2006

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 myocardial infarction.	Nat Med.	12	459-465	2006
Muraki K, Hirose M, Kotobuki N, Kato Y, Machida H, Takakura Y, Ohgushi H	Assessment of viability and osteogenic ability of human mesenchymal stem cells after being stored in suspension for clinical transplantation.	Tissue Eng.	12	1711-1719	2006
Saito S, Nakatani T, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K, Niwaya K, Nakajima H, Miyazaki S, Yagihara T, Kitamura S	Is extracorporeal life support contraindicated in elderly patients?	Ann Thorac Surg	83	140-145	2007
Wada Kyoichi, Takada M, Ueda T, Ochi H, Kotake T, Morishita H, Hanatani A, Nakatani T	Relationship between acute rejection and cyclosporine or mycophenolic acid levels on Japanese heart transplantation	Cric J	71	289-293	2007
中谷武嗣	臓器移植の現状と展望 心臓および 心肺移植	外科治療	92	2006	50-51
中谷武嗣	補助人工心臓の現況	循環器専門医	13	2006	27-31
中谷武嗣	心臓移植	総合臨床	55	2006	2053-2062
中谷武嗣	人工心臓の現状と将来的展望わが国 における人工心臓の現状と将来展望 (世界の状況もふまえて)	心臓	38	2006	579-584

中谷武嗣	左心補助人工心臓(LVAS)	分子心血管病	7	2006	485-491
Kosuge M, Kimura K, Kojima S, Sakamoto T, Ishihara M, Asada Y, Tei C, Miyazaki S, Sonoda M, Tsuchihashi K, Yamagishi M, Ikeda Y, Shirai M, Hiraoka H, Inoue T, Saito F, Ogawa H	on behalf of the Japanese Acute Coronary Syndrome Study (JACSS) Investigators.	Circ J.	70(3)	217-21	2006
Maruo T, Nakatani S, Kanzaki H, Kakuchi H, Yamagishi M, Kitakaze M, Ohe T, Miyatake K.	Circadian variation of endothelial function in idiopathic dilated cardiomyopathy.	Am J Cardiol.	97(5)	699-702	2006
Lazarevic AM, Nakatani S, Okita Y, Marinkovic J, Takeda Y, Hirooka K, Matsuo H, Kitamura S, Yamagishi M, Miyatake K.	Determinants of rapid progression of aortic root dilatation and complications in Marfan syndrome.	Int J Cardiol.	106(2)	177-82	2006
Higashikata 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(1)	165-72	2006

Ishihara M, Kojima S, Sakamoto T, Asada Y, Kimura K, Miyazaki S, Yamagishi M, Tei C, Hiraoka H, Sonoda M, Tsuchihashi K, Shinoyama N, Honda T, Ogata Y, Ogawa H; Japanese Acute Coronary Syndrome Study (JACSS) Investigators.	Usefulness of combined white blood cell count and plasma glucose for predicting in-hospital outcomes after acute myocardial infarction.	Am J Cardiol.	97(11)	1558-63	2006
Takata M, Inazu A, Katsuda S, Miwa K, Kawashiri MA, Nohara A, Higashikata T, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M.	CETP (cholesteryl ester transfer protein) promoter -1337 C>T polymorphism protects against coronary atherosclerosis in Japanese patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia.	Clin Sci (Lond).	111(5)	325-31	2006
Kobayashi J, Murase Y, Asano A, Nohara A, Kawashiri MA, Inazu A, Yamagishi M, Mabuchi H.	Effect of walking with a pedometer on serum lipid and adiponectin levels in Japanese middle-aged men.	J Atheroscler Thromb.	13(4)	197-201	2006
Katsuda Y, Asano A, Murase Y, Chujo D, Yagi K, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M	Association of genetic variation of the adiponectin gene with body fat distribution and carotid atherosclerosis in obese subjects	J Atheroscler Thromb.			2007
Ohshiro Y, Ma R, Yasuda Y, Hiraoka-Yamamoto J, Clermont A, Isshiki K, Yagi K, Arikawa E, Kern T, King GL.	Reduction of Diabetes-induced Oxidative Stress, Fibrotic Cytokine Expression and Renal Dysfunctions in PKC β Null Mice	Diabetes	55	3112-3120	2006

Nakajima H, Kobayashi J, Tagusari S, Niwaya K, Funatsu T, Kawamura A, Yagihara T, Kitamura S	Angiografic flow grading and graft arrangement of arterial conduits	The Journal of Thracic and Cardiovascular Surgery	132(5)	1023-1029	2006
Nakajima H, Kobayashi J, Tagusari S, Niwaya K, Funatsu T, Brik A, Yagihara T, Kitamura S	Graft design strategies with optimum antegrade bypass flow in total arterial off-pump coronary artery bypass	European Association for Cardio-Thoracic Surgery	31	276-282	2007
Shimizu W	Does an overlap syndrome really exist between Brugada syndrome and progressive cardiac conduction defect (Lenegre syndrome)?	J Cardiovasc Electrophysiol	17	276-278	2006
Bezzina CR*, Shimizu W*, Yang P*, Koopmann TT, Tanck MWT, Miyamoto Y, Kamakura S, Roden DM, Wilde AAM	Common sodium channel promoter haplotype in Asian subjects underlies variability in cardiac conduction.	Circulation	113	338-344	2006 * These 3 authours equally contributed
Tan HL, Bardia A, Shimizu W, Moss AJ, Schulze-Bahr E, Noda T, Wilde AAM	Genotype-specific onset of arrhythmias in congenital long QT syndrome: Possible therapy implications.	Circulation	114	2096-2103	2006
Aiba T, Shimizu W, Hidaka I, Uemura K, Noda T, Zheng C, Kamiya A, Inagaki M, Sugimachi M, Sunagawa K	Cellular basis for trigger and maintenance of ventricular fibrillation in the Brugada syndrome model: High resolution optical mapping study.	J Am Coll Cardiol	47	2074-2085	2006

Kandori A, Miyashita T, Ogata K, Shimizu W, Yokokawa M, Kamakura S, Miyatake K, Tsukada K, Yamada S, Watanabe S, Yamaguchi I	Electrical space-time abnormalities of ventricular depolarization in patients with brugada syndrome and patients with complete right-bundle branch blocks studied by magnetocardiography.	PACE	29	15-20	2006
Ogata K, Kandori A, Miyashita T, Tsukada K, Nakatani S, Shimizu W, Kanzaki H, Miyatake K, Yamada S, Yamada S, Watanabe S, Yamaguchi I	Visualization of three-dimensional cardiac electrical excitation using standard heart model and anterior and posterior magnetocardiogram.	Int J Cardiovas Imag	22	581-593	2006
Nagai T, Suyama K, Shimizu W, Noda T, Satomi K, Kurita T, Aihara N, Kamakura S	Pilsicainide-induced verapamil sensitive idiopathic left ventricular tachycardia.	PACE	29	549-552	2006
Kitamura S, Satomi K, Kurita T, Shimizu W, Suyama K, Aihara N, Niwaya K, Kobayashi J, Kamakura S	Long term follow-up of transvenous defibrillation leads: High incidence of lead fracture.	Circ J	70	273-277	2006
Satomi K, Kurita T, Suyama K, Noda T, Okamura H, Otomo K, Shimizu W, Aihara N, Kamakura S	Catheter ablation of stable and unstable ventricular tachycardias in patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia.	J Cardiovasc Electrophysiol	17	469-476	2006