

201018016A

厚生労働科学研究費補助金

成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業

小児心不全に対する細胞治療と単心室症由来人工多能性  
幹(iPS)細胞の樹立による次世代心筋再生医療法の開  
発に関する研究

平成22年度

総括・分担研究

報告書

研究代表者 王 英正

平成23(2011)年 5月20日

厚生労働科学研究費補助金

成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業

小児心不全に対する細胞治療と単心室症由来人工多能性  
幹(iPS)細胞の樹立による次世代心筋再生医療法の開  
発に関する研究

平成22年度 総括研究年度終了報告書

研究代表者 王 英正

平成23(2011)年 5月20日

# 目 次

## I. 総括研究年度終了報告

小児心不全に対する細胞治療と単心室症由来人工多能性幹(iPS)細胞の樹立による次世代心筋再生医療法の開発に関する研究

王 英正 ----- 3

## II. 分担研究年度終了報告

### 1. 小児心不全に対するヒト心臓内幹細胞移植療法に関する研究

佐野 俊二 ----- 6

### 2. 心疾患特異的ヒトiPS細胞樹立に関する研究

伊藤 浩 ----- 11

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 16

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 21

厚生労働科学研究費補助金  
成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業  
(総括) 研究年度終了報告書

小児心不全に対する細胞治療と単心室症由来人工多能性幹(iPS)細胞  
の樹立による次世代心筋再生医療法の開発に関する研究

研究代表者 王 英正 岡山大学病院教授

研究要旨

複雑心奇形である機能的単心室症に対する修復術後遠隔期における循環不全は、従来の治療法では救命が期待できない重篤な心疾患である。ヒト心臓内幹細胞は成人より小児の心臓内に多く存在し、かつ自己複製能が高いことから、小児心不全に対する心臓内幹細胞自家移植療法を確立することを本研究事業目的とする。

研究分担者：

佐野 俊二

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
心臓血管外科教授

伊藤 浩

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
循環器内科教授

に対して、冠動脈内注入法による心臓内幹細胞自家移植療法を行うことで、世界初の小児心不全に対する細胞治療法を実用化することを目的とする。

A. 研究目的

研究代表者らがこれまでに開発してきた心臓内幹細胞を用いた自家細胞治療法は、平成21年9月に厚生科学審議会科学技術部会より、成人心不全に対する心筋内注入法を用いて臨床実施の承認許可が得られ、現在ALCADIA試験として登録実施中である。本研究事業では、欧米では小児心臓移植適応例の50%以上を占める単心室症由来の小児心不全

B. 研究方法

1. 小児心不全への細胞移植療法の第1相臨床試験プロトコルの作成と承認申請

岡山大学病院の治験センター及び遺伝子・細胞治療センターと連携をとり、臨床研究プロトコルを作成する。また、小児心不全の主たる病態である右心室負荷はラットの肺動脈を絞扼することで動物実験モデルとして作成し、大量培養した心臓内幹細胞を冠動脈内に直接注入することで細胞移植の前臨床研究を行い、小児心不全への細胞移植療法の安全性及び有効性の科学的根拠を得る。

## 2. 小児心臓組織を用いた心臓内幹細胞の分離・精製法の確立

小児心臓手術中に生じる余剰組織を用いたヒト心臓内幹細胞の基礎研究は、平成21年12月に岡山大学倫理委員会によって実施承認された。約100から250mgの心臓組織を用いて、自家細胞移植に必要な細胞数である30万個/kgまで2週間で大量複製できる培養技術を確立する（岡山大学病院、岡山大学医歯薬学総合研究科心臓血管外科）。

## 3. 先天性心疾患由来のヒトiPS細胞の樹立によるヒト心臓自己再生プログラムの解明

心臓手術時に精製したヒト心臓内幹細胞用いてiPS細胞樹立に必須であるヒト*Oct3/4/Klf4/Sox2/c-myc*のレンチウイルスベクターをそれぞれ作成し、ヒト心臓内幹細胞内に遺伝子導入させることでヒトiPS細胞を樹立する。

単心室及び二心室より樹立したヒトiPS細胞の包括的遺伝子解析を行い、かつ心筋障害時高い自己修復能力を持つzebrafishとの自己再生因子群との比較検証することで、ヒト心筋細胞特異的自己複製因子群を同定する（岡山大学病院、岡山大学医歯薬学総合研究科循環器内科）

（倫理面への配慮）

1. ヒト心臓組織の心筋生検による採取は、岡山大学医学部の倫理委員会にて審査承認された臨床研究プロトコル（承認番号766）に従順して行い、“手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について（平成10年厚生科学審議会答申）”を遵守する。
2. 臨床研究プロトコルはヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成18年告示第425号）を遵守して作成し、外部倫理委員会を含

めた体制で審査される。

3. 各関係者は臨床研究を遂行にあたり、“臨床研究に関する倫理指針”（平成20年厚生労働省告示第415号）を遵守して行う。
4. 臨床研究に参加する患者さんへのインフォームドコンセントを徹底して行い、危険性の説明と研究内容に関する理解を得る。同意書原本は説明文書と共にカルテに添付して岡山大学病院で保管する。

## C. 研究結果

### 1. 第1相臨床試験プロトコルの承認

第1相臨床試験への動物検証実験として、冠動脈注入法による細胞治療の安全性確認をSprague Dawleyラットにおける右心室圧負荷モデル用いて検証した。30匹のラットを2群に分け、18ゲージの針用いて、肺動脈に狭窄病変を作成した。術後1週間目において、手術による急性期死亡を免れたラット22匹についてさらに、細胞移植群(n=12)と非移植群(n=10)に分けて移植検討を行った。方法は10分間隔で、上行大動脈と肺動脈を同時に20秒間閉塞させ、その間に1mLに希釈した $1 \times 10^5$ 個のラット心臓内幹細胞を合計3回に分けて大動脈幹内に注入し、冠動脈内に投与した。非細胞移植群は同量の生理食塩水を注入した。

安全性の検証においては、細胞移植群12匹中1匹、非細胞移植群10匹中1匹が細胞移植前の再麻酔中で死亡したため解析対象から除外した。細胞移植群のうち5匹、非細胞移植群のうち4匹をそれぞれ移植前のコントロールとして解析した。移植手技を完結した細胞移植群6匹及び非細胞移植群5匹とも細胞移植後4週間まで生存し、病理組織学的検討を行った。冠動脈注入法においても、右室内血管周囲及び心内膜側にドナー細胞の生着を認め、

約3%が心筋細胞に分化した。もう一つ重要で期待された効果として、右室圧負荷によって、惹起された右室心筋での線維化領域が細胞移植によって有意に縮小した。

また、細胞移植群、非細胞移植群とも全例において、冠動脈注入時に心電図モニターによる監視を行い、両群とも虚血性変化や有害不整脈の発生は認められなかった。

## 2. 機能的単心室症に対する自己心臓内幹細胞移植療法の第1相臨床試験の実施

上記のような前臨床試験の検証の上、「機能的単心室症に対する自己心臓内幹細胞細胞移植療法の第1相臨床試験」のプロトコルが2010年12月に厚生科学審議会を経て、科学技術部会で実施承認された(厚生労働省発医政0104第5号)。

臨床研究プロトコルに則り、単心室性心不全に対する自家細胞移植による第I相臨床研究の登録を開始した。臨床試験名はTICAP試験(Transcoronary Infusion of Cardiac Progenitor Cells in Patients with Single Ventricle Physiology)

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01273857?term=TICAP&rank=1>

として臨床試験登録し、合計7名に対する安全性確認試験を予定している。現在まで、2症例の左室低形成症候群由来の単心室症患者さんに対して自家細胞移植を実施し、有害事象の発生もなく臨床経過は良好である。今後細胞移植後3か月目に心機能評価を行う予定である。

## D. 健康危険情報

該当なし。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① Yoshida M, Oh H. Stem Cell Engineering for Cardiac Tissue Regeneration. *Cardiology* 115:191-193 (2010).
- ② Isodono K, Takahashi T, Imoto H, Nakanishi N, Ogata T, Asada S, Adachi A, Ueyama T, Oh H, Matsubara H. PARM-1 is an Endoplasmic Reticulum Molecule Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis in Rat Cardiac Myocytes. *PLoS ONE* 18(5):e9746 (2010).

### 2. 学会発表

- ① Takehara N, Tsutsumi Y, Amano K, Oh H, Yaku H, Tabata Y, Matsubara H, Transplantation of autologous human cardiosphere-derived stem cells innovated via hydrogel surgical approach; the first-in-man clinical trial. *XX World Congress of International Society for Heart Failure*, 114:P-1-37-2 (2010. 5).
- ② 王 英正 小児心不全への細胞治療法の開発 第16回西日本小児がんセミナー 大阪 (2010. 2)
- ③ 王 英正 心筋再生医療が描く現在と未来 2010年循環器エキスパート合同ミーティング 岡山 (2010. 4)

## F. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし。

### 2. 実用新案登録

該当なし。

### 3. その他

該当なし。

厚生労働科学研究費補助金  
成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業  
(分担) 研究年度終了報告書

小児心不全に対する細胞治療と単心室症由来人工多能性幹(iPS)細胞  
の樹立による次世代心筋再生医療法の開発に関する研究

研究分担者 佐野俊二 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授

研究要旨

2009年7月に成立した改正臓器移植法により、国内での小児心臓移植の実施が可能となったが、小児における慢性的な心臓提供者不足は世界規模で深刻であり、新たな治療法の開発が注目されている。本研究事業では、左室低形成症候群をはじめとする機能的単心室症由来の小児心不全に対し、従来の外科的修復手術に加え、自己組織幹細胞移植によって心機能を向上させる新たな再生医療法を開発することを目的とする。

A. 研究目的

これまで多くの臨床研究の報告により、機能的単心室症に対する心臓シャント手術における予後予測因子が検討されたが、術前ハイリスク群や手術後も心機能が回復しない症例は、最終的に心臓移植に頼らざるを得ないのが現状である。特に第3期であるFontan手術を施行できなかった小児心不全や術後に心機能が改善しなかった症例において、心臓移植を行った症例についての長期成績を見ると、先天性心奇形を伴わない心臓移植群に比べ、有意に予後不良であることが明らかになった。すなわち、小児心臓移植の実績がほとんどないわが国にとって、機能的単心室症に対する標準

外科的治療以外に、中長期における生命予後を改善させる新たな治療法を開発することは、極めて重要な研究課題であると考えられる。

B. 研究方法

1. 心臓手術時の組織採取と幹細胞の培養

細胞移植予定日の3週間前の週に心臓手術のため、岡山大学病院・心臓血管外科に入院する。岡山大学病院・中央手術部において、手術中に100～250mgの心臓組織を右心房または右室流出路から採取する。採取した心臓組織は、滅菌された培養液の入った容器に入れ、速やかに岡山大学病院・遺伝子・細胞治療センターへ運搬される。運搬時

の温度は常温（20℃～25℃）とする。

心臓手術時に輸血前の自己血採血により15mLの全血から7mLの自己血清を分離する。培養は心臓組織採取後28日までとし、 $5.0 \times 10^6$ 個以上の細胞が確保できた時点で、培養を終了する。培養21日までに必要細胞数( $3.0 \times 10^6$ 個)に達しない場合は、細胞の適格性を不適と判断し、本治療対象から除外する。

## 2. 自己幹細胞の凍結保存と解凍再培養

予定数に到達後、培養皿より余剰心臓内幹細胞を回収、速やかに凍結する。凍結細胞は、岡山大学病院・遺伝子・細胞治療センターへ内の冷凍保管庫にある-150℃の超低温槽保存容器内にて保管する。細胞の取り違えがないように照合認識システム（メルコードシステム）と台帳を用いて製造管理者が管理する。

移植術予定日の7日前に、超低温槽保存容器内から凍結細胞を取り出し、37℃のヒートブロックで解凍する。解凍後、培養を再び開始する。

## 3. 冠動脈内への自己幹細胞移植

冠動脈注入法は以下のような方法で行う。

- 1) 試験治療として、全身麻酔下に4Fのシースを右下腿動脈より挿入する。
- 2) 術前診断に基づき、冠動脈造影を行い、機能的心室への支配冠動脈の走行及び瘤形成や器質的狭窄の有無を確認する。
- 3) カテーテル検査時には、初期にヘパリン急速飽和量（100 単位/kg）を投与する。
- 4) 移植する幹細胞の冠動脈内への接着及び浸透のため、perfusion balloon カテーテルを用いて移植する。
- 5) 自己心臓内幹細胞  $3.0 \times 10^5$  個/kg を合計 3ml の10%自己血清含む細胞用培養液に懸濁させ、1mLあたり100単位のヘパリンを混入させる。

6) 低圧で膨らましたバルーンの中を通じて、幹細胞を注入する。

7) 冠動脈内注入は1ml ずつ合計3回に分け、一回当たりの注入時間は3分とする。

8) それぞれの幹細胞注入後、3分間の休止時間を置き、心筋虚血時間を最小限にする。

## 4. 細胞移植後の補助療法

- 1) 細胞移植時の冠動脈内注入する30分前にアンカロン®注150を塩酸アミオダロンとして、10microgam/kg/minを容量型の持続注入ポンプ用いて、末梢静脈より投与する。
- 2) 術翌日より、アンカロンを4mg/kgを2回/日で術後7日まで内服投与とする。
- 3) 細胞移植時に収縮期血圧65mmHg以下の時は投与を一時中断し、昇圧剤その他の開心術時に必要とされる補助療法で回復の後、投与を再開する。

## C. 研究結果

### 1. 小児心不全への自家細胞移植の実施

岡山大学病院・心臓血管外科において、これまでに2症例の機能的単心室症に対して、心臓内幹細胞の自家細胞移植を実施した。登録した2症例とも1歳0か月の心不全を有する機能的単心室症で、平成23年4月26日に第1症例に対して、世界初の冠動脈内注入法による細胞移植を実施した。細胞移植後の経過として、不整脈及び微小な心筋梗塞などの有害事象の発生もなく経過良好で、5月3日に岡山大学病院を退院された。今後5月25日に細胞移植後1か月目の心機能評価を行う予定である。

また、第1症例目の安全性確認後、平成23年5月17日に当院において、第2症例目に対し細胞移植治療を実施した。現在までのところ経過は順調



であり、有害事象の発生は認められなかった。今後の臨床経過を慎重に評価していく予定である。

## 2. 細胞移植後のエンドポイント評価

2症例とも移植直後の主要エンドポイントである有害事象の検証の他、移植後1か月目に心機能評価を行う。評価項目として、チアノーゼなどの臨床症状、BNP値、心室駆出率、心室拡張末期圧、肺動脈圧、肺動脈圧格差、肺血管抵抗値などを心臓カテーテル検査、心エコー検査、心臓MRI、ヤシンチグラフィによって詳細に検証する。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① Kotani Y, Ishino K, Honjo O, Sano S. Fontan completion in patient with pulmonary artery sling associated with hypoplastic left heart syndrome. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Jul;140(1):e12-3 (2010).
- ② Miyahara Y, Kasahara S, Ishino K, Sakurai S, Sano S. Successful Fontan completion in a patient with noncompaction myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Apr;139(4):e85-7 (2010).
- ③ Ugaki S, Kasahara S, Kotani Y, Nakakura M, Douguchi T, Itoh H, Arai S, Sano S. Extracorporeal membrane oxygenation following Norwood stage 1 procedures at a single institution. *Artif Organs.* 2010 Nov;34(11):898-903.
- ④ Fujii Y, Kasahara S, Kotani Y, Takagaki M, Arai S, Otsuki S, Sano S. Double-barrel Damus-Kaye-Stansel operation is better than end-to-side Damus-Kaye-Stansel operation for preserving the pulmonary valve function: the importance of preserving the shape of the pulmonary sinus. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011 Jan;141(1):193-9.
- ⑤ Ugaki S, Kasahara S, Arai S, Takagaki M, Sano S. Combination of continuous irrigation and vacuum-assisted closure is effective for mediastinitis after cardiac surgery in small children. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2010 Sep;11(3):247-51.
- ⑥ Ugaki S, Kasahara S, Fujii Y, Sano S. Anatomical repair of a persistent left superior vena cava into the left atrium. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2010 Aug;11(2):199-201.
- ⑦ Fujii Y, Kotani Y, Takagaki M, Arai S, Kasahara S, Otsuki S, Sano S. Growth of the lateral tunnel in patients who underwent a total cavopulmonary connection at less than 5 years of age. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2010 Jul;38(1):66-70.
- ⑧ Kijima Y, Taniguchi M, Akagi T, Nakagawa K, Kusano K, Ito H, Sano S. Torn atrial septum during transcatheter closure of atrial septal defect visualized by real-time three-dimensional transesophageal echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 2010 Nov;23(11):1222. e5-8

2. 学会発表

- ① 佐野俊二 Change and Challenge - 胸部外科の  
の 変 革 と 未 来 へ の 挑 戦 - 第 63 回 日 本 胸 部 外  
科 学 会 定 期 学 術 集 会 2010
- ② Sano S Surgical management of Hypoplastic  
Left Heart Syndrome (HLHS) *The  
International HLHS Symposium - learning  
from experts 2010*
- ③ Sano S Norwood/Sano operation *The  
International HLHS Symposium - learning  
from experts 2010*
- ④ Sano S Results with Norwood Procedure *The  
International HLHS Symposium - learning  
from experts 2010*
- ⑤ Sano S Current surgical indications and  
outcomes for hypoplastic left heart  
syndrome *International Congress on  
Pediatric Cardiac Surgery 2010*
- ⑥ Sano S Outcomes and complications after  
arch repair *International Congress on  
Pediatric Cardiac Surgery 2010*
- ⑦ Sano S Evolution of single ventricle  
palliation in hypoplastic left heart  
syndrome *39th Annual Meeting of German  
Society for Thoracic and Cardiovascular  
Surgery 2010*
- ⑧ 佐野俊二 小児における心臓移植の実際とそ  
の 問 題 点 第 4 回 日 本 循 環 器 学 会 プ レ ス セ ミ  
ナ ー
- ⑨ 川副浩平、高橋幸宏、坂本喜三郎、大北 裕、  
佐野俊二、岡林 均、角 秀秋、坂田隆造、  
高梨秀一郎、田嶋一喜、夜久 均、荻野 均、  
小宮達彦 心臓外科トレーニングとしてのラ  
イブ手術と Animal-Lab Course 第 63 回 日 本

胸部外科学会定期学術集会

- ⑩ 笠原真悟、小林純子、平田昌敬、樽井 俊、  
櫻井 茂、藤井泰宏、鶴垣伸也、川畑拓也、  
立石篤史、藤田康文、新井禎彦、三井秀也、  
佐野俊二 Ebstein 氏病 - From Neonate to  
Adult - : Ebstein's Anomaly の 治 療 成 績 の 検  
討 - Neonate から Adult まで - 第 63 回 日 本 胸  
部 外 科 学 会 定 期 学 術 集 会
- ⑪ 笠原真悟、小林純子、平田昌敬、樽井 俊、  
櫻井 茂、藤井泰宏、鶴垣伸也、川畑拓也、  
立石篤史、藤田康文、高垣昌巳、新井禎彦、  
三井秀也、佐野俊二 HLHS に対する 21 世紀の  
外科治療 : Fontan 手術を目指した左心低形成  
症候群における段階的手術治療の進歩 第 63  
回 日 本 胸 部 外 科 学 会 定 期 学 術 集 会
- ⑫ 藤井泰宏、立石篤史、藤田康文、高垣昌巳、  
笠原真悟、新井禎彦、三井秀也、佐野俊二 低  
形成右室、Borderline 右室に対する戦略 (1  
心室? 1+1 心室? 1+1/2 心室? 2 心室?) :  
PA/IVS の 2 心室型修復術の可能性とその適応  
第 63 回 日 本 胸 部 外 科 学 会 定 期 学 術 集 会
- ⑬ 笠原真悟、小林純子、平田昌敬、樽井 俊、  
櫻井 茂、藤井泰宏、鶴垣伸也、川畑拓也、  
立石篤史、藤田康文、高垣昌巳、新井禎彦、  
三井秀也、佐野俊二 How to Do It/Difficult  
cases, Borderline cases : 低形成右室を持つ  
心室中隔欠損症の両心室治療を目指した段階  
的手術治療の 1 例 第 63 回 日 本 胸 部 外 科 学 会  
定 期 学 術 集 会
- ⑭ 新井禎彦、藤井泰宏、佐野俊和、石神修大、  
堀尾直裕、平田昌敬、櫻井 茂、鶴垣伸也、  
川畑拓也、立石篤史、藤田康文、高垣昌巳、  
笠原真悟、三井秀也、佐野俊二 PA/VSD,  
MAPCAs に対する外科治療の中期成績 第 63 回

日本胸部外科学会定期学術集会

- ⑮ 川畑拓也、笠原真悟、石神修大、平田昌敬、樽井 俊、小林純子、櫻井 茂、藤井泰宏、鵜垣伸也、立石篤史、藤田康文、高垣昌巳、新井禎彦、佐野俊二 新生児・乳児期の重症大動脈弁狭窄症に対する直視下交連切開術の検討 第63回日本胸部外科学会定期学術集会
- ⑯ 櫻井 茂、笠原真悟、佐野俊和、石神修大、堀尾直裕、平田昌敬、藤井泰宏、鵜垣伸也、川畑拓也、立石篤史、藤田康文、高垣昌巳、新井禎彦、三井秀也、佐野俊二 Mitral regurgitation を合併する anomalous origin of the left coronary artery from the pulmonary artery の長期成績 第63回日本胸部外科学会定期学術集会
- ⑰ 笠原真悟、堀尾直裕、石神修大、小林純子、平田昌敬、樽井 俊、櫻井 茂、藤井泰宏、鵜垣伸也、川畑拓也、立石篤史、藤田康文、高垣昌巳、新井禎彦、佐野俊二 右室流出路再建術式より考察したファロー四徴症の遠隔成績—肺動脈弁輪温存を目指して— 第63回日本胸部外科学会定期学術集会
- ⑱ 鵜垣伸也、笠原真悟、佐野俊和、石神修大、堀尾直裕、平田昌敬、樽井 俊、櫻井 茂、藤井泰宏、川畑拓也、立石篤史、藤田康文、高垣昌巳、三井秀也、佐野俊二 完全房室中隔欠損症の手術成績と再手術の危険因子 第63回日本胸部外科学会定期学術集会
- ⑲ 藤井泰宏、立石篤史、藤田康文、高垣昌巳、笠原真悟、新井禎彦、三井秀也、佐野俊二 Asplenia 患者の Fontan 手術後中長期成績 第63回日本胸部外科学会定期学術集会
- ⑳ 藤井泰宏、笠原真悟、佐野俊和、石神修大、堀尾直裕、平田昌敬、櫻井 茂、鵜垣伸也、

川畑拓也、立石篤史、藤田康文、高垣昌巳、三井秀也、佐野俊二 One and a half ventricular repair の中長期成績の検討：右室機能不全患者の根治術の選択肢とすべきか？ 第63回日本胸部外科学会定期学術集会

E. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

厚生労働科学研究費補助金  
成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業  
(分担) 研究年度終了報告書

小児心不全に対する細胞治療と単心室症由来人工多能性幹(iPS)細胞  
の樹立による次世代心筋再生医療法の開発に関する研究

研究分担者 伊藤 浩 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授

研究要旨

近年報告された特定諸因子群による線維芽細胞の人工多能性幹(iPS)細胞及び人工心筋(iCM)細胞への直接再プログラム化の研究成果から、次世代の心筋再生医療法として、未分化な前駆・幹細胞からさらに細胞分化系統を制御した高純度の成熟心血管細胞の移植法や複数遺伝子群の導入による心筋再生医療が可能となった。本研究目的は、自己複製能の高いヒト単心室症由来 iPS 細胞を用いた新規心臓自己再生プログラムを解明することで、ヒト心筋再生誘導因子群を同定し、新たな心筋再生医療を開発することである。

A. 研究目的

一定した心筋再生医療の臨床治療成績をあげるには、効率よく大量のヒト成熟心筋細胞を作成する技術開発が必須不可欠である。そのため、*GATA4/Tbx5/Mef2C*を用いたヒト心臓内線維芽細胞のヒトiCM細胞誘導化の試みとこれら3因子群以外の新たな変換因子群の探索が重要である。一方、zebrafishの心臓は単心室を示し、心室切除後に自己再生することが知られているが、哺乳類は通常二心室心であり、これまでに有用な単心室モデルが存在しなかった。

本研究では、単心室症及び二心室の患者さんより、心臓手術中に入手した余剰組織用いて心臓

内幹細胞を精製し、*Oct4/Klf4/Sox2/c-myc*を直接遺伝子導入することでヒトiPS細胞を樹立する。疾患別ヒトiPS細胞より分化させたヒト心筋細胞と心室切除後におけるzebrafish心の自己再生プログラムと比較検討することで、新たなヒト心筋細胞誘導因子群を同定する。

B. 研究方法

1. ヒト心臓内幹細胞よりヒトiPS細胞の樹立  
心臓手術時に不要となった余剰組織を用いた心臓内幹細胞の検討から、心機能が有意に低下している単心室由来の心臓内幹細胞は細胞分裂能が高く、比較対象となる二心室心に比べ、増殖速

度が速いため、約1週間早くiPS細胞を樹立できることも明らかとなった。合計70株のヒト心臓内幹細胞を用いて、以下の方法で実験を行う。

- ① 樹立した単心室及び二心室心由来のiPS細胞株及び心臓内幹細胞株を用いて網羅的遺伝子解析し、単心室症特異的な発現様式を示す心筋分化初期に重要な転写因子群を同定する。
  - ② 選択した候補遺伝子群をヒト心臓内幹細胞に導入し、心筋細胞への直接変換の程度を*alpha-MHC-eGFP*で定量化する。心室圧負荷モデルに移植し治癒効果を検証する。
2. 候補遺伝子群の心筋注入による虚血心における線維芽細胞の直接心筋分化誘導

冠動脈注入法を利用して、レンチウイルス*alpha-MHC-mcherry*及びレトロウイルス*CMV-eGFP*を作成し、冠動脈内注入法で心臓内にリポーター遺伝子の導入を行う。

実験モデルとして、ラットに心筋梗塞を作成し、梗塞痕ができる4週目まで飼育するこの方法では、全ての既存心筋細胞及び新たに再生した心筋細胞はmcherryで検出でき、自己複製能を持った線維芽細胞は常にeGFPでモニターできる。ヒトiCM細胞を誘導できる候補遺伝子群のレンチウイルスをそれぞれ作成し、心筋梗塞慢性期にラットを再開胸後、梗塞線維化領域に直接遺伝子導入する。

またこの方法では、候補遺伝子群によって人工的に作成した心筋細胞を移植する場合は、ドナー細胞は、心筋プロモーターである*alpha-MHC-eGFP*ならびにPGK-mcherryのレンチウイルスに二重感染させ移植し、細胞の生着性と心筋再生効率及び心筋組織線維化領域の評価を行う。

## C. 研究結果

機能的単心室症患者さんからの心臓組織用いでも、これまで通り、浮遊培養で幹細胞スフェアの形成が可能で、機械的にピックアップした幹細胞クローンを単一細胞の付着系培養で容易に大量増幅させることができた。

心機能が有意に低下している単心室由来の心臓内幹細胞は細胞分裂能が高く、比較対象となる二心室心に比べ、増殖速度が速いことが明らかとなった。病態背景の検討により、単心室患者さんは心不全重症度に比例して、血中bone morphogenetic protein (BNP) 値が高いことが判明した。さらにリコンビナントヒトBNPを細胞培養液に加えると幹細胞は増殖することから、単心室症の心臓内幹細胞は疲弊してなく、通常的心機能症例よりもむしろ増殖しやすく、二心室心由来心臓内幹細胞より、約1週間早くiPS細胞を樹立できることも明らかとなった。

機能的単心室症由来の幹細胞の転写因子プロファイルは、二心室心と同様、iPS細胞の樹立に必要な転写因子である*Oct3/4*とその下流因子である*Nr5a2*の発現が低く、皮膚由来線維芽細胞と異なり、心筋細胞分化に必要な転写因子群である*GATA4*を強く発現していた。さらに、機能的単心室症由来心臓内幹細胞は、両心室形成に必要な*HAND1*と*Nkx2.5*の発現が著しく低下していた。

さらに、下等動物の心臓は単心室の形態を示し、自己再生能力が極めて高いことから、今後ヒト単心室心由来のiPS細胞ならびに二心室心のヒトiPS細胞における包括的遺伝子プログラムの解析を進めることで、ヒト心臓における自己再生機構を明らかにし、次世代の再生医療法の開発につなげていく予定である。

## D. 研究発表

1. 論文発表

- ① Nakamura K, Akagi S, Ogawa A, Kusano KF, Matsubara H, Miura D, Fuke S, Nishii N, Nagase S, Kohno K, Morita H, Oto T, Yamanaka R, Otsuka F, Miura A, Yutani C, Ohe T, Ito H. Pro-apoptotic effects of imatinib on PDGF-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Int J Cardiol*. 2011 Mar 3.
- ② Take Y, Morita H, Wu J, Nagase S, Morita S, Toh N, Nishii N, Nakamura K, Kusano KF, Ohe T, Ito H, Zipes DP. Spontaneous electrocardiogram alterations predict ventricular fibrillation in Brugada syndrome. *Heart Rhythm*. 2011 Feb 10.
- ③ Ogawa A, Nakamura K, Mizoguchi H, Fujii N, Fujio H, Kusano KF, Ohe T, Ito H. Prednisolone ameliorates idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jan 1;183(1):139-40
- ④ Nishii N, Ogawa M, Morita H, Nakamura K, Banba K, Miura D, Kumagai N, Matsunaga A, Kawamura H, Urakawa S, Miyaji K, Nagai M, Satoh K, Nakagawa K, Tanaka M, Hiramatsu S, Tada T, Murakami M, Nagase S, Kohno K, Kusano KF, Saku K, Ohe T, Ito H. SCN5A mutation is associated with early and frequent recurrence of ventricular fibrillation in patients with Brugada syndrome. *Circ J*. 2010 Nov 25;74(12):2572-8.
- ⑤ Kijima Y, Taniguchi M, Akagi T, Nakagawa K, Kusano K, Ito H, Sano S. Torn atrial septum during transcatheter closure of atrial septal defect visualized by real-time three-dimensional transesophageal echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2010 Nov;23(11):1222. e5-8.
- ⑥ Nagase S, Hiramatsu S, Morita H, Nishii N, Murakami M, Nakamura K, Kusano KF, Ito H, Ohe T. Electroanatomical correlation of repolarization abnormalities in Brugada syndrome: detection of type 1 electrocardiogram in the right ventricular outflow tract. *J Am Coll Cardiol*. Dec 14;56(25):2143-5 (2010).
- ⑦ Miura A, Nakamura K, Kusano KF, Matsubara H, Ogawa A, Akagi S, Oto T, Murakami T, Ohtsuka A, Yutani C, Ohe T, Ito H. Three-dimensional structure of pulmonary capillary vessels in patients with pulmonary hypertension. *Circulation*. May 18;121(19):2151-3 (2010).
- ⑧ Toh N, Kanzaki H, Nakatani S, Ohara T, Kim J, Kusano KF, Hashimura K, Ohe T, Ito H, Kitakaze M. Left atrial volume combined with atrial pump function identifies hypertensive patients with a history of paroxysmal atrial fibrillation. *Hypertension*. May;55(5):1150-6 (2010).
- ⑨ Tanaka M, Nakamura K, Kusano KF, Morita H, Ohta-Ogo K, Miura D, Miura A, Nakagawa K, Tada T, Murakami M, Nishii N, Nagase S, Hata Y, Kohno K, Ouchida M, Shimizu K, Yutani C, Ohe T, Ito H. Elevated oxidative

- stress is associated with ventricular fibrillation episodes in patients with Brugada-type electrocardiogram without SCN5A mutation. *Cardiovasc Pathol.* 2011 Jan-Feb;20(1):e37-42.
- ⑩ Yamanaka R, Otsuka F, Nakamura K, Yamashita M, Otani H, Takeda M, Matsumoto Y, Kusano KF, Ito H, Makino H. Involvement of the bone morphogenetic protein system in endothelin- and aldosterone-induced cell proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells isolated from human patients with pulmonary arterial hypertension. *Hypertens Res.* 2010 May;33(5):435-45.
- ⑪ Toh N, Morita H, Nagase S, Taniguchi M, Miura D, Nishii N, Nakamura K, Ohe T, Kusano KF, Ito H. Atrial electrophysiological and structural remodeling in high-risk patients with Brugada syndrome: assessment with electrophysiology and echocardiography. *Heart Rhythm.* 2010;7(2):218-24.
- ⑫ Ikeda T, Nakamura K, Akagi S, Kusano KF, Matsubara H, Fujio H, Ogawa A, Miura A, Miura D, Oto T, Yamanaka R, Otsuka F, Date H, Ohe T, Ito H. Inhibitory effects of simvastatin on platelet-derived growth factor signaling in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010 Jan;55(1):39-48.
2. 学会発表
- ① 永瀬 聡、村上正人、多田 毅、田中正道、中川晃志、西井伸洋、中村一文、幡 芳樹、森田 宏、河野晋久、草野研吾、伊藤 浩 Prevalence and Clinical Significance of Apical Aneurysm in Hypertrophic Cardiomyopathy—Low Prevalence but High Risk of Sustained Ventricular Tachycardia. *Heart Rhythm* 2010
- ② 草野研吾、森 藍子、森田 宏、寒川睦子、野坂和正、大江 透、伊藤 浩 ECG Changes During Japanese Style Hot-Bathing in Patients with Brugada Syndrome *Heart Rhythm* 2010
- ③ 永瀬 聡、村上正人、多田 毅、田中正道、中川晃志、三浦大志、西井伸洋、中村一文、幡 芳樹、森田 宏、河野晋久、草野研吾、伊藤 浩 Early Repolarization at Left Ventricular Epicardial Potential is Associated with Fatal Arrhythmic Events in Brugada Syndrome *Heart Rhythm* 2010
- ④ 森田 宏、Douglas P. Zipes, 永瀬 聡、西井伸洋、草野研吾、大江 透、伊藤 浩、Jiashin Wu Mapping of Polymorphic Ventricular Tachycardia in Patients and an Experimental Model of Brugada Syndrome *Heart Rhythm* 2010
- ⑤ 杜 徳尚、西井伸洋、森田 宏、谷口 学、永瀬 聡、中村一文、草野研吾、伊藤 浩 Defibrillation Threshold Testing During Implantable Cardioverter-Defibrillator Implantation Causes Transient Impairment of Cardiac Function *Heart Rhythm* 2010
- ⑥ 西井伸洋、森田 宏、永瀬 聡、中村一文、

- 幡 芳樹、河野晋久、草野研吾、伊藤 浩 Two Cases of Inappropriate ICD Therapies due to T Wave Oversensing Induced by Body Twisting *Heart Rhythm* 2010
- ⑦ 森田 宏、永瀬 聡、西井伸洋、中村一文、草野研吾、大江 透、伊藤 浩 Exercise Aggregates Fragmented QRS in Patients with Brugada Syndrome *Heart Rhythm* 2010
- ⑧ 杜 徳尚、伊藤 浩 Transient Deterioration of Left Ventricular Diastolic Function Caused by Defibrillation Threshold Testing During Implantable-Cardioverter Defibrillator Implantation: Its Impact on Ca<sup>2+</sup> Transient and Clinical Evidence 第83回米国心臓学会
- ⑨ 中村一文、伊藤 浩 Imatinib in the Presence of Platelet-derived Growth Factor Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension 第83回米国心臓学会
- ⑩ 三好 亨、伊藤 浩 Cd44 Contributes to the Development of Abdominal Aortic Aneurysm in Mice Through the Interaction With Hyaluronic Acid and the Recruitment of Macrophages 第83回米国心臓学会
- ⑪ 三好 亨、伊藤 浩 Serum Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein is Associated With Coronary Lesion Complexity in Patients With Coronary Artery Disease 第83回米国心臓学会
- ⑫ 中村一文、伊藤 浩 Increased Cardiomyocyte Stiffness in the Transverse Direction and Incomplete Relaxation in Hypertrophied Rat Hearts Induced by Chronic  $\beta$ -adrenergic Stimulation 第83回米国心臓学会
- ⑬ 赤木 達、伊藤 浩 Prostaglandin 12 Induced Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells Apoptosis via Upregulation of Fas Ligand in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension 第83回米国心臓学会
- ⑭ 福家聡一郎、伊藤 浩 Difference in Right Ventricular Loading Between Patients With Pulmonary Hypertension and Patients With Left Sided Heart Failure 第83回米国心臓学会
- ⑮ 小川愛子、伊藤 浩 Bosentan Inhibits Proliferation of Cells Isolated from Patients with Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension 第83回米国心臓学会
- ⑯ 三浦 綾、伊藤 浩 Differences of Diameter of Pulmonary Capillary Vessels in Patients with Pulmonary Hypertension Using Scanning Electron Microscope 第83回米国心臓学会
- E. 知的財産の出願・登録状況
4. 特許取得  
該当なし。
5. 実用新案登録  
該当なし。
6. その他  
該当なし。



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
小出正洋、 王 英正、 松原弘明	ヒト心臓由来幹細胞を用いた心不全への再生医療	田畑泰彦	再生誘導治療	株式会社メディカルドウ	東京	2009	165-172
岸田 聡、 王 英正、 松原弘明	自己心臓幹細胞を用いた心不全への細胞治療	北風政史	重症心不全の予防と治療	中外医学社	東京	2009	496-502
竹原有史、 松原弘明、 王 英正	Cardiosphereによる心筋再生	山口徹、小室一成、高本真一、中沢誠	Annual Review 循環器	中外医学社	東京	2009	10-17
王 英正	心筋幹細胞	佐田政隆	循環器科	科学評論社	東京	2009	453-460
竹原有史、 塘 義明、 王 英正、	重症心不全に対する細胞治療法	佐田政隆	循環器科	科学評論社	東京	2009	392-399
山口真一郎、 王 英正、 松原弘明	Cardiosphereによる心筋再生医療	小室一成、永井敏雄、三浦俊郎、山下潤	分子心血管病	先端医学社	東京	2009	40-47
王 英正	新しい心臓再生法	小室一成	Medical View Point	株式会社メディカルドウ	東京	2009	3-4
中西直彦、 王 英正、 松原弘明	Cardiosphereを用いた心筋再生医療	小室一成、永井敏雄	再生医療	メディカルレビュー社	東京	2009	74-81
中西直彦、 王 英正、 松原弘明	Cardiosphereを用いた心筋再生医療	和泉徹	総合臨床	永井書店	東京	2009	591-598

雑誌 (王 英正)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Isodono K, Takahashi T, Imoto H, Nakanishi N, Ogata T, Asada S, Adachi A, Ueyama T, Oh H, Matsubara H.	PARM-1 is an Endoplasmic Reticulum Molecule Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis in Rat Cardiac Myocytes.	<i>PLoS ONE</i>	18	e9746	2010

Yoshida M, <u>Oh H.</u>	Stem Cell Engineering for Cardiac Tissue Regeneration.	<i>Cardiology</i>	115	191-193	2010
Satomi-Kobayashi S, Ueyama T, Mueller S, Toh R, Masano T, Sakakida T, Rikitake Y, Miyoshi J, Matsubara H, <u>Oh H.</u> , Kawashima S, Hirata K, Takai Y.	Deficiency of nectin-2 leads to cardiac fibrosis and dysfunction under chronic pressure overload.	<i>Hypertension</i>	54	825-831	2009

雑誌 (佐野俊二)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kotani Y, Ishino K, Honjo O, <u>Sano S.</u>	Fontan completion in a patient with pulmonary artery sling associated with hypoplastic left heart syndrome.	<i>J Thorac Cardiovasc Surg.</i>	140	e12-13	2010
Miyahara Y, Kasahara S, Ishino K, Sakurai S, <u>Sano S.</u>	Successful Fontan completion in a patient with noncompact myocardium.	<i>J Thorac Cardiovasc Surg.</i>	139	e85-87	2010
Ugaki S, Kasahara S, Kotani Y, Nakakura M, Doguchi T, Itoh H, Arai S, <u>Sano S.</u>	Extracorporeal membrane oxygenation following Norwood stage 1 procedures at a single institution.	<i>Artif Organs.</i>	34	898-903	2010
Fujii Y, Kasahara S, Kotani Y, Takagaki M, Arai S, Otsuki S, <u>Sano S.</u>	Double-barrel Damus-Kaye-Stansel operation is better than end-to-side Damus-Kaye-Stansel operation for preserving the pulmonary valve function: the importance of preserving the shape of the pulmonary sinus.	<i>J Thorac Cardiovasc Surg.</i>	141	193-199	2010
Ugaki S, Kasahara S, Arai S, Takagaki M, <u>Sano S.</u>	Combination of continuous irrigation and vacuum-assisted closure is effective for mediastinitis after cardiac surgery in small children.	<i>Interact Cardiovasc Thorac Surg.</i>	11	247-251	2010

Ugaki S, Kasahara S, Fujii Y, Sano S.	Anatomical repair of a persistent left superior vena cava into the left atrium.	<i>Interact Cardiovasc Thorac Surg.</i>	11	199-201	2010
Kijima Y, Taniguchi M, Akagi T, Nakagawa K, Kusano K, Ito H, Sano S.	Torn atrial septum during transcatheter closure of atrial septal defect visualized by real-time three-dimensional transesophageal echocardiography.	<i>J Am Soc Echocardiogr.</i>	23	e5-8	2010
Fujii Y, Kotani Y, Takagaki M, Arai S, Kasahara S, Otsuki S, Sano S.	Growth of the lateral tunnel in patients who underwent a total cavopulmonary connection at less than 5 years of age.	<i>Eur J Cardiothorac Surg.</i>	38	66-70	2010

雑誌 (伊藤 浩)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakamura K, Akagi S, Ogawa A, Kusano KF, Matsubara H, Miura D, Fuke S, Nishii N, Nagase S, Kohno K, Morita H, Oto T, Yamana R, Otsuka F, Miura A, Yutani C, Ohe T, Ito H.	Pro-apoptotic effects of imatinib on PDGF-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension.	<i>Int J Cardiol.</i>	EPub ahead of print		2010
Take Y, Morita H, Wu J, Nagase S, Morita S, Tachibana N, Nishii N, Nakamura K, Kusano KF, Ohe T, Ito H, Zipes DP.	Spontaneous electrocardiogram alterations predict ventricular fibrillation in Brugada syndrome.	<i>Heart Rhythm.</i>	EPub ahead of print		2010
Ogawa A, Nakamura K, Mizoguchi H, Fujii N, Fujio H, Kusano K, Ohe T, Ito H.	Prednisolone ameliorates idiopathic pulmonary arterial hypertension.	<i>Am J Respir Crit Care Med.</i>	183	139-140	2010

Nishii N, Ogawa M, Morita H, Nishikawa K, Banba K, Miura D, Kurumaya N, Matsunaga A, Kawamura H, Urakawa S, Miyaji K, Nagai M, Satoh K, Nakagawa K, Tanaka M, Hiramatsu S, Tada T, Murakami M, Nagase S, Kohno K, Kusano KF, Saku K, Ohe T, <u>Ito H.</u>	SCN5A mutation is associated with early and frequent recurrence of ventricular fibrillation in patients with Brugada syndrome.	<i>Circ J.</i>	74	2572-2578	2010
Kijima Y, Taniguchi M, Akagi T, Nakagawa K, Kusano K, <u>Ito H.</u> , Sano S.	Torn atrial septum during transcatheter closure of atrial septal defect visualized by real-time three-dimensional transesophageal echocardiography.	<i>J Am Soc Echocardiogr.</i>	23	e5-8	2010
Nagase S, Hiramatsu S, Morita H, Nishii N, Murakami M, Nakamura K, Kusano KF, <u>Ito H.</u> , Ohe T.	Electroanatomical correlation of repolarization abnormalities in Brugada syndrome: detection of type 1 electrocardiogram in the right ventricular outflow tract.	<i>J Am Coll Cardiol.</i>	56	2143-2145	2010
Miura A, Nakamura K, Kusano KF, Matsubara H, Ogawa A, Akagis S, Oto T, Murakami T, Ohtsuka A, Yutani C, Ohe T, <u>Ito H.</u>	Three-dimensional structure of pulmonary capillary vessels in patients with pulmonary hypertension.	<i>Circulation.</i>	121	2151-2153	2010
Toh N, Kanzaki H, Nakatani S, Ohara T, Kim J, Kusano KF, Hashimura K, Ohe T, <u>Ito H.</u> , Kitakaze M.	Left atrial volume combined with atrial pump function identifies hypertensive patients with a history of paroxysmal atrial fibrillation.	<i>Hypertension.</i>	55	1150-1156	2010