

201106011A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

低侵襲・ヒト幹細胞デリバリーシステムによる 重症心不全治療実用化基盤技術の開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡本 一真

平成 24 (2012) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

低侵襲・ヒト幹細胞デリバリーシステムによる 重症心不全治療実用化基盤技術の開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡本 一真

平成 24 (2012) 年 3 月

目 次

I.	総括研究報告		
	低侵襲・ヒト幹細胞デリバリーシステムによる		
	重症心不全治療実用化基盤技術の開発に関する研究	-----	3
	岡本一真		
II.	分担研究報告		
	1. 細胞デリバリーシステムの開発に関する研究	-----	9
	四津良平		
	2. ヒト幹細胞の調整に関する研究	-----	11
	三好俊一郎		
	3. ヒト幹細胞の調整に関する研究	-----	13
	五條理志		
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	17
IV.	研究成果の刊行物・別刷	-----	21

I. 総括研究報告

低侵襲・ヒト幹細胞デリバリーシステムによる
重症心不全治療実用化基盤技術の開発に関する研究

岡本 一真

低侵襲・ヒト幹細胞デリバリーシステムによる 重症心不全治療実用化基盤技術の開発

研究代表者 岡本一真 慶應義塾大学医学部外科（心臓血管）助教

研究要旨：重症心不全に対するヒト幹細胞移植において、内視鏡下・低侵襲アプローチを応用することで、心筋への細胞移植を受けるレシピエントに侵襲が少なく、安全で効率的な移植システムを構築することを目的としている。細胞移植治療の臨床応用において、細胞移植における外科的侵襲の大きさが臨床応用を阻んでいることから、移植手法の低侵襲化は急務である。これを踏まえ、本研究では従来の大きな外科的侵襲を伴うアプローチとは異なり、移植手法の低侵襲化を目指している。今年度は、1) ビーグル犬に対する胸腔鏡および心嚢内視鏡を用いた心筋への細胞移植、及び、2) 細胞移植治療の細胞ソースとして同種移植として免疫寛容が期待される胎児付属物である胎盤および羊膜由来の細胞に安定培養系を確立するとともに、in vitro での評価系を構築した。

研究分担者

四津良平

慶應義塾大学医学部外科（心臓血管） 教授

三好俊一郎

慶應義塾大学医学部循環器内科 講師（非常勤）

五條理志

東京都健康長寿医療センター 心臓外科 副部長
（現：京都府立医科大学大学院 医学研究科人工臓器・心臓移植再生医学講座 教授）

A. 研究目的

本研究課題は、重症心不全に対するヒト幹細胞移植において、内視鏡下・低侵襲アプローチを応用することで、心筋への細胞移植を受けるレシピエントに侵襲が少なく、安全で効率的な移植システムを構築することを目的としている。そして、本研究の最終的なゴールは、人工心臓や心臓移植に代わる重症心不全治療の切り札としてヒト幹細胞移植をベッドサイドに導入することである。重症心不全治療において心臓移植が果たしてきた役割は大きいですが、世界的なドナー不足の中、心臓移植に代わる治療として、細胞治療に大きな期待が集め、心不全治療を目指した幹細胞研究が着実に進んでいる。そして臨床への応用において不可欠なのは、有効な心筋への細胞移植法の実用化である。従来のアプローチによる外科的侵襲の大きさが、細胞移植治療の臨床応用を阻んでいることから、移植手法の低侵襲化は急務であり、本研究は重症心不全治療の実用化に大きく貢献する。

B. 研究方法

1 心不全心に対する内視鏡下低侵襲幹細胞移植法の開発

1.1 胸腔鏡アプローチ

国内外で行われている小切開低侵襲心臓外科手術において培われている心臓への安全なアプローチ法、有効な視野展開法、ストレスのない手術操作法について情報収集・意見交換を行い、開発中の低侵襲細胞移植デバイス開発に応用する。

全身麻酔下のビーグル犬を用いて、内視鏡補助下低侵襲心臓弁膜症手術として臨床応用されている技術を応用した胸腔鏡アプローチによる幹細胞移植技術の開発を行う。

1.2 心嚢内視鏡アプローチ

全身麻酔下のビーグル犬を用いて、セルディング法により心嚢内に内視鏡を挿入して心嚢内の視野を確保する。各種マニピュレータープロトタイプを用いて、心嚢内で細胞移植シミュレーションを行い、器具の最適化を行った。既製の内視鏡システムを用いた心嚢内での内視鏡手術手技の確立、マニピュレータを含めた周辺機器の最適化、心外膜側からの細胞移植デバイスツールを開発する。

心嚢内視鏡アプローチでビーグル犬の左室に青色色素の注入、ビーズの注入、ヒト胎盤由来間葉系細胞の左室 20 カ所へ移植する。完結的動脈圧ラインや心電図の解析により、手技中の血行動態の変化をモニタリングする。

細胞移植においては、single port を通じた、内視鏡・細胞移植機構一体型のデバイス

を用いる場合と two ports で心嚢内視鏡ポートと working port を分けた場合の二通りを行い、それぞれの長所・短所を検討する。

2. ブタ幹細胞調製法の確立

2.1. ブタ間葉系幹細胞培養システムの確立

ヒトで行われてきた in vitro の研究をブタへ移行し in vivo での挙動を含めて実験を行える環境を整備する。重症心不全に対する幹細胞移植においては、一定数の細胞を安定的、効率的に樹立しかつ大量に増やす必要がある。そこでブタ胎児付属物由来間葉系細胞について、採取法から樹立に至るまでの培養法について検証を行う。

2.2. ブタ幹細胞の特性解析

得られた細胞について、増殖能や細胞表面マーカーについて検討し、樹立した細胞の特性を明らかにする。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究を施行した。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行した。「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮した。本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないよう、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う準備を整えたうえで研究を遂行した。

実験動物を用いる研究については、当該施設動物実験指針に準拠して研究を実施した。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめ、その際も、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。

また本研究では、アデノウイルスベクターを用いた、遺伝子組み換え技術が用いられた。当該研究は当該施設、遺伝子組み換え実験安全委員会によって適正に審査を受け承認を受けており、運営上でも最新の注意を払って研究をすすめた。

C. 研究結果

1. 心不全心に対する内視鏡下低侵襲幹細胞移植法の開発

1.1. 胸腔鏡アプローチ

国内外の多くの低侵襲心臓弁膜症手術の拠点施設と意見交換を行い、低侵襲心臓弁膜症手術を支える最新の手術器具開発および心臓への側方小開胸アプローチの技術的進歩についての情報収集を行った。

ビーグル犬を用いて胸腔鏡アプローチで左室の前壁・側壁に確実にアプローチできるこ

とを確認した。これに必要なデバイスや視野展開法について検討し、一定の胸腔鏡下細胞移植法のマニュアル化に成功した。

1.2. 心嚢内視鏡アプローチ

ビーグル犬を用いた心嚢内視鏡アプローチの検討により、左室の広範な範囲に到達することができ、ターゲットとなる心筋を確認しながら心筋への細胞移植が確実にできることが確認された。また、内視鏡先端に超音波診断装置を組み込み、細胞注入針心筋内にあることを確実に見極め、細胞が心腔内に注入されないことを確認できるシステムを構築した。

Single port 法ではターゲットに対して細胞移植鉗子をより確実に誘導することが出来たが、搭載する内視鏡カメラの大きさに制限があり、内視鏡画像の品質の面で改良の余地があった。

Two ports 法では、内視鏡画像の室に問題はないものの、小さい作業スペースに、内視鏡と作業用鉗子の二つが入るため、互いに干渉して作業を円滑に進める点で難点があった。

2. ブタ幹細胞調製法の確立

2.1. ブタ幹細胞の培養法の確立

ブタ胎児付属物である胎盤および羊膜を組織学的に分類して採取し、細胞の樹立を試み、各組織より細胞を安定的に樹立する方法をほぼ確立できた。

2.2. ブタ幹細胞の特性解析

各組織から得られた細胞の遺伝子発現解析ならびに細胞表面マーカーの解析を行った。各組織由来の細胞は間葉系マーカーの発現が認められ、また遺伝子発現解析の結果も骨髄由来間葉系細胞に近いことが認められた。前項までに確立したブタ胎児付属物組織由来幹細胞の培養法について、より多くの検体を用いて検証した結果、一部において細胞の増殖が低いものが認められた。そこで特性解析から得られた情報をもとにし特定の因子を添加することで問題の解決を図り、多くの組織由来幹細胞をほぼ安定的に培養することが可能となった。

D. 考察

胸腔鏡アプローチを用いて左室の全域にアプローチが可能であり、小切開低侵襲心臓外科手術で用いられている手術デバイスや視野展開法を応用することで安全に心筋細胞移植を行うことが十分可能であることが確認された。細胞を移植する際に最も問題になるのは左室の拍動である。これをうまく制御して安全に細胞を移植することができるデバイスの開発が今後の臨床応用の鍵となる。

心嚢内視鏡アプローチは全く新しい内視鏡アプローチであり、心嚢内視鏡技術自体が開発途上であるが、関連するデバイス開発とともに、臨床応用が具体化しつつある。

左心室に対する作業を行う方法として、Single port 法と Two Ports 法を試みた。それぞれに長所・短所があるが、心嚢の作業スペースの狭さを考えると Single port 法による移植システムの構築を軸に臨床応用を図るのが現実的であるとがんが得る。

問題点として、心嚢内への侵入時に trauma tap により心臓を傷つけ、出血を来すことが挙げられる。いずれも保存的にあるいは圧迫止血により問題は解決したが、ヒトへの臨床応用を考える際には解決しなければならない問題である。また、心嚢腔に達するまえに、シースが胸腔を貫き、その際に気胸を来すことがあり、これも解決しなければならない問題である。

細胞移植システムの構築には、ソースとなる細胞の安定した培養システム、移植細胞の生着率向上、分化誘導効率に関して科学的根拠を示す必要がある。移植細胞の有用性と、それを実際に入れる移植技術の開発は一体となって進めていくことはじめて臨床的に効果的な治療法へと結びつく。本研究での内視鏡下・低侵襲アプローチによる移植技術と移植細胞ソースとしての胎児付属物由来細胞の有用性とを結びつけることで、患者負担の少ない心不全治療へとつながる基盤ができたといえる。

E. 結論

胸腔鏡アプローチ・心嚢内視鏡アプローチともに安全・確実に左室に細胞を移植する方法として十分に可能性のある方法であることを確認した。臨床応用に向けて解決しなければならない問題点はあるが、デバイス開発や手術手技の改善により、より安全な手技として低侵襲細胞移植システムの整備が可能である。免疫寛容の分子機構解明にむけた検討を行い、免疫寛容と心筋分化能が関連している可能性を示唆するデータを得られたことは、今後の同種移植の実現化にむけた科学的根拠を示すための大きな突破口になるものと考えられた。今後期待される多能性幹細胞(ES細胞, iPS細胞)を念頭にした移植医療への基盤研究へとつながることも期待できる。

F. 健康危険情報

健康危険情報について特記すべき事項は生じなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yozu R, Okamoto K, Kudo M, Nonaka H, Adams DH. New innovative instruments facilitate both direct-vision and endoscopic-assisted mini-mitral valve surgery. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. 2011 Jun 29.

2. 学会発表

Kiyokazu Kokaji, Shunichiro Miyoshi, Tatsuo Takahashi, Kazuma Okamoto, Takehiro Kimura, Masahito Munakata, Kohei Inagawa, Nobuhiro Nishiyama, Naoko Hida, Hikaru Tsuruta, Osamu Ishida, Satoshi Ogawa, Akihiro Umezawa, Ryohei Yozu. Pretreatment of Autologous Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells with Pioglitazone Improved the Efficacy of Transplantation on Cardiac Function in Beagle. American College of Cardiology 60th Annual Scientific Session and Innovation April 3, 2011

Port-Access ASD 手術の体外循環に関する問題点とその対応についての検討 越川翠 又吉徹 柴野豊彦 植田健 茂田綾 根岸壮親 坂井聖子 佐藤慎吾 森田雅教 岡本一真 工藤樹彦 古梶清和 四津良平

New Innovative Instruments Facilitate Both Direct-vision and Endoscopic-assisted Mini-mitral Valve Surgery. R. Yozu, K. Okamoto, M. Kudo, H. Nonaka, D. Adams. Mitral Conclave (2011/5 NewYork)

心嚢内視鏡を用いた心筋への低侵襲ヒト幹細胞デリバリーシステムの開発 岡本一真、三好俊一郎、木村雄弘、肥田直子、四津良平 第15回日本心筋・血管新生療法研究会 (2011/7/14 松本)

ASD CLOSURE VIA ENDOSCOPIC-ASSISTED MINI-THORACOTOMY APPROACH. Kazuma Okamoto, Mikihiro Kudo, Ryohei Yozu ASCVTS-ATCSA 2011 Joint Meeting of 19th ASCVTS and 21st ATCSA (2011/5/28, Phuket, Thailand)

LOOP-TECHNIQUE FOR MITRAL VALVE REPAIR. Ryohei Yozu, Mikihiro Kudo, Kazuma Okamoto, Atsushi Nemoto, Kentaro Yamabe ASCVTS-ATCSA 2011 Joint Meeting of 19th ASCVTS and 21st ATCSA, (2011/5/29, Phuket, Thailand)

New innovations of instruments and techniques facilitate endoscopic-assisted mitral valve

repair via minithoracotomy. Kazuma Okamoto, Mikihiko Kudo, David Adams, Ryohei Yozu Annual Scientific Meeting of The International Society for Minimally Invasive Cardiothoracic Surgery (2011/6/8-11, Washington DC)

Clinical Results Of Mitral Valve Repair Using Loop Technique Via Minithoracotomy Approach For Adult Congenital Mitral Regurgitation. Hiroyuki Kawajiri, Mikihiko Kudo, Kazuma Okamoto, Ryohei Yozu Annual Scientific Meeting of The International Society for Minimally Invasive Cardiothoracic Surgery (2011/6/8-11, Washington DC)

“Second generation” loop-technique による小開胸僧帽弁形成術 岡本一真、工藤樹彦、四津良平 第 64 回 日本胸部外科学会定期学術集会 (2011/10/12 名古屋)

“loop technique” を用いた僧帽弁形成術 210 症例の検討 工藤樹彦、岡本一真、古梶清和、四津良平 第 64 回 日本胸部外科学会定期学術集会 (2011/10/12 名古屋)

心臓外科領域におけるロボット手術および鏡視下手術への取り組み 岡本一真、工藤樹彦、四津良平 第 3 回小切開・鏡視外科学会 Grand Symposium (2011/11/12 東京)

Valvoplasty in heart surgery Minimally invasive mitral valve surgery on a routine basis 四津良平 工藤樹彦 岡本一真 古梶清和 根本淳 山邊健太郎 日本外科学会 (2011)

3. 著書

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

II. 分担研究報告

1. 細胞デリバリーシステムの開発に関する研究

四津 良平

2. ヒト幹細胞の調整に関する研究

三好 俊一郎

3. ヒト幹細胞の調整に関する研究

五條 理志

低侵襲・ヒト幹細胞デリバリーシステムによる 重症心不全治療実用化基盤技術の開発

研究分担者 四津良平 慶應義塾大学医学部外科（心臓血管） 教授

研究要旨：心不全治療を目指した幹細胞研究が着実に進む中、臨床へ向けた移植手法の低侵襲化を目指し重症心不全治療の実用化に大きく貢献することを目指している。低侵襲小切開心臓弁膜症手術において用いられている、小切開手術用開胸器・内視鏡手術用鉗子、術野展開法などの検討を通じて、胸腔鏡アプローチによる心筋への細胞移植が安全・確実に施行できるための基盤構築をおこなった。

A. 研究目的

本研究課題は重症心不全に対するヒト幹細胞移植において、内視鏡下・低侵襲アプローチを応用することによって、移植レシピエントの負荷を低減し安全で効率的な細胞移植システムを構築することを目的とする。

B. 研究方法

内視鏡補助下低侵襲心臓弁膜症手術として臨床応用されている技術を応用した胸腔鏡アプローチによる幹細胞移植技術の開発を行う。国内外の低侵襲心臓外科手術の拠点施設との意見交換を密に行い、小切開手術用開胸器・内視鏡手術用鉗子、術野展開法などを検討する。ビーグル犬を用いた実験において、心筋に対して安全に幹細胞を確実に移植する方法についての検討を行う。

（倫理面への配慮）

本研究では、ヒト由来細胞ならびに実験動物を用いた研究を行った。ヒト由来組織の採取にあたっては、研究機関における倫理委員会に研究計画を申請し承認を得ている。また動物実験については当該動物実験指針に準拠して研究を行った。動物実験計画を申請し承認を得ており、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物の使用は目的に合致した最小限にとどめ、苦痛を与えない等の倫理的な配慮を行った。

C. 研究結果

ビーグル犬において鏡視下アプローチで左室心筋の広範な部位に安全に到達できることを確認した。内視鏡で目標部位を確認しながら確実に対象部位に細胞移植することが可能であることを確認した。また、手技中の血行動態が安定しており、術後の長期生存も可能であることを確認した。

D. 考察

既に臨床応用されている胸腔鏡アプローチを用いて左室心筋に安全に到達し幹細胞を安全に移植することは十分可能である。今後、胸腔鏡による心臓への到達法および拍動する心臓を安定化して安全に細胞移植する方法について知見を深める必要性がある。

E. 結論

内視鏡下・低侵襲アプローチによる細胞移植システムを確立するために、胸腔鏡による重症心不全に対する幹細胞移植法は非常に有用であった。視野、操作性ともに良好で臨床応用が十分可能であったが、左心室への有効な到達法および細胞移植手技についてはさらなる検討を要する。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

心臓手術の実際 外科医が語る術式、麻酔科医が語る心臓麻酔、臨床工学技士が語る体外循環法（第19回）低侵襲心臓外科手術（MICS）における体外循環法 根本淳 四津良平 山田達也 又吉徹
Clinical Engineering (0916-460X) 22 巻 11 号
Page1069-1077 (2011. 10)

2. 学会発表

四津良平 Mitral Valve Repair via Port-Access Approach Edwards International Valve Forum in Japan (2011/2/6 東京)

工藤樹彦 四津良平 古梶清和 石田 治 根本淳 山辺健太郎 河尻拓之 小谷聡秀 僧帽弁形成術におけるM I C Sの工夫—安全・確実な mini

mitral valve repair に向けて— 第41回日本心臓血管外科学会学術総会(2011/2/23 舞浜)
工藤樹彦 四津良平 古梶清和 石田 治 根本淳 山辺健太郎 河尻拓之 小谷聡秀 僧帽弁手術における標準化術式としての mini mitral valve surgery 第41回日本心臓血管外科学会学術総会(2011/2/24 舞浜)

Ryohei Yozu, New Innovative Instruments Facilitate Both Direct-Vision And Endoscopic-Assisted Mini-Mitral Valve Surgery Mitral Conclave 2011(May 5, 2011, New York, U. S. A)

四津良平 工藤樹彦 岡本一真 古梶清和 根本淳 山邊健太郎 Minimally invasive mitral valve surgery on a routine basis 第111回日本外科学会定期学術集会【紙上開催】(2011/5)

ASD CLOSURE VIA ENDOSCOPICASSISTED MINI-THORACOTOMY APPROACH Kazuma Okamoto, Mikihiro Kudo, Ryohei Yozu ASCVTS-ATCSA 2011 Joint Meeting of 19th ASCVTS and 21st ATCSA, (2011/5/28, Phuket, Thailand,)

Ryohei Yozu, Loop's Technique for Mitral Valve Repair ASCVTS-ATCSA 2011 Joint Meeting of 19th ASCVTS and 21st ATCSA (May 29, 2011, Phuket, Thailand)

New innovations of instruments and techniques facilitate endoscopicassisted mitral valve repair via minithoracotomy. Kazuma Okamoto, Mikihiro Kudo, David Adams, Ryohei Yozu Annual Scientific Meeting of The International Society for Minimally Invasive Cardiothoracic Surgery (2011/6/8-11, Washington DC)

四津良平(講演)新しい心臓手術:ポータアクセス法500例の経験 第9回 永山循環器セミナー(2011/7/2 東京)

岡本一真 工藤樹彦 四津良平 “Second generation” loop-technique による右小開胸僧帽弁形成術 第64回日本胸部外科学会定期学術集会(2011/10/12 名古屋)

工藤樹彦 四津良平 岡本一真 古梶清和 根本淳 山邊 健太郎 河尻拓之 “loop technique”を用いた僧帽弁形成術-210症例の検討- 第64回日本胸部外科学会定期学術集会(2011/10/12 名古屋)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
なし

低侵襲・ヒト幹細胞デリバリーシステムによる 重症心不全治療実用化基盤技の開発

研究分担者 三好俊一郎 慶應義塾大学医学部循環器内科 講師（非常勤）

研究要旨：心機能が悪い患者に対しても適応可能な重症心不全治療に対する幹細胞移植法は現在存在しない。そこで本研究では従来の開胸手術を必要とする外科的侵襲を伴うアプローチとは異なった低侵襲な移植手法の確立を目指している。今年度は既製の内視鏡システムや鉗子を用いた周辺機器の最適化を行い、心外膜側からの細胞移植デバイス手術のプロトタイプ作成を行った。開発したデバイスを用いて、左心室への心嚢内視鏡下細胞移植が安全に行えることを確認した。

A. 研究目的

適切な既製の内視鏡システムを選択して、心嚢内で運用することで、低侵襲な心嚢内手術を開発する。この技術を確立することで、低心機能症例において、人工心臓や心臓移植に代わる低侵襲ヒト幹細胞移植を可能とすることを旨とする。

B. 研究方法

全身麻酔下の閉胸雑種成犬を用いて、セルディンガー法により心嚢内に内視鏡を挿入して心嚢内の視野を確保する。各種マニピュレータープロトタイプを用いて、心嚢内で細胞移植シミュレーションを行い、器具の最適化を行う。

（倫理面への配慮）

動物実験については当該動物実験指針に準拠して研究を行った。動物実験計画を申請し承認を得ており、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物の使用は目的に合致した最小限にとどめ、苦痛を与えない等の倫理的な配慮を行った。

C. 研究結果

硬性鏡を用いた実験の継続を行った。硬性鏡ガイド下に、細胞移植器具を数種類作製。その使用感および、実効性、そしてその特性を検証した

D. 考察

我々が考案した空気による心嚢腔拡張は、心タンポナーデ等の血行動態の変化をきたす事無く心嚢内視鏡治療が可能であった。今後慢性期まで癒着が少なく、繰返し移植操作が可能な手技の開発が必要となることが予想される。

E. 結論

心嚢内視鏡による細胞移植手技は、硬性鏡、超音波を用いる事で操作性が飛躍的に向上し、血行動態にも大きな影響を及ぼさず安全に移植が可能であった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Photosensitization reaction-induced acute electrophysiological cell response of rat myocardial cells in short loading periods of talaporfin sodium or porfimer sodium. Ito A, Kimura T, Miyoshi S, Ogawa S, Arai T. Photochem Photobiol. 2011 Jan-Feb;87(1): 199-207.

Kimura T, Miyoshi S, Takatsuki S, Tanimoto K, Fukumoto K, Soejima K, Fukuda K. Safety and efficacy of pericardial endoscopy by percutaneous subxyphoid approach in swine heart in vivo. J Thorac Cardiovasc Surg. 2011 Jul ;142(1):181-90. Epub 2010Nov 11.

Numasawa Y, Kimura T, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Tsuji H, Tsuruta H, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A. Treatment of human mesenchymal stem cells with angiotensin receptor blocker improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation and improved cardiac function via angiogenesis. Stem Cells. 2011Sep;29(9): 1405-14. doi: 0.1002/stem.691.

Ito A, Miyoshi S, Kimura T, Takatsuki S, Fukumoto K, Fukuda K, Arai T. Myocardial electrical conduction block induced by photosensitization reaction in exposed porcine hearts in vivo. Lasers Surg Med. 2011 Dec;43(10):984-90. doi:10.1002/lsm.21136.

Epub 2011 Nov 22.

2. 学会発表

木村雄弘、三好俊一郎、岡本一真、福本耕太郎、高月誠司、荒井恒憲、福田恵一、心嚢内視鏡による低侵襲治療の試み、第25回日本心臓血管内視鏡学会、京都大学医学部芝蘭会館（2011/10/8）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

低侵襲・ヒト幹細胞デリバリーシステムによる 重症心不全治療実用化基盤技術の開発

研究分担者 五條理志 東京都健康長寿医療センター 心臓外科 副部長
（現：京都府立医科大学大学院 医学研究科人工臓器・心臓移植再生医学講座 教授）

研究要旨：重症心不全治療において心臓移植が果たしてきた役割は大きいですが、世界的なドナー不足の中、それに代わる治療として幹細胞移植医療に大きな期待が寄せられている。心不全治療を目指した幹細胞研究が進んでいるが、外科的手法による患者への負荷や細胞の生着率の低さなど、臨床へむけての有効な心筋への細胞移植法には課題が多くある。そこで本研究では従来の外科的侵襲を伴うアプローチとは異なり、移植手法の低侵襲化を目指し重症心不全治療の実用化に大きく貢献することを目指している。今年度は細胞移植治療に用いるための細胞ソースとして同種移植として免疫寛容が期待される胎児付属物である胎盤および羊膜由来の細胞に安定培養系を確立するとともに、移植後の細胞生着率および心筋分化誘導率の向上を目指した *in vitro* での評価系を構築した。さらにすでに移植治療に使われている骨髄由来間葉系細胞との比較検討を行った。

A. 研究目的

本研究課題は重症心不全に対するヒト幹細胞移植において、内視鏡下・低侵襲アプローチを応用することによって、移植レシピエントの負荷を低減し安全で効率的な細胞移植システムを構築することを目的とする。この技術を確立することでヒト幹細胞移植が人工心臓や心臓移植に代わる重症心不全治療の切り札となることを目指す。

B. 研究方法

1. ブタ幹細胞調製法の確立

再生医療実現のための前臨床試験としてブタを用いた大動物実験が重要となると考え、ヒトで行われてきた *in vitro* の研究をブタへ移行し *in vivo* での挙動を含めて実験を行える環境を整備した。重症心不全に対する幹細胞移植においては、一定数の細胞を安定的、効率的に樹立しかつ大量に増やす必要がある。そこでブタ胎児付属物由来間葉系細胞について、採取法から樹立に至るまでの培養法について検証を行う。

2. ブタ幹細胞の特性解析

得られた細胞について、増殖能や細胞表面マーカーについて検討し、樹立した細胞の特性を明らかにする。

3. ブタ幹細胞培養法の確立

項目 1.2 の結果を反映した培養法についてブタ胎児付属物由来間葉系細胞を多検体について検証し、一連の培養システムを構築する。

（倫理面への配慮）

本研究では、ヒト由来細胞ならびに実験動物を

用いた研究を行う。ヒト由来組織の採取にあたっては、研究機関（共同研究機関である国立成育医療研究センター）における倫理委員会に研究計画を申請し承認を得ている。また動物実験については当該動物実験指針に準拠して研究を行う。すなわち動物実験計画を申請し承認を得ており、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物の使用は目的に合致した最小限にとどめ、苦痛を与えない等の倫理的な配慮を行う。

C. 研究結果

1. ブタ幹細胞調製法の確立

ブタ胎児付属物である胎盤および羊膜を組織学的に分類して採取し、細胞の樹立を試み、各組織より細胞を安定的に樹立する方法をほぼ確立できた。

2. ブタ幹細胞の特性解析

各組織から得られた細胞の遺伝子発現解析ならびに細胞表面マーカーの解析を行った。各組織由来の細胞は間葉系マーカーの発現が認められ、また遺伝子発現解析の結果も骨髄由来間葉系細胞に近いことが認められた。

3. ブタ幹細胞の培養法の確立

前項までに確立したブタ胎児付属物組織由来幹細胞の培養法について、より多くの検体を用いて検証した結果、一部において細胞の増殖が低いものが認められた。そこで特性解析から得られた情報をもとにし特定の因子を添加することで問題の解決を図り、多くの組織由来幹細胞をほぼ安定的に培養することが可能となった。

D. 考察

ブタ胎児付属物は医療用廃棄物であるため倫理的な規制が低く細胞移植用のソースとして非常に有用であるが、その細胞の安定供給は大きな課題であった。今回安定的に細胞を得られる方法ならびに細胞を維持培養する方法について特性解析に加え、多検体を処理することで臨床に資する培養システムを構築できた。この実験系で免疫寛容の分子機構解明にむけた検討を行うことが可能な大動物実験系を確立できたことは、今後の同種移植の実現化にむけた科学的根拠を示すための大きな突破口になるものと考えられた。今後期待される多能性幹細胞 (ES 細胞, iPS 細胞) を念頭にした移植医療への基盤研究へとつながることも期待できる。

E. 結論

細胞移植システムの構築には、ソースとなる細胞の安定した培養システム、移植細胞の生着率向上、分化誘導効率に関して科学的根拠を示す必要がある。移植細胞の有用性と、それを実際に入れる移植技術の開発は一体となって進めていってはいじめて臨床的に効果的な治療へと結びつく。本研究での内視鏡下・低侵襲アプローチによる移植技術と移植細胞ソースとしての胎児付属物由来細胞の有用性とを結びつけることで、患者負担の少ない心不全治療へとつながる基盤ができたといえる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Gojo S, Toyoda M, Umezawa A. Tissue engineering and cell-based therapy toward integrated strategy with artificial organs. *J Artif Organs*. 14(3), 171-7. , 2011.

Kami D, Takeda S, Makino H, Toyoda M, Itakura Y, Gojo S, Kyo S, Umezawa A, Watanabe M. Efficient transfection method using deacylated polyethylenimine-coated magnetic nanoparticles. *J Artif Organs*. 2011 Sep;14(3):215-22. Epub 2011 May 3

Kami D, Takeda S, Itakura Y, Gojo S, Watanabe M, Toyoda M. Application of magnetic nanoparticles to gene delivery. *Int J Mol Sci*. 2011;12(6):3705-22. Epub 2011 Jun 7.

【心不全治療の新展開-外科医との共働による新たな治療戦略】《トピックス》 心不全に対する再生医療 幹細胞移植・細胞シート:五條理志, 許俊鋭:内科(0022-1961)108巻 1Page107-111(2011.07)

【血管・心筋再生はどこまで来たか】治す 重症心不全に対する再生治療 心臓移植・人工心臓患者に心臓再生医療をどう活かすか:五條理志:Heart View(1342-6591)15巻8号Page854-859(2011.08)

2. 学会発表

Kimura M, Gojo S, Toyoda M, Itakura Y, Miyoshi S, Kyo S, Umezawa A, Ono M. Transplanted allogenic amniotic membrane-derived mesenchymal cells improved left ventricular function in porcine chronic ischemic heart. Joint Meeting of 19th ASCVTS & 21st ATCSA, (2011/5/28, Phuket Thailand)

木村光利、五條理志、豊田雅士、板倉陽子、許俊鋭、梅澤明弘、小野稔:ブタ慢性心筋虚血モデルへの同種ブタ羊膜由来細胞移植。ブタ慢性心筋虚血モデルへの同種ブタ羊膜由来細胞移植、第11回心血管再生先端治療フォーラム(2011/07/02 東京)

板倉陽子、上大介、五條理志、梅澤明弘、豊田雅士:糖鎖プロファイル解析を利用した細胞移植療法に適した組織環境評価。(Evaluation of the stem cell niche for cell transplantation therapy using glycan signature.) 第84回日本生化学会大(2011/09/21-24/京都)

豊田雅士、木村光利、井上-山崎麻由、太田百絵、板倉陽子、上大介、許俊鋭、小野稔、五條理志、梅澤明弘:羊膜細胞を用いた心筋再生医療への取り組み。第15回循環器再生医療研究会(2011/11/19/東京)

上大介、豊田雅士、竹原有史、松原弘明、五條理志:Construction of large amounts culture system by an automated cell processing machine for the cell transplantation. 第9回心血管幹細胞研究会(2012/1/13-14/東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yozu R, Okamoto K, Kudo M, Nonaka H, Adams DH.	New innovative instruments facilitate both direct-vision and endoscopic-assisted mini-mitral valve surgery.	The Journal of thoracic and cardiovascular surgery			2011
根本淳, 四津良平, 山田達也, 又吉徹	心臓手術の実際 外科医が語る術式、麻酔科医が語る心臓麻酔、臨床工学技士が語る体外循環法(第 19 回) 低侵襲心臓外科手術(MICS)における体外循環法	Clinical Engineering	22 (11)	1069 ～ 1077	2011
Ito A., Kimura T., Miyoshi S., Ogawa S., Arai T.	Photosensitization reaction-induced acute electrophysiological cell response of rat myocardial cells in short loading periods of talaporfin sodium or porfimer sodium.	Photochem Photobiol	87 (1)	199 ～ 207	2011
Kimura T., Miyoshi S., Takatsuki S., Tanimoto K., Fukumoto K., Soejima K., Fukuda K.	Safety and efficacy of pericardial endoscopy by percutaneous subxyphoid approach in swine heart in vivo	J Thorac Cardiovasc Surg	142 (1)	181 ～ 190	2010
Numasawa Y, Kimura T, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Tsuji H, Tsuruta H, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A.	Treatment of human mesenchymal stem cells with angiotensin receptor blocker improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation and improved cardiac function via angiogenesis	Stem Cells	29 (9)	1405 ～ 1414	2011
Ito A, Miyoshi S, Kimura T, Takatsuki S, Fukumoto K, Fukuda K, Arai T.	Myocardial electrical conduction block induced by photosensitization reaction in exposed porcine hearts in vivo	Lasers Surg Med	43 (10)	984 ～ 990	2011
Gojo S, Toyoda M, Umezawa A	Tissue engineering and cell-based therapy toward integrated strategy with artificial organs	J Artif Organs	14 (3),	171 ～ 177	2011
Kami D, Takeda S, Makino H, Toyoda M, Itakura Y, Gojo S, Kyo S, Umezawa A, Watanabe M	Efficient transfection method using deacylated polyethylenimine -coated magnetic nanoparticles	J Artif Organs	14 (3)	215 ～ 22	2011
Kami D, Takeda S, Itakura Y, Gojo S, Watanabe M, Toyoda M.	Application of magnetic nanoparticles to gene delivery	Int J Mol Sci	12 (6)	3705 ～ 3722	2011

五條理志, 許俊鋭	心不全治療の新展開-外科医との共働による新たな治療戦略 心不全に対する再生医療 幹細胞移植・細胞シート	内科	108	107 ～ 111	2011
五條理志	【血管・心筋再生はどこまでできたか】 治す 重症心不全に対する再生治療 心臓移植・人工心臓患者に心臓再生医療をどう活かすか	Heart View	15	854 ～ 859	2011

IV. 研究成果の刊行物・別刷

New innovative instruments facilitate both direct-vision and endoscopic-assisted mini-mitral valve surgery

Ryohei Yozu, MD, PhD,^a Kazuma Okamoto, MD, PhD,^a Mikihiro Kudo, MD, PhD,^a Hidenori Nonaka, BE,^b and David H. Adams, MD^c

Objective: The efficacy of new, innovative, original instruments, including a left atrial retractor, silicon annuloplasty ring sizer, modified Cosgrove aortic clamp, and reusable clip for fixing knots of polytetrafluoroethylene (Gore-Tex; WL Gore & Associates, Inc, Flagstaff, Ariz) suture, to allow surgical exposure in an ideal operative setting of mini-mitral valve repair surgery was verified.

Methods: Since 1998, a great deal of innovation has contributed to establishing mitral valve repair via right minithoracotomy as a routine surgical approach for mitral valve insufficiency in 252 cases. During the last 2 years, a newly launched left atrial retractor system attachable to the minithoracotomy spreader has been used. An additional retractor for the posterior wall of the left atrium was attached to the minithoracotomy spreader. The retractor moves flexibly and can be fixed in any favorable position to realize optimal exposure of the mitral valve. A 5 blade size was available depending on the left atrial size and target legion. By using the smallest size, even papillary muscles were exposed easily and clearly. Furthermore, a flexible silicon ring sizer, which could easily pass through a narrow working port without tissue damage, was used for sizing the annuloplasty ring. For the surgical technique, multiple chordal reconstructions by the loop technique with polytetrafluoroethylene (Gore-Tex CV-5 sutures) were applied. A reusable clip for fixing knots made it easy to tie the Gore-Tex suture in the correct position without slipping.

Results: No operative mortality occurred. There were 2 conversions to sternotomy for correction of aortic dissection (1) and for coronary artery bypass grafting (1). There were 2 early reoperations for failure of mitral valve repair. The mean aortic crossclamp time was 163.5 ± 41.6 minutes. Annuloplasty with a ring or band was performed in all cases except one. The loop technique was used in 173 cases. Among them, a combination of the loop technique and resection and suture technique was used in 56 cases.

Conclusions: Newly innovated mini-mitral valve surgical instruments and techniques facilitate both direct-vision and endoscopic-assisted approaches and accomplish a favorable surgical outcome even in the complex pathology of mitral valve insufficiency. (*J Thorac Cardiovasc Surg* 2011; ■:1-4)

Endoscopic-assisted mitral valve surgery via minithoracotomy (mini-mitral surgery) has recently evolved and rapidly spread because it is less invasiveness and has a cosmetic advantage. Although mini-mitral surgery is well known as safe and feasible, and is associated with a high repair rate, a low perioperative morbidity, and an excellent durability of repair,¹⁻³ this technique is still limited to specific surgeons⁴ because special setting, instruments, and surgical training are essential for this technique. However, mini-mitral surgery realizes great surgical exposure of pathologic lesions in the mitral valve, and complex surgical procedures can be performed as in the median-sternotomy approach if the

surgeon knows how to prepare for the ideal operative setting with optimal instruments. In regard to the technical aspect, special training with endoscopic surgical instruments and surgical strategy, which is different from the sternotomy case and arranged for mini-mitral surgery, is necessary to achieve favorable surgical results. The efficacy of new, innovative, original instruments and an operative setting in mini-mitral surgery were verified, including a left atrial retractor, silicon annuloplasty ring sizer, modified Cosgrove aortic clamp, and reusable knot clip to facilitate fixing knots of polytetrafluoroethylene (PTFE) (Gore-Tex; WL Gore & Associates, Inc, Flagstaff, Ariz) suture in an ideal position.

MATERIALS AND METHODS

From 1998 to April 2011, 252 patients underwent mitral valve repair via a right minithoracotomy for treatment of mitral valve regurgitation. Several innovations have contributed to establishing mitral valve repair via right minithoracotomy as a routine surgical approach. The mean age of patients was 51.1 ± 13.9 years, and 36.9% were female. During the last 2 years, a newly launched left atrial retractor system attachable to the minithoracotomy spreader was developed and has been used.

In routine mini-mitral surgery, a right anterolateral minithoracotomy of 6 to 8 cm was made through the fourth intercostal space. In cases with

From the Department of Cardiovascular Surgery,^a Keio University, Tokyo, Japan; UNIMEDIC,^b Tokyo, Japan; and Department of Cardiothoracic Surgery,^c Mount Sinai Medical Center, New York, NY.

Received for publication May 15, 2011; accepted for publication May 26, 2011.

Address for reprints: Kazuma Okamoto, MD, PhD, Department of Cardiovascular Surgery, Keio University, Shinanomachi 35, Shinjuku, Tokyo, 160-8582 Japan (E-mail: kazuma_okamoto@mac.com).

0022-5223/\$36.00

Copyright © 2011 by The American Association for Thoracic Surgery
doi:10.1016/j.jtcvs.2011.05.026