

201106011B

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22～23年度 総合研究報告書

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22～23年度 総合研究報告書

研究代表者 岡本 一真

平成24（2012）年 3月

目 次

I. 総合研究報告		
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		
分担研究報告		
1. 低侵襲細胞デリバリーシステム構築に関する研究	-----	11
四津良平		
2. 低侵襲細胞デリバリーシステム構築に関する研究	-----	14
三好俊一郎		
3. ヒト幹細胞の調整に関する研究	-----	16
五條理志		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	21
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	27

I. 総合研究報告

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、本研究では従来のような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。

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が、一方で、心機能の悪い患者に安全・確実に細胞を届ける手技については研究が進捗していない。

本研究では状態の悪い患者における、心筋への幹細胞移植法システム開発を行い、重症心不全治療への幹細胞移植の導入を近づける試みを行う。

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 ピオグリダゾン活性化骨髄間葉系幹細胞移植（開胸アプローチ）

雑種イヌ骨髄採取後、左側開胸にて心筋梗塞を作製（左前下行枝第一対角枝遠位部）、2週間の間に間葉系幹細胞を培養増殖させる。細胞を移植しないMedium群、骨髄間葉系幹細胞 $3-5 \times 10^7$ 個を移植するMSC群、pioglitazone $1 \mu\text{mol/L}$ を2週間添加して培養したMSC群（pio-MSC）に無作為に振り分けた。2週間後細胞移植直前に心臓超音波検査を施行した後に、開胸し細胞を心筋梗塞部位に注入移植する。移植細胞は移植3日前にAdenoウイルスを用いてEGFP遺伝子を強制発現させた。移植2週間後に、心臓超音波検査、左室内圧測定、心筋梗塞サイズの測定、共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫組織化学的検討を行う。

1.2 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。

1.3 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、セルデイ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 カ所への移植を試みた。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。

1.4 複数回にわたる心嚢内操作の可能性探求

重症心不全に対する幹細胞移植治療では複数回にわたって心嚢に侵入し細胞移植を繰り返す必要があることを想定し、一度心嚢内視鏡下で心嚢内操作を行ったのち、数週間後に再度心嚢内視鏡アプローチで心嚢に安全に再侵入する手法を探求する。

2 ヒト幹細胞調製法の確立

2.1 ヒト間葉系幹細胞培養システムの確立

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。そこでヒト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 ヒト幹細胞の特性解析

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 ブタ幹細胞調製法の確立及び特性解析

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。

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。前項までに得られた結果

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. 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 ピオグリダゾン活性化骨髄間葉系幹細胞移植（開胸アプローチ）

シン普森法で計測した左室駆出率を移植直前と移植 2 週間後の変化量を比較した。左室機能は MSC 移植群ではあまり変化無かったが、pio-MSC 移植群では有意に左室駆出率を改善した。また左室内圧は pio-MSC 移植群で有意に増大していた。心臓を 5mm 厚で切断し、TTC 染色を用いて心筋梗塞領域を明らかにし、Digitizer を用いて心筋梗塞容積を比較した所、MSC 移植群に比して、pio-MSC 移植群では有意に心筋梗塞サイズの低下を認めた。心筋梗塞周辺部では、EGFP 陽性細胞に、alpha actinin 陽性細胞が免疫組織化学的検討で観察され、明瞭な横紋が観察され、心筋への分化も確認された。

1.2 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。

1.3 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行え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. ヒト幹細胞調製法の確立

2.1 ヒト間葉系幹細胞培養システムの確立

ヒト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 ヒト幹細胞の特性解析

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. ブタ幹細胞調製法の確立及び特性解析

ブタ胎児付属物である胎盤および羊膜細胞を安定的に樹立する方法を確立し、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。

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。

胎盤・羊膜は複雑な構造を有しており、各組織を分離採取して細胞の樹立を試みた結果、形態学的・細胞表面特性には大きな違いが認められなかった。一方、細胞の増殖能には違いが認められた。今回の結果からどの部位の細胞が移植に適したソースとなるかについての一定の知見が得られた。今後はより安定的にかつ性状を維持したまま細胞を効率よく増やしていくための培養システムの構築が求められる。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ってはいじめて臨床的に効果的な治療法へと結びつく。

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。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ikegami Y, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Okamoto K, Miyado K, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A. Serum-independent cardiomyogenic transdifferentiation in human endometrium-derived mesenchymal cells. *Artif Organs*. 2010 Apr;34(4):280-8.

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

高橋辰郎、古槻清和、三好俊一郎、岡本一真、石田治、木村雄弘、宗形昌儒、村木浩司、稲川浩平、肥田直子、西山信大、新村大輔、梅澤明弘、四津良平 ピオグリダゾン活性化骨髄間葉系幹細胞移植がイヌ心筋梗塞モデルで心機能を改善する 第63回日本胸部外科学会定期学術集会 (2010/10/24 大阪)

Endoscopic-assisted cardiac surgery via mini-thoracotomy for mitral valve and atrial septal defect in the era of catheter based interventional cardiology Kazuma Okamoto, Mikihiro Kudo, Ryohei Yozu 第75回日本循環器学会総会・学術集会 (2011/3/20 横浜)

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 古槻清和 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 New York)

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, Mikihiro 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, Mikihiro 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 による右小
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

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告

1. 低侵襲細胞デリバリーシステム構築に関する研究

四津 良平

2. 低侵襲細胞デリバリーシステム構築に関する研究

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、低侵襲心臓外科手術の最先端技術を獲得し、これらの技術の転用の可能性を探る。具体的には、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

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有用な知見を得た。

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心臓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ことがわかった。しかしながら、重症心不全における幹細胞移植治療は左心室が主なターゲットとなることが多く、従来、低侵襲心臓弁膜症手術において用いられてきた右側方小開胸によるものでは左心室への到達が困難であることも立証された。これらをふまえて、左側方小開胸による心臓への到達法および拍動する心臓を安定化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心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

Hirofumi Kasahara, Mikihiro Kudo, Hiroyuki Kawajiri, Ryohei Yozu Repair of traumatic tricuspid insufficiency via minimally invasive port access(194-196) General Thoracic and

Cardiovascular Surgery Vol.58. Number 4, 2010

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 卷 11 号
Page1069-1077(2011.10)

2. 学会発表

四津良平 工藤樹彦 Mini Mitral valve plasty-ポータアクセス法による僧帽弁形成術(MICS) 第110回日本外科学会定期学術集会(2010/4/8 名古屋)

工藤樹彦 四津良平 古梶清和 笠原啓史 石田治 根本 淳 小谷聡秀 福原進一 心臓手術に対するさらなる低侵襲化手術の試み-Port-Access MICS 460 症例の経験より- 第35回日本外科系連合学会学術集会(2010/6/18 舞浜)

Ryohei Yozu My way to seek Art and Science in Cardiac Surgery The 24th Annual Kalyanakit Kitiyakara Lecture (2010/9/21, Bangkok, Thailand)

四津良平 心臓外科における低侵襲手術 第10回横浜低侵襲手術研究会(2010/9/30 横浜)

四津良平 Techno-College : Minimally invasive Mitral valve surgery on a Routine basis 第63回日本胸部外科学会定期学術集会(2010/10/23 大阪)

高橋辰郎、古梶清和、三好俊一郎、岡本一真、石田治、木村雄弘、宗形昌儒、村木浩司、稲川浩平、肥田直子、西山信大、新村大輔、梅澤明弘、四津良平 ピオグリダゾン活性化骨髄間葉系幹細胞移植がイヌ心筋梗塞モデルで心機能を改善する 第63回日本胸部外科学会定期学術集会(2010/10/24 大阪)

Ryohei Yozu. Minimally invasive mitral valve surgery on a routine basis The 20th Annual Congress of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia(October 30, 2010, Beijing, China)

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 山辺健太朗 河尻拓之 小谷聡秀 僧帽弁形成術におけるMICS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 山辺健太朗 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 Mi tral 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 山邊健太朗 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 ENDSOPICASSISTED MINI-THORACOTOMY APPROACH Kazuma Okamoto, Mikihiko 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, Mikihiko 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 健太朗 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)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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：重症心不全治療に対する幹細胞移植において有効な細胞移植を阻むのは心機能が悪い患者に対する侵襲度の低い細胞移植法が存在しないという事実である。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ている。今年度は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及びマニピュレータを含めた周辺機器の最適化を行い、主に心外膜側からの細胞移植デバイスツールの開発を行った。

A. 研究目的

既製の内視鏡システムを心嚢内で運用することで、低侵襲で心嚢内手術（特に細胞移植）に最適化したマニピュレータを開発する。この技術を確認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侵襲度の低い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

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

従来内視鏡には血行動態への影響の少ない軟性鏡が用いられていたが、細胞移植を行うには操作性が悪いため、硬性鏡仕様内視鏡による実験を行った。その結果、操作性視認性が飛躍的に向上し、懸念された血行動態への影響も軽微であった。また体位変換を行い、硬性鏡を左房後壁側まで到達させる事に成功した。細胞移植器具プロトタイプを作製し、細胞や、ビーズを移植し、低侵襲に安定して細胞移植プロセスが可能な事を確認した。心筋内に確実に移植が行えていることを超音波、病理組織から確認し、合併症がないことも確認した。さらに、再移植を念頭に、複数回の心嚢内手

術の可能性に向けて、癒着の評価、癒着解除の方法についても検討し、適切な細胞移植プロトコルの大枠を構築できた。

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

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。また移植器具に関しては、同軸移植器具。エコーガイド下移植器具が、比較的狭いスペースでの作業に適しており、広い、左室前面や側面の比較的広いスペースでは、穿刺を2本行い、別個のルートから挿入した細胞移植デバイスの使用感が良好であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Serum-independent cardiomyogenic transdifferentiation in human endometrium-derived mesenchymal cells. Ikegami Y, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Okamoto K, Miyado K, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A. *Artif Organs*. 2010 Apr;34(4):280-8.

Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. Tsuji

H, Miyoshi S, Ikegami Y, Hida N, Asada H, Togashi I, Suzuki J, Satake M, Nakamizo H, Tanaka M, Mori T, Segawa K, Nishiyama N, Inoue J, Makino H, Miyado K, Ogawa S, Yoshimura Y, Umezawa A. *Circ Res.* 2010 May 28;106(10):1613-23.

Pretreatment of Human Mesenchymal Stem Cells with Pioglitazone Improved Efficiency of Cardiomyogenic Transdifferentiation and Improved Cardiac Function. Shinmura D, Togashi I, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Tsuji H, Tsuruta H, Nakamizo H, Segawa K, Tsukada Y, Ogawa S, Umezawa A. *Stem Cells.* 2010 Dec 9. [Epub ahead of print]

Dystrophin conferral using human endothelium expressing HLA-E in the non-immunosuppressive murine model of Duchenne muscular dystrophy. Cui CH, Miyoshi S, Tsuji H, Makino H, Kanzaki S, Kami D, Terai M, Suzuki H, Umezawa A. *Hum Mol Genet.* 2011 Jan 15;20(2):235-44. Epub 2010 Oct 14.

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 2010 Nov 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.* 2011 Sep;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

高橋辰郎、古梶清和、三好俊一郎、岡本一真、石田治、木村雄弘、宗形昌儒、村木浩司、稲川浩平、肥田直子、西山信大、新村大輔、梅澤明弘、四津良平 ピオグリダゾン活性化骨髄間葉系幹細胞移植がイヌ心筋梗塞モデルで心機能を改善する 第63回日本胸部外科学会定期学術集会 (2010/10/24 大阪)

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)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
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：大きな期待が寄せられている重症心不全治療における幹細胞研究であるが、外科的手法による患者への負荷や細胞の生着率や分化誘導率の低さなど、臨床へむけた有効な心筋への細胞移植法には課題が多く残されている。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。さらに細胞移植治療に用いる有効な細胞ソースを見出し、その特性を明らかにする事で、細胞移植医療による心機能改善をはかることへの期待に応える事になる。本研究課題では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をそのソースとして注目し、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評価する *in vitro* での実験系を構築した。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. ヒト幹細胞調製法の確立

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。そこでヒト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った。

2. ヒト幹細胞の特性解析

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した。

3. 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。

4. 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。

5. ブタ幹細胞培養法の確立

前項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

ヒト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

ヒト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。

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。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システムが構築出来たのは有意義なことである。

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。

F. 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.

上大介、五條理志、梅澤明弘：心筋再生医療の現状 -細胞移植療法を用いた再生医療-. *Heart view* 14 (6):116-120, 2010.

五條理志、許俊鋭：(シリーズ) 再生医学のいま-基礎研究から臨床への展開に向けて- 44- 細胞移植：心臓病における臨床応用への潮流。治療, 92(12): 2793-2799, 2010

五條理志、豊田雅士、梅澤明弘：組織工学と再生医療、人工臓器 39(3), 202-207, 2010

五條理志、上大介：(特集) 臨床工学技士が知っておきたい人工臓器と再生医療の展望：心臓における再生医療, *Clinical Engineering*, 22(1): 9-14, 2011.

【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

五條理志：再生医療における臨床研究の現状と今後の課題. 第 14 回日本心筋・血管新生療法研究会 (2010/7/29/大阪)

五條理志、上大介、豊田雅士、板倉陽子、許俊鋭、梅澤明弘：ヒト iPS 細胞株間における遺伝子発現解析と心筋分化誘導. 第 58 回日本心臓病学会学術集会 (2010/9/17-19/東京)

木村光利、五條理志、豊田雅士、板倉陽子、許俊鋭、三好俊一郎、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、第 10 回再生心臓血管外科治療研究会 (2011/2/23/千

葉)

なし

木村光利、五條理志、豊田雅士、板倉陽子、許俊鋭、西村隆、川島大、梅澤明弘、小野稔：ブタ慢性心筋虚血モデルにおける同種ブタ羊膜由来細胞移植、第10回日本再生医療学会総会（2011/3.1-2/東京）

上大介、板倉陽子、豊田雅士、梅澤明弘、五條理志：ラット右心耳由来細胞の細胞移植療法に向けた特性解析、第10回日本再生医療学会総会（2011/3.1-2/東京）

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）

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

II. 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
Ikegami Y, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Okamoto K, Miyado K, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A.	Serum-independent cardiomyogenic transdifferentiation in human endometrium-derived mesenchymal cells.	Artif Organs	34 (4)	280 ～ 288	2010
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
Kasahara H., Kudo M., Kawajiri H., Yozu R.	Repair of traumatic tricuspid insufficiency via minimally invasive port access	Gen Thorac Cardiovasc Surg	58 (4)	194 ～ 196	2010
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
Tsuji H., Miyoshi S., Ikegami Y., Hida N., Asada H., Togashi I., Suzuki J., Satake M., Nakamizo H., Tanaka M., Mori T., Segawa K., Nishiyama N., Inoue J., Makino H., Miyado K., Ogawa S., Yoshimura Y., Umezawa A.	Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes.	Circ Res	106 (10)	1613 ～ 1623	2010
Shinmura D., Togashi I., Miyoshi S., Nishiyama N., Hida N., Tsuji H., Tsuruta H., Nakamizo H., Segawa K., Tsukada Y., Ogawa S., Umezawa A.	Pretreatment of Human Mesenchymal Stem Cells with Pioglitazone Improved Efficiency of Cardiomyogenic Transdifferentiation and Improved Cardiac Function	Stem Cells	29	357 ～ 366	2010
Cui CH., Miyoshi S., Tsuji H., Makino H., Kanzaki S., Kami D., Terai M., Suzuki H., Umezawa A.	Dystrophin conferral using human endothelium expressing HLA-E in the non-immunosuppressive murine model of Duchenne muscular dystrophy.	Hum Mol Genet	20 (2)	235 ～ 244	2010