

201219002B

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22～24年度 総合研究報告書

研究代表者 王 英正

平成25(2013)年5月

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～24年度 総合研究報告書

研究代表者 王 英正

平成25(2013)年 5月

# 目 次

## I. 総合研究報告

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

(資料) 小児心不全への心臓内幹細胞自家移植療法の第1相臨床試験

(資料) 小児心不全由来の疾患特異的 i P S 細胞の樹立と機能解析

(資料) 直接リプログラミング法による人工心筋細胞の作製

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 38

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 57



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  
(総合) 研究報告書

小児心不全への心臓内幹細胞自家移植療法の第1相臨床試験に関する研究

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。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、慢性的なドナー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。本研究では、末期小児心不全に対する心臓内幹細胞を用いた自家細胞移植療法の臨床研究の実施することを目的とする。

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

A. 研究目的

本邦における小児重度心不全に対する医療背景として、小児の海外渡航による心臓移植医療に大きく依存し、それに関わる費用は1億円を超えている。また、心臓移植を必要とする治療抵抗性の心不全の予後は、一年生存率が50%以下と不良であり、心不全治療に関連する入院費や薬物治療費は国民医療費の約20%以上を占める。このような社会背景のもと、心筋再生医療が実用化され、重

篤な心不全を改善させることができれば、心臓移植適応となる小児症例を減少させ、切実な臓器提供者不足の問題を解消し、国民医療費においても大きな国家財政の負担軽減となる。

心臓内自己幹細胞を用いた細胞治療法は、心不全の予防から健康寿命の延伸に寄与する画期的な医療技術である。2009年に米国より実施開始された虚血性心不全患者を対象とした心臓内自己幹細胞の冠動脈内注入法による第I相臨床試験 (SCIPPIO試験及びCADUCEUS試験) により、安全性をはじめとして、細胞治療による梗塞サイズの縮小と局所壁運動の改善効果が示唆されているが(*Lancet* 378:1847; 2011, *Lancet* 379: 895;2012)、小児心不全への治療効果は不明である。

申請者らは、これまでにマウス及びヒト心臓内における心臓内幹細胞の存在と大型動物での細胞移植効果について報告してきた (*Proc Natl Ac*

*ad Sci U S A.* 2003;100:12313, *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:1858)。

また、申請者らが報告した小児心臓における自己幹細胞の存在量と増殖能力が成人症例より高いという結果から、本細胞移植技術の小児心不全への臨床的有用性は十分に期待できる (*Biochem Biophys Res Commun* 352:635; 2007)。さらに、先天性心疾患患者からのiPS細胞の樹立に関する報告も皆無であることから、本研究内容は極めて独創的で、最先端の開発研究といえる。

本研究では患者本人の心臓内幹細胞を用いた心筋再生医療として、小児心不全を対象とする第I相臨床試験 (TICAP試験) の実施により、本治療法の安全性を検証し、将来の標準治療化に向けた基盤技術の確立を目指す。

本臨床研究の推進により、再生医療技術の社会還元及び国民の健康増進に対して着実に寄与できると考える。

## B. 研究方法

### 1. 右心負荷モデルへの細胞治療の前臨床試験

第1相臨床試験の成果検証とともに、有効性試験への準備を行う。第2相臨床試験においては、冠動脈内に注入する自己幹細胞数を決定することが重要である。このため、中型動物であるラットモデルを用いて、以下のような前臨床試験を行った。

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。自家細胞移植に必要な細胞数として、30万個/kgと60万個/kgの2つの細胞数を2群に分けて注入し、無移植群に比べ心機能の改善度を検証し、移植に必要な最小細胞数を決定する。

### 2. 小児心不全への心臓内幹細胞自家移植療法

世界初となる小児心不全への細胞治療法の第1相臨床試験は、平成23年1月に「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」に則り、厚生科学審議会にて実施承認後、同年3月より岡山大学病院で2年間かけて合計7症例に対し細胞移植の登録実施を行う。

対象は0から6歳までの機能的単心室性の心不全症例とし、目標症例数は7例とする。通常の外科的修復術時に右心耳または右流出路から心臓組織 (100mgから250mg) を採取し、自家心臓幹細胞株を樹立する。約2-3週間で移植に必要な細胞数 ( $3 \times 10^5$ /kg) まで幹細胞を増殖させ、心臓手術後評価のための心臓カテーテル検査時に、冠動脈内に直接注入することで移植する。細胞移植後1年まで追跡調査し、安全性の評価を行う。

プロトコルの主要エンドポイントに従い、心不全、致死性不整脈、蛋白漏出性腸症、感染症、造腫瘍作用などを含む重篤な有害事象の発生有無に最大限の注意と経過観察を行う。

治療法の安全性と有効性を確認するために、第3例が術後6ヶ月経過した段階で、独立モニタリング委員会において、心不全の悪化、致死性不整脈、血圧低下、心拍数の低下などの有害事象の発生等を評価し、臨床研究の続行に問題がないかを審議する。

有効性の評価項目は術後3ヶ月、1年目における心不全の臨床症状、BNP値ならびに心エコー法、心MRI、心室造影による心駆出率の改善度とし、また、心臓カテーテル検査による心室拡張末期圧、肺動脈圧、肺動脈圧格差、肺血管抵抗値を計測し、標準治療群の7症例と比較検証する。

### 3. 第2相臨床試験のプロトコル作成と承認申請

第1相臨床試験の安全性確認を踏まえ、有効性検証目的となる第2相臨床試験では、第1相臨床試

験の成果を踏まえ、細胞治療の有効性を検出しようする必要最小限の症例数を算出する必要がある。7対7症例の第1相臨床試験において得られた細胞移植後の心機能改善度を解析し、同群間のみならず異群間での心機能改善度を統計学的に有意に検出できる実施症例数を算出する。

作成した第2相臨床試験プロトコルは学内の倫理委員会での審議承認を経て、厚生科学審議会に提出し、承認申請を行う。第2相臨床試験はより科学的な有効性の判定を行うため、試験設計は無作為割り付けによる比較対照試験とする。また、有害事象に関するデータモニタリングを実施するため、eClinical/Electronic Data Capture (EDC) による登録症例の適応基準の判定、コンピューターによる無作為の群別割り付けや細胞治療前後の臨床経過の追跡を行う内容にする。

(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)に従って行い、“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. 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。
3. 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。
4. 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。ヒト心臓内幹細胞は、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成22年告示第380号)を遵守して、岡山大学病院内に整備したGMP基準の細胞調節施設内で精製する。

5. 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。
6. 有害事象発生時には、試験責任/分担医師は「重篤な有害事象発生時対応マニュアル」に沿って対応し、一次、二次と最終報告を行う。

## 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を用いて検証した。30匹のラットを2群に分け、18ゲージの針を用いて、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3～5%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. 実施終了の第1相臨床試験のデータ解析(安全性検証)

平成23年度から平成24年度にかけて移植実施した全7症例の安全性検証について、移植直後から1年間にかけて長期にわたって観察し各種評価法により定量化した。移植後急性期より、冠動脈内注入法による細胞移植で虚血や不整脈の惹起を認めず、移植後1年間を通じて、死亡、心不全発症や感染症の併発などの事象は起こらなかった。もっとも重要なこととして、細胞移植した全7症例において、移植した心臓部位を含め腫瘍形成作用を認められなかった。

## 3. 第1相臨床試験の有効性検証

本臨床研究では、7症例の細胞移植群と7症例の標準治療群(非細胞移植群)の比較試験を行い、心臓内幹細胞自家移植の有効性について検証した。細胞移植後1週間前後にて、全7症例とも軽快退院となり、3か月目および1年目での心機能評価を各種パラメーターを用いて解析した。

細胞治療の有効性について、細胞移植後3か月目より1年目にかけて、心エコー、心臓カテーテル、心臓MRI検査によって評価し、心室駆出率

と心係数の継続的改善を示した。興味深いことに、細胞治療群は移植後心収縮能のみならず、拡張能の改善ならびに三尖弁の弁輪径の縮小を認めた。

## D. 考察

本第1相臨床試験で実施した全7症例において冠動脈内注入法による細胞治療法の安全性を確認した。治療有効性に関しては、今後34人から構成される無作為割り付けした第2相臨床試験において平成25年度より検証していく。

## E. 結論

左心低形成症候群7症例を対象に、小児心不全における心臓内自己幹細胞を用いた冠動脈内注入による移植法の安全性を確認した。体重が3キロ以上で、年齢が生後6か月以降なら、カテーテル操作を伴う冠動脈造影や細胞注入は技術的に充分実施可能でかつ安全である。具体的には、細胞移植後1年目までの観察期間において、細胞注入による急性心筋虚血、催不整脈作用はなく、心不全や死亡事例も生じなかった。長期的観察期間における細胞起因性の腫瘍形成や感染症の発症も認めなかった。

また、細胞治療群の7症例は非細胞治療群の7症例に比し、心室収縮能および拡張能の改善を有意に認め、移植後1年目まで継続したこれらの有効性を示唆する所見は、今後合計34人まで症例数を増やしたランダム化対照比較試験を登録実施することによって注意深く検証していく予定である。

## F. 研究発表

### 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).
3. Rodriguez G, Ueyama T, Ogata T, Czernuszewicz G, Tan Y, Dorn GW 2nd, Bogaev R, Amano K, Oh H, Matsubara H, Willerson JT, Marian AJ. Molecular genetic and functional characterization implicate muscle-restricted coiled-coil gene (MURC) as a causal gene for familial dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011;4(4):349-58.
4. 樽井 俊、佐野俊二、王 英正 小児心不全への細胞治療 *Medical Science Digest 特集*;37:439-442 (2011)
5. 王 英正 小児心不全への細胞治療の現状と展望 *呼吸と循環* 60:S14-S16 (2012)
6. 王 英正 テロメア生物学から心筋再生医療の実用化へ *岡山医学会雑誌* 124:27-34(2012)
7. 小林純子、佐野俊二、王 英正 先天性心疾患に対する心筋再生医療 *循環器内科* 71(4):360-368 科学評論社 (2012)

#### 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)
4. 王 英正 小児心不全への細胞治療の現状と展望 重症心不全治療フォーラム 岡山 2011.10.22
5. 王 英正 心不全の心筋再生医療 岡二会 岡山 2012.1.28
6. Oh H. Cardiac progenitor-based therapy and reprogramming in patients with congenital heart disease, *Cardiac Development Symposium*, Munich (2012.3)
7. Direct induction of human cardiac progenitor cells to functional cardiomyocytes by defined factors. Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, Oh H. *American Heart Association Suppl.* (2011).
8. Insulin-like growth factor-2 receptor controls human cardiac progenitor proliferation and differentiation in children with congenital heart malformation. Yoshida M, Kobayashi, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H. *American Heart Association Suppl.* (2011).
9. Direct reprogramming of human cardiac progenitor cells towards functional cardiomyocytes. Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S,



- Sano S, Oh H. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. Suppl. p213 (2011).
10. Generation and functional analysis of induced pluripotent stem cells in patients with congenital heart disease. Kobayashi J, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, Oh H. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. Suppl. p172 (2011).
  11. Heterokaryon-based reprogramming of human cardiac progenitor cells into functional cardiomyocytes. Hirata M, Kobayashi J, Tarui S, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, Oh H. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. Suppl. p352 (2011).
  12. Mechanical stretch promotes reprogramming of human cardiac progenitors into functional cardiomyocytes by defined factors. Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Yoshida M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H 第75回日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal*
  13. Reprogramming of human cardiac progenitors into pluripotency in patients with congenital heart disease. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H 第75回日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal*
  14. 王 英正 心不全の心筋再生医療 岡二会 岡山 (2012.1.28)
  15. 王 英正 小児心不全と細胞治療 先天性心疾患シンポジウム 岡山 (2012.5.27)
  16. 王 英正 左心低形成症候群に対する心臓内幹細胞自家移植療法 第7回 岡山心移植心不全研究会 岡山 (2012.9.4)
  17. 王 英正 第15回遺伝子治療推進産学懇話会 小児心不全への再生医療の可能性 京都大学東京オフィス (2012.9.25)
  18. 王 英正 Mending and Modeling the Congenital Heart Diseases by Patient-Specific Cardiac Progenitors 東京女子医科大学 第3回最先端研究開発支援プログラム(FIRST)セミナー 東京 (2012.10.05)
  19. 王 英正 重度心臓病に対する心筋再生医療 オープンフォーラム 2012 岡山 (2012.10.27)
  20. 王 英正 心筋再生医療の臨床試験と研究 開発状況 技術情報協会セミナー 東京 (2012.11.20)
  21. 王 英正 疾患特異的幹細胞およびiPS細胞を駆使した希少小児心疾患に対する細胞治療と病態解明 消化器研究セミナー 岡山大学 (2013.1.10)
  22. 王 英正 橋渡し研究加速推進ネットワーク シンポジウム 小児心不全に対する細胞治療の中間報告と疾患特異的iPS細胞の樹立による次世代心臓再生法の開発 岡山 (2012.7.7)
  23. 王 英正 岡山心臓血管外科カンファレンス 小児心不全への細胞治療法の可能性 岡山 (2012.7.21)
  24. Oh H. Mending and Modeling the Congenital Heart Diseases by Patient-Specific Cardiac Progenitors. Symposium at Texas Heart Institute (2012.11.4)
  25. Oh H, Tarui S, Ohtsuki S, Sano S. Cardiac progenitor cell infusion in patients with hypoplastic left heart syndrome: a

- prospective phase 1 clinical trial. Japanese Heart Failure Society (2012,12.2)
26. Oh H. iPS 細胞を用いた心疾患の新たな診断法と治療開発 岡山大学サイエンスカフェ (2013.2.8)
  27. 王 英正 希少難治性心不全に対するヒト幹細胞移植療法の長期的エビデンス 第 12 回 日本再生医療学会 (2013.3.21)
  28. Oh H. Cardiac progenitor-based therapy and reprogramming in patients with congenital heart disease, *Cardiac Development Symposium*, Munich (2012.3)
  29. Patient-specific induced pluripotent stem cells from cardiac progenitors recapitulate the models for cardiac chamber disorder. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, Oh H *International Society of Stem Cell Research* (2012)
  30. Mechanical stretch modulates calcium handling during direct cardiac reprogramming of resident progenitor cells in human heart. Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Yoshida M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H *International Society of Stem Cell Research* (2012)
  31. Transition of cardiogenic to angiogenic potential of human cardiac progenitor cells occurs with age. Yoshida M, Tarui M, Kobayashi J, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H. *International Society of Stem Cell Research* (2012)
  32. Mechanical stretch modulates calcium handling during direct cardiac reprogramming of resident progenitor cells in human heart. Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Yoshida M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H *European Society of Cardiology* (2012)
  33. Patient-specific induced pluripotent stem cells from cardiac progenitors recapitulate the models for cardiac chamber disorder. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, Oh H *European Society of Cardiology* (2012)
  34. Hedgehog interacting protein controls age-dependent angiogenic activity in human cardiac progenitor cells through insulin-like growth factor-1 receptor signaling Yoshida M, Kobayashi, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H. *American Heart Association Suppl.* (2012).
  35. Patient-specific induced pluripotent stem cells for modeling hypoplastic left heart syndrome. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, Oh H *American Heart Association Suppl.* (2012).
  36. Factors-based human cardiomyocytes differentiation exhibits defective maturation and excitation through aberrant calcium handling proteins. Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Yoshida M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H *American Heart Association Suppl.* (2012).
  37. Mechanical stretch promotes

- reprogramming of human cardiac progenitors into functional cardiomyocytes by defined factors. Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Yoshida M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H 第76回日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal* (2012)
38. Reprogramming of human cardiac progenitors into pluripotency in patients with congenital heart disease. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H 第76回日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal* (2012)
39. 先天性心疾患患者由来の心臓内幹細胞を用いた疾患特異的ヒトiPS細胞の樹立と機能解析. 小林純子, 樽井俊, 平田昌敬, 川畑拓也, 黒子洋介, 立石篤史, 吉積功, 新井禎彦, 笠原真悟, 佐野俊二, 王英正 小児循環器学会 (2012)
40. Heterokaryon-based reprogramming of human cardiac progenitor cells into functional cardiomyocytes. Hirata M, Kobayashi J, Tarui S, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, Oh H. 小児循環器学会 (2012)
41. 疾患特異的ヒトiPS細胞を用いた左心低形成症候群の実験モデル化と病態解析 小林純子, 樽井俊, 平田昌敬, 川畑拓也, 黒子洋介, 立石篤史, 吉積功, 新井禎彦, 笠原真悟, 佐野俊二, 王英正 日本胸部外科学会 *Gen Thorac Cardiovasc Surg. Suppl.* 439 (2012)
42. 人工ヒト心筋細胞の成熟化におけるカルシウムイオンポンプの重要な役割 樽井俊, 小林純子, 平田昌敬, 高橋賢, 入部玄太郎, 成瀬恵治, 笠原真悟, 佐野俊二, 王英正 日本胸部外科学会 *Gen Thorac Cardiovasc Surg. Suppl.* 440 (2012)
43. Aberrant calcium handling inhibits functional maturation and excitation in factors-based human cardiomyocytes differentiation. Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Yoshida M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H 日本心不全学会 YIA (2012).
44. 先天性心疾患の疾患特異的iPS細胞の樹立と左心低形成症候群の心臓発生異常の解明 小林純子, 樽井俊, 平田昌敬, 川畑拓也, 黒子洋介, 立石篤史, 吉積功, 新井禎彦, 笠原真悟, 佐野俊二, 王英正 日本心臓血管外科学会 (2013)
45. Modeling and dissecting hypoplastic left heart syndrome by patient-specific induced pluripotent stem cells Kobayashi J, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, Oh H. 第77回日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal* (2013)
46. Engineering human bioartificial heart with three-dimensional extracellular matrix materials. Hirata M, Kobayashi J, Tarui S, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, Oh H. 第77回日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal* (2013)
47. Heterokaryon-based reprogramming of human cardiac progenitor cells into functional cardiomyocytes. Hirata M, Kobayashi J, Tarui S, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, Oh H. 日本心臓血管外科学会 (2013)
48. ハーフクリップ法によるラット右心圧負荷モ

デルの作製 Okuyama M, Hirata M, Kobayashi J, Tarui S, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, Oh H. 日本心臓血管外科学会 (2013)

49. 疾患特異的 iPS 細胞の樹立と左心低形成症候群の心臓発生異常の解明 小林純子, 樽井 俊, 平田昌敬, 川畑拓也, 黒子洋介, 立石篤史, 吉積 功, 新井禎彦, 笠原真悟, 佐野俊二, 王 英正 日本外科学会 Young Researcher Award (2013)

G. 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  
 不育疾患克服等次世代育成基盤研究事業  
 (総合) 研究報告書

小児心不全由来の疾患特異的 i P S 細胞の樹立と機能解析

研究代表者 王 英正 岡山大学病院教授

研究要旨

左心低形成症候群は先天性心疾患による心不全死の約25~40%を占めるとされており、心臓移植以外に根治的な治療法はない。国内では乳幼児への心臓移植の実施例がまだなく、姑息的心臓手術後の10年生存率は約60%程度で、長期予後を予測する診断法は確立されていない。臨床的に術後成績を規定する要素として、房室弁逆流や蛋白漏出性腸症の併発があるが、遅発性のため術後早期における予測は困難である。本研究によって、疾患特異的iPS細胞を樹立することにより、病態発症前に初期化し培養細胞系において、経時的に房室弁や心臓の四腔形成に重要な各種転写因子を網羅的に解析することで、術後の遅発性心臓合併症を予測できる。

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

限界がある。このため、標準外科的治療後の中長期における生命予後を予測する方法を開発することは、治療戦略上、心臓移植適応候補者を選定する面からも重要な研究課題である。

A. 研究目的

単心室循環を示す左心低形成症候群は1万人に1人の頻度で年間約1,000人が出生し、米国では小児心臓移植適応例の約半数が本疾患に属するように極めて予後が不良の希少難治性心疾患である。一方、乳幼児における心臓移植の実績がない我が国では、生後直後より3期にわたる心臓手術が唯一の治療法であり、5年生存率は約60%と

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。

また、左心低形成症候群の初期予後規定因子として、染色体異常を伴う内臓心房錯位をはじめ、僧帽弁狭窄症と大動脈弁閉鎖合併例が報告されているが、中長期に発症する房室弁逆流や蛋白漏出性腸症合併例の予後も不良で、術後に予知するすべがなく、その分子機構は明らかにされていない。

臨床的には、心臓手術を受けた左心低形成症候群の予後経過は年単位での評価が必要で、臨床症状出現時には多くの症例において、既に心不全病態は完成しており、再手術や心臓移植の適応となることが多い。本研究により心臓手術を受けた時に採取した余剰組織を用いて、疾患特異的 iPS 細胞を樹立することにより、希少で原因不明であり根治的治療法が未確立な小児重症心疾患に対して、手術後 3 か月以内に予後予測が可能となり、長期入院による患者さん本人とご家族の負担を軽減させることができる。

本研究では、心臓手術中に入手した余剰組織を用いて心臓内幹細胞を精製し、レトロウイルスベクターを用いて、Oct4, Klf4, Sox2, c-mycを直接遺伝子導入することで疾患特異的ヒトiPS細胞を樹立する。樹立した各種先天性心疾患由来のiPS細胞を心筋細胞に直接系統誘導する各段階において、経時的に遺伝子発現様式を調べることで、疾患発症にかかわる規定因子群を同定する。

さらに単心室系の循環動態をもつヒトiPS細胞より分化させたヒト心筋細胞と心室切除後において極めて高い自己再生能をもつzebrafish心の自己再生プログラムと比較検討することで、次世代心筋再生医療法につながる新たなヒト心筋細胞誘導因子群を同定する。

本研究の推進により、希少で原因不明であり、根治的治療法が未確立な小児重症心疾患に対して、心臓手術後の予後調査研究と iPS 細胞を用いた疾患病態の研究成果を融合させ、新しい医療法の確立、普及を図るとともに、長期にわたる患者さん本人とご家族の生活面での支障を取り除き、医療費の負担軽減を図る。

## B. 研究方法

### 1. 心臓手術時の余剰組織採取と心臓内幹細胞の初期化

各種先天性心疾患の心臓手術に際し、患者さんのご両親より余剰組織の採取に関する同意書を得る。採取組織量としては100-250mgの心臓組織を右心房より採取後培養に用いる。約10日から2週間の細胞培養で、患者特異的心臓内幹細胞の純化精製と大量培養を行う。

しかしながら、すでに病態発症している組織細胞では、ヒト心臓発生初期における転写因子群の異常について大部分において集約することは可能であるが、臨床上孤発性疾患が多い左心低形成症候群に対しては、前駆細胞を用いた解析法により個々の疾患における起因遺伝子を同定することは困難である。

一方、iPS細胞作製技術は、既に疾患を発症した患者の体組織細胞を初期化することで、疾患発症前に遺伝子情報をリセットでき、かつ継時的に疾患発症にかかわる遺伝子発現異常を網羅することができる。

レトロウイルスベクターを用いて、胚性幹(ES)細胞に初期化する転写因子群であるOct4, Klf4, Sox2, c-mycを細胞内に導入し、約3週間の培養でES様コロニーを得る。形成されたES細胞コロニーを機械的に採取し、継代培養することで真のヒ

トiPS細胞をクローン化する。

樹立したヒト iPS 細胞に対して、免疫組織染色、アルカリフォスファターゼ染色、DNA メチル化解析、網羅的遺伝子発現解析を行った。また、疾患特異的 iPS 細胞を NOD/SCID マウスの精巢に移植し、奇形腫形成を確認する。さらに、樹立した疾患特異的ヒト iPS 細胞に心筋分化誘導を行い、免疫組織染色で確認後、各種転写因子群の推移をリアルタイム RT-PCR 用いて解析する。

本研究では、複数株以上の左心低形成症候群由来の iPS 細胞を樹立し、流入路や流出路閉鎖を伴う重篤性が高い本疾患の心臓発生異常に関わる分子制御機序について網羅的に解明する。

(倫理面への配慮)

1. ヒト心臓組織の採取は、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。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、患者さんの同意のもと不要となった余剰組織を研究開発に使用する。
2. 遺伝子組み換え実験(承認 9068 号)やレトロ及びレンチウイルスの感染は P2 レベルの実験室で行い、移植された動物は隔離した遺伝子操作動物管理施設にて飼育を行う。
3. 動物実験計画書(承認 389 号)に従い、動物施設への実験動物の導入に当たっては、必要に応じて適切な検疫、隔離飼育等を行うことにより、実験実施者、飼養者及び他の実験動物の健康を損ねることのないように講じる。
4. 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。

5. 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. 各種先天性心疾患由来のiPS細胞の樹立

開心手術時に採取した心臓組織から心臓内幹細胞を精製純化し、疾患特異的iPS細胞の樹立に用いた。樹立した疾患特異的iPS細胞はES細胞に特異的な未分化転写因子群であるNanog、Oct4、TRA-1-60、TRA-1-81、SSEA-3/4を発現し、アルカリフォスファターゼ染色陽性であった。

また、胚性幹細胞特異的転写因子であるOct4やNanogのプロモーター領域におけるDNAメチル化について検討したところ、樹立したiPS細胞は初期化前に比べ有意に脱メチル化が観察された。マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析においても、初期化されたiPS細胞においてOct4とNanogの遺伝子発現が約1,000倍発現上昇していた。

### 2. 左心低形成症候群由来のiPS細胞の機能解析による複雑心奇形の病態解明

左心低形成症候群と二心室心疾患である肺静脈還流異常症ならびに理研より購入したcontrolとなるiPS細胞である201B7を用いて、心筋細胞に分化誘導し、各種心筋転写因子群について定量的にRT-PCRを行い比較検討した。

まず、左心低形成症候群由来のiPS細胞は上記の2つの比較iPS細胞に比べ、心筋分化過程における初期転写因子であるNkx2.5の発現低下を認

め、心臓発生一次領域を司る前駆細胞の増殖および心筋系統誘導が障害されていることが示唆された。

また、左心低形成症候群の解剖学的特徴の一つである房室弁や中隔形成に関わるNotch1やHey1/2の転写発現異常を認めた。集約的に左右心室形成に重要なHand1/2の発現様式に異常が確認された。

また、単心室心由来iPS細胞から分化した心筋細胞はカルシウムの取り込みにおいて有意に少ない頻度の取り込みを示した。

複雑心奇形である左心低形成症候群の基幹病態像として、上記の一連となる心臓の発生過程の異常によってもたらされた疾患であることが明らかとなり、従来の疾患ゲノム解析法では解明しえない、複雑な先天性疾患の病態を疾患固有のiPS細胞を樹立することで、心筋細胞分化誘導早期から病態進展過程を詳細にかつ連続的に再構築できることが示唆された。

#### D. 考察

先天性心疾患患者の心臓組織より精製した心臓内幹細胞は、血液細胞や皮膚生検と異なり、術中に入手できるきわめて侵襲性が低い方法であり、疾患特異的ヒトiPS細胞の樹立に有効な細胞源である。

左心低形成症候群由来のiPS細胞は、その基本転写因子群の発現様式に疾患病態像を反映した特性があり、複雑心奇形の発症に関わる分子生物学的な機序解明に有用な研究ツールであった。

今後、候補となる各種遺伝子操作動物の作成と表現型解析により、より特異的な疾患関与遺伝子群の同定について詳細な解析を進めたい。

さらに、心臓手術後における心不全症状の再

燃や心不全死の有無を中心に、iPS細胞の機能解析した全症例に関する房室弁逆流の遅発性発症や蛋白漏出性腸症の合併について追跡調査する予定である。

#### E. 結論

致死性心不全を伴う先天性心疾患に特異的なiPS細胞を用いた研究はこれまでに報告がない。左心低形成症候群由来のiPS細胞の樹立により、心臓発生初期段階における複合的な転写活性異常を包括的に解析しえた。

本研究で樹立した各種疾患特異的iPS細胞を駆使することで、難治性疾患の長期的臨床疫学調査研究に応用する革新的予後診断法の開発に向けた研究を今後継続的に行うことが必要である。

これまでの研究は疾患発症後における染色体や遺伝子変異の解析が中心で、特定の疾患家系が存在しない孤発性の左心低形成症候群において、疾患の発症規定遺伝子の同定は極めて困難であった。本研究によって、これまで約99%以上が原因不明とされてきた左心低形成症候群の本質的病態解明と予後規定因子の同定につながる。

また、左心低形成症候群由来iPS細胞を詳細に解析することで、単心室心固有の遺伝子プログラムと自己再生能がきわめて高い下等動物であるzebrafishとの対比比較により、新たなヒト心臓再生医療法の開発につながる可能性がある。

#### F. 研究発表

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
  9. 藤井泰宏、赤木禎治、谷口 学、中川晃志、木島康文、大月審一、富井奉子、岩崎達雄、五藤恵次、戸田雄一郎、岡本吉生、新井禎彦、笠原真悟、佐野俊二 成人期心房中隔欠損に対するカテーテル閉鎖術と外科的閉鎖術の臨床成績比較：単一施設における後方視的非ランダムマイズ化検討 日本小児循環器学会雑誌 27(1) :23-30 (2011).
  10. 樽井 俊、佐野俊二、王 英正 小児心不全に対する心筋再生療法 Medical Science Digest 37(11):439-442(2011)
  11. 笠原真悟、佐野俊二 先天性心疾患患者における導管による右室流出路再建術の検討 日本循環器学会専門医誌 19 (2):291-295(2011)
  12. Tomii T, Honjo O, Matsumoto T, Tachibana H, Fujii Y, Ishino K, Ogasawara Y, Sano S. Impact of chronic cyanosis and reoxygenation on the microheterogeneity of the myocardial blood flow: digital radiographic study in neonatal rats. *General Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 59(10):672-680(2011).
  13. Shimizu K, Toda Y, Iwasaki T, Takeuchi M, Morimatsu H, Egi M, Suemori T, Suzuki S, Morita K, Sano S. Effect of tranexamic acid

- on blood loss in pediatric cardiac surgery: a randomized trial. *Journal of Anesthesia* 25(6):823-830(2011).
14. Kawabata T, Kasahara S, Arai S, Sano S Right ventricular exclusion for a neonatal patient with Ebstein anomaly: A free wall resection of the right ventricle. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 142(6):1582-1584(2011).
  15. Shimizu S, Une D, Shishido T, Kamiya A, Kawada T, Sano S, Sugimachi M. Norwood procedure with non-valved right ventricle to pulmonary artery shunt improves ventricular energetics despite the presence of diastolic regurgitation: a theoretical analysis. *J Physiol Sci*. 61:457-465(2011).
  16. Sano S Invited commentary *Annals of Thoracic Surgery*. 92(5):1740-1741(2011).
  17. Itoh H, Sano S, Pouard P. Pediatric perfusion in Japan: 2010 practice survey. *Perfusion*27(1):72-77, 2012.
  18. Fujii Y, Ishino K, Tomii T, Kanamitsu H, Fujita Y, Mitsui H, Sano S. Atrionatriuretic Peptide improves left ventricular function after myocardial global ischemia-reperfusion in hypoxic hearts. *Artificial Organs* 36(4):379-386, 2012.
  19. Taniguchi M, Akagi T, Kijima Y, Ito H, Sano S. Transcatheter Closure of a Large Atrial Septal Defect under Microprobe Transesophageal Echocardiographic Guidance. *Echocardiography* 29(4):E94-96, 2012.
  20. Nakagawa K, Akagi T, Taniguchi M, Kijima Y, Goto K, Kusano KF, Itoh H, Sano S. Transcatheter closure of atrial septal defect in a geriatric population. *Catheterization and Cardiovascular Interventions* 80(1):84-90, 2012.
  21. Itoh H, Ichiba S, Ujike Y, Kasahara S, Arai S, Sano S. Extracorporeal membrane oxygenation following pediatric cardiac surgery: development and outcomes from a single-center experience. *Perfusion* 27(3):225-229, 2012.
  22. Watanabe N, Taniguchi M, Akagi T, Tanabe Y, Toh N, Kusano K, Ito H, Koide N, Sano S. Usefulness of the right parasternal approach to evaluate the morphology of atrial septal defect for transcatheter closure using two-dimensional and three-dimensional transthoracic echocardiography. *Journal of the American Society of Echocardiography*25(4):376-382, 2012.
  23. Sano S, Fujii Y, Arai S, Kasahara S, Tateishi A. Atrioventricular valve repair for patient with heterotaxy syndrome and a functional single ventricle. *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery, Pediatric cardiac surgery annual* 15(1):88-95, 2012.
  24. Sano S. Editorial Comment: Does the shunt type determine midterm outcomes after a Norwood operation? *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 42(2):216-217, 2012.
  25. Fujii Y, Sano S, Asou T, Imoto Y, Oshima Y, Kawasaki S, Kishimoto H, Sakamoto K, Maeda M, Yamagishi M, Matsuo K. Outcomes of one-lung fontan operation: a retrospective multicenter study in Japan. *Annals of Thoracic Surgery* 94(4):1275-1280, 2012.



26. Sano S. Japanese congenital heart surgery is almost the same level of Europe and North America. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*113(3):288-291, 2012.
27. Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Sata Y, Mizuno M, Kamiya A, Shishido T, Inagaki M, Shirai M, Sano S. Sugimachi M Medetomidine, an  $\alpha$ 2-adrenergic agonist, activates cardiac vagal nerve through modulation of baroreflex control. *Circulation Journal*76(1):152-159, 2012.
28. 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.
29. Kotani Y, Ishino K, Honjo O, Sano S. Fontan completion in patient with pulmonary artery sling associated with hypoplastic left heart syndrome. Kotani Y, Ishino K, Honjo O, Sano S. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010 Jul;140(1):e12-3.
30. Miyahara Y, Kasahara S, Ishino K, Sakurai S, Sano S. Successful Fontan completion in a patient with noncompaction myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010 Apr;139(4):e85-7.
31. Shimizu S, Une D, Shishido T, Kamiya A, Kawada T, Sano S, Sugimachi M. Norwood procedure with non-valved right ventricle to pulmonary artery shunt improves ventricular energetics despite the presence of diastolic regurgitation: a theoretical analysis. *J Physiol Sci.* 2011 Aug 10
32. 佐野俊二、笠原真悟、新井禎彦、岩崎達雄、森田 潔、伊藤英史 心臓手術の実際 第22回 大動脈縮窄症・大動脈弓離断症に対する手術と体外循環法 - *Clinical Engineering*23(2):151-159, 2012.
33. 佐野俊二 日本の心臓・大血管外科レベルは欧米を超えているか? 5. 先天性心疾患 日本外科学会雑誌 113(3):288-291,2012
34. 佐野俊二、笠原真悟、藤井泰宏 第9章 先天性心疾患の最新治療 3. Ebstein 奇形の外科治療 先端医療シリーズ 43 循環器疾患の最新医療 pp137-139, 2012
35. 佐野俊二 世界における循環器専門医 オーストラリアの循環器医の現状 循環器専門医 20(1):162-166, 2012.
36. 佐野俊二 IV. 成人期の先天性心疾患の治療 2.手術 (2) 再手術の時期と問題点 新・心臓病診療プラクティス 18 大人になった先天性心疾患, 2012

学会発表

1. 佐野俊二 Change and Challenge - 胸部外科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、鶴垣伸也、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、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 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