

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
分担研究報告書

脂肪組織由来多系統前駆細胞シートの有効性検証

研究分担者

大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科 特任准教授 宮川 繁

研究要旨

重症心不全を対象疾患とし、冠動脈バイパス術 poor-responder に適用する経冠動脈的投与脂肪組織由来多系統前駆細胞を細胞医薬品として開発するとともに、大動物心不全モデルを用いて、同細胞の非臨床研究における有効性を検証する。

A．研究目的

難治性の拡張型心筋症の治療において、これまでの補助人工心臓より心臓移植への橋渡し治療のみでは、限界があるのが現状である。この限界を克服するために、本研究では、心筋細胞への分化誘導能を有する脂肪組織由来多系統前駆細胞の非臨床研究及び同データを用いて臨床応用を行い、最終的には、その効果の検討と、保険医療化を目指している。

本年度は、虚血性心筋症に対する新規治療の開発のため、心筋細胞への分化誘導能を有する脂肪組織由来多系統前駆細胞シートのブタ心筋梗塞モデルへの効果を中心に研究を行った。

B．研究方法及び結果

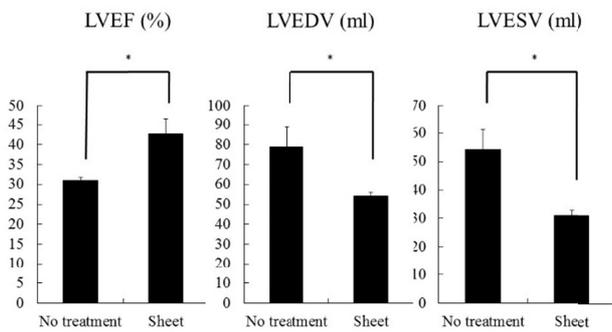
1) ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞シートのブタ梗塞モデルに対する有効性の検証

20kg のミニブタ (n=10) の左前下降枝にアメロイドリングを留置し、心筋梗塞モデルを作成した。梗塞モデルが、左室収縮率

は著明に低下し、左室壁厚は非薄化していた。また、左室の拡張末期容積、収縮末期容積は著明に拡大し、左室のリモデリングは進行していた。また、ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞を本研究の申請者より供与を受け、温度応答性培養皿を用いてシート化し、3枚の脂肪組織由来多系統前駆細胞シートをブタ梗塞モデルの左室自由壁前壁から側壁にかけて移植し、移植後8週に心臓超音波にて心機能を測定した。

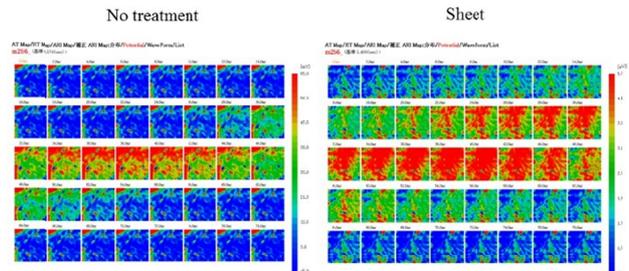
移植後8週間にて、左室収縮率は術前に比し、有意に回復し、無治療のコントロール群と比較して、有意な改善を認めた。また、左室の拡張末期容積、収縮末期容積ともに無治療のコントロール群と比較して、有意に容積の減少を認めた（図1）。

Figure 1



電気的パルスが移植部位に伝播していることが示唆された (図 2)。

Figure 2



組織学的に観察したところ、脂肪組織由来多系統前駆細胞シート移植群においては、コントロール群と比較して、有意な新生血管数の増加、線維化率の減少、心筋細胞径の有意な減少を認め、細胞シート移植群にて有意な左室のリバースリモデリング効果を認めた。移植細胞の検出を行ったところ、多数の移植細胞の残存は認められなかったが、残存細胞の心筋へ分化を示唆する組織像が認められた。心機能の改善効果は、主に移植細胞のパラクライン効果に起因することが示唆された。

## 2) ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞シートのブタ梗塞モデルにおける電気伝導性の改善

電気伝導性を検出する電位マッピングを行ったところ、無治療のコントロール群においては、梗塞部位においては、電気的興奮は認められず、梗塞部位周囲の正常心筋からの電気的興奮は梗塞巣に伝播していないことが示唆された。一方、脂肪組織由来多系統前駆細胞移植群においては、移植部位の電気的興奮を検出可能であり、検出した電気興奮はレシピエント心から伝導した

(倫理面への配慮)

1. 遺伝子改変動物、プラスミド DNA あるいは遺伝子導入ウイルス等を用いる場合は、使用に際して遺伝子組み換え生物などの使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約等各種法令・告示・通知に基づき研究を実施する。
2. 動物操作に当たっては、本学の動物実験規定に従って行なう。

## D. 考察

ブタ梗塞モデルを用いた脂肪組織由来多系統前駆細胞シートの非臨床研究において、同シートの臨床的有効性が示唆された。現在臨床で行われている筋芽細胞シートとの有効性を比較することが必要であり、筋芽細胞以上の有効性が示されれば、次世代の臨床応用用細胞として有用性があるものと思われる。本細胞は筋芽細胞と比較して、分泌するサイトカインの種類が多種である可能性があり、特に同細胞は脂肪由来サイトカインであるアディポネクチンを分泌し

ており、また心筋細胞への分化誘導能も有しているため、筋芽細胞より有効性が高いことが推察されるが、今後の検証が待たれる。

#### E . 結論

本プロジェクトにより、脂肪組織由来多系統前駆細胞シート移植の有効性が示唆された。今後、本シートの安全性の検証が行われることにより、十分な有効性、安全性兼ね備えた臨床研究が可能であることが示唆された。

#### F . 健康危険情報

該当なし

#### G . 研究発表

##### 1 . 論文発表

1. Higuchi T, **Miyagawa S**, Pearson JT, Fukushima S, Saito A, Tsuchimochi H, Sonobe T, Fujii Y, Yagi N, Astolfo A, Shirai M, Sawa Y. Functional and Electrical Integration of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a myocardial Infarction Rat Heart. Cell Transplantation, 2015 [E pub ahead of print]
2. Kainuma S, **Miyagawa S**, Fukushima S, Pearson J, Chen YC, Saito A, Harada A, Shiozaki M, Iseoka H, Watabe T, Watabe H, Horitsugi G, Ishibashi M, Ikeda H, Tsuchimochi H, Sonobe T, Fujii Y, Naito H, Umetani K, Shimizu T, Okano T, Kobayashi E, Daimon T, Ueno T, Kuratani T, Toda K, Takakura N, Hatazawa J, Shirai, Sawa Y. Cell-sheet Therapy with Omentopexy Promotes Arteriogenesis and Improves Coronary Circulation Physiology in Failing Heart. Mol Ther. E pub ahead of print, 2014
3. Kawamura T, **Miyagawa S**, Fukushima S, Yoshida A, Kashiyama N, Kawamura A, Ito E, Saito A, Maeda A, Eguchi H, Toda K, Lee JK, Miyagawa S, Sawa Y. N-Glycans: Phenotypic Homology and Structural Differences between Myocardial Cells and Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. PLoS One 9(10) e111064 2014
4. Shudo Y, **Miyagawa S**, Ohkura H, Fukushima S, Saito A, Shiozaki M, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Matsuyama A, Sawa Y. Addition of Mesenchymal Stem Cells Enhances the Therapeutic Effects of Skeletal Myoblast Cell-Sheet Transplantation in a Rat Ischemic Cardiomyopathy Model. Tissue Eng Part A 20(3-4) 728-39 2014
5. Kamata S, **Miyagawa S**, Fukushima S, Nakatani S, Kawamoto A, Saito A, Harada A, Shimizu T, Daimon T, Okano T, Asahara T, Sawa Y. Improvement of cardiac stem cell sheet therapy for chronic ischemic injury by adding endothelial progenitor cell transplantation: analysis of layer-specific regional cardiac function. Cell Transplant 23(10) 1305-19, 2014
6. Kamata S, **Miyagawa S**, Fukushima S, Imanishi Y, Saito A, Maeda N, Shimomura I, Sawa Y. Targeted Delivery of Adipocytokines into the Heart by Induced Adipocyte Cell-Sheet Transplantation Yields Immune Tolerance and Functional Recovery in Autoimmune-Associated

- Myocarditis in Rats. *Circ J*. Epub ahead of print, 2014
7. Yasui H, Lee JK, Yoshida A, Yokoyama T, Nakanishi H, Miwa K, Naito AT, Oka T, Akazawa H, Nakai J, **Miyagawa S**, Sawa Y, Sakata Y, Komuro I. Excitation propagation in three-dimensional engineered hearts using decellularized extracellular matrix. *Biomaterials* 35(27) 7839-50, 2014
  8. **Miyagawa S**, Sawa Y, Form Bench to Bedside, work in cell-based myocardial regeneration therapy. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 7(2) 86-103 2014
  9. Masuda S, **Miyagawa S**, Fukushima S, Sougawa N, Ito E, Takeda M, Saito A, Sawa Y. Emerging innovation towards safety in clinical application of ESCs and iPSCs. *Nat Rev Cardiol*. Epub ahead of print, 2014
  10. Masuda S, **Miyagawa S**, Fukushima S, Kawamura T, Kashiya N, Saito A, Sawa Y. Regulating ES or induced pluripotent stem cells by innate lymphoid cells. *Transplantation*, 98(5) e38-9, 2014
  11. Sawa Y, **Miyagawa S**. Cell sheet technology for heart failure. *Curr Pharm Biotechnol*. 2013 Jan;14(1):61-6.
  12. Shudo Y, **Miyagawa S**, Nakatani S, Fukushima S, Sakaguchi T, Saito A, Asanuma T, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Myocardial layer-specific effect of myoblast cell-sheet implantation evaluated by tissue strain imaging. *Circ J*. 2013;77(4):1063-72.
  13. Shudo Y, Cohen JE, Macarthur JW,他 6 名, **Miyagawa S**, Sawa Y, Woo YJ. Spatially oriented, temporally sequential smooth muscle cell-endothelial progenitor cell bi-level cell sheet neovascularizes ischemic myocardium. *Circulation*. 2013; 128(26 Suppl):S59-68.
  14. Uchinaka A, Kawaguchi N, Hamada Y, Mori S, **Miyagawa S**, Saito A, Sawa Y, Matsuura N. Transplantation of myoblast sheets that secrete the novel peptide SVVYGLR improves cardiac function in failing hearts. *Cardiovasc Res*. 2013; 99(1):102-10.
  15. Saito S, **Miyagawa S**, Sakaguchi T, Imanishi Y, Iseoka H, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Saito A, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Myoblast sheet can prevent the impairment of cardiac diastolic function and late remodeling after left ventricular restoration in ischemic cardiomyopathy. *Transplantation*. 2012 Jun 15;93(11):1108-15.
- ## 2 . 学会発表
1. **宮川 繁**, 心不全外科学における再生医学、第 114 回日本外科学会、京都、2014/4/4
  2. **Miyagawa S**, Autologous stem cell-sheet transplantation therapy for treating cardiomyopathy, AHA, Dallas, 2013/11/18
  3. **Miyagawa S**, Present and Future perspective of Cell sheet-based myocardial regeneration therapy Paradigm shift of cell sheet technology-From cytokine therapy to cardiomyogenesis therapy-日本循環器学会学術集会、横浜、2013/3/17
  4. **宮川 繁** 重症心不全に対する自己細

胞シート移植と左室補助人工心臓を用いた集学的心筋再生治療 日本人工臓器学会、福岡、2012/11/23

5. **宮川 繁** 細胞シートを用いた新しい心不全治療の現状と展望。日本老年医学会 学術集会、東京、2012/6/29
6. **宮川 繁**、重症心不全における細胞シートを用いたトランスレーショナルリサーチ 日本再生医療学会総会、横浜、2012/6/12
7. **宮川 繁** 重症心不全における細胞シート移植治療の基礎研究及びその臨床応用。日本外科学会、千葉、2012/4/13

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

多能性幹細胞由来心筋細胞集団の製造方法。今西悠基子、関口清俊、**宮川繁**、澤芳樹、シルタネン アンツィ マルクス、大阪大学出願：特願 2014-188180、2014  
未分化細胞が除去された分化誘導細胞集団、その利用及びその製造方法、増田茂夫、寒川 延子、福嶋五月、**宮川繁**、澤芳樹：大阪大学出願：特願 2014-226682、2014

心筋細胞シート、伊勢岡弘子、澤芳樹、**宮川 繁**、福嶋五月：テルモ株式会社、大阪大学 出願：特願 2014-230100、2014

2. 実用新案登録 特記事項なし

3. その他 特記事項なし