

第 18 回循環器再生医療研究会

日時：平成 26 年 11 月 8 日（土）15 時～
会場：武田薬品東京本社 8 階大会議室

共催

循環器再生医療研究会
武田薬品工業株式会社

一般演題 1

エリスロポエチンによる間葉系幹細胞における向血管新生能の修飾効果

水上拓也 昭和大学藤が丘病院循環器内科

礪良崇 昭和大学リハビリテーション病院循環器内科

佐藤千聡 昭和大学藤が丘病院循環器内科

笹井正宏 昭和大学藤が丘病院循環器内科

鈴木洋 昭和大学藤が丘病院循環器内科

本文：

背景：我々はこれまでに、骨髄由来間葉系幹細胞による血管新生治療の有効性について報告してきた。本研究では、エリスロポエチン (Epo) による細胞修飾により間葉系幹細胞移植の効果を更に向上させることが可能か検討を行った。

方法・結果：

緑色蛍光蛋白質 (GFP) ラットより骨髄間葉系幹細胞を単離し、Epo 受容体を同定した。Epo (80U/ml) 添加により骨髄間葉系幹細胞の増殖は有意に促進された。また、Epo により血管新生因子である fibroblast growth factor-2 と stromal cell-derived factor-1 α の遺伝子発現が有意に増強していた。In vivo での効果を検討するため、間葉系幹細胞を 48 時間 Epo (80U/ml) で conditioning した群 (Epo conditioning 群、n= 11) としなかった群 (control 群、n= 11) をラット下肢虚血モデルに移植し、比較検討を行った。移植 3 日後の組織で GFP の免疫染色による細胞生着を検討したところ、Epo conditioning は虚血筋組織への生着細胞数を有意に増加させた。また、マクロファージの浸潤を有意に抑制し、内皮前駆細胞の遊走を認めた。移植 14 日後において、Epo conditioning 群は control 群と比し、レーザードップラー測定による血流回復は有意に促進し、組織学的に評価した新生血管数が有意に増加していた。

結論：

Epo は間葉系幹細胞の細胞増殖を促進し血管新生因子産生を増強する。Epo conditioning により間葉系幹細胞移植の効果を向上させる可能性が示された。

一般演題 2

脱分化脂肪 (DFAT) 細胞による皮膚・創傷の血管新生促進療法

副島一孝 1)、 櫻村 勉 1)、 風間智彦 2)、 松本太郎 2)、 仲沢弘明 1)

1) 日本大学医学部 形成外科学系形成外科学分野

2) 日本大学医学部 細胞再生・移植医学分野

【目的】創傷の治癒には線維芽細胞による細胞外マトリックス産生と血管内皮細胞による新生血管網の付加による肉芽組織形成が必要である。何らかの原因でこの現象が障害されると創傷治癒は阻害されて難治性潰瘍となり、皮膚移植などを行っても生着が得られない。われわれは、脱分化脂肪 (dedifferentiated fat: DFAT) 細胞による皮膚・創傷の血管新生促進効果について、コラーゲンスポンジ (人工真皮) 移植モデルを用いて検討したので報告する。

【方法】①SD 系ラットの腹腔内脂肪より DFAT を単離・培養した。②同種同系ラット背部に全層皮膚欠損創を作製し、人工真皮 (Pelnac 標準タイプ、グンゼ社製) を移植するモデルを作製した。人工真皮移植に際して、以下の 4 群を作成した。I 群: 対照群 (未治療)、II 群: DFAT (0.5X10⁵cell) 治療群、III 群: bFGF 治療群 (bFGF 製剤 科研製薬社製、30 μ g/cm²)、IV 群: bFGF+DFAT 併用治療群。人工真皮移植後 2, 7 日目に標本作製し組織学的に検討した。

【結果】移植後 2 日目には IV 群のみで人工真皮下層に新生血管の侵入が観察された。7 日目には II, III, IV 群で真皮様組織構築の促進が観られたが、その効果は IV 群で最も著明であった。

【考察】コラーゲンスポンジ (人工真皮) を創傷 (皮膚欠損創) に移植すると、移植床より線維芽細胞や新生毛細血管が進入し、スポンジ構造を鋳型として真皮様組織と呼ばれる肉芽組織が形成される。人工真皮移植時に DFAT を投与すると血管新生および肉芽組織形成が促進された。更に、臨床で一般的に用いられている bFGF 製剤を併用するとその効果は著明に促進されることが明らかとなった。

一般演題 3

T 細胞受容体遺伝子再構成を標的とした細胞移植治療における iPS 細胞由来移植心筋細胞の新規病理学的同定法

岸野 喜一 1、関 倫久 1、宮本 憲一 2、湯浅 慎介 1、藤田 淳 1、福田 恵一 1

1 慶應義塾大学医学部循環器内科

2 慶應義塾大学医学部遺伝子医学教室

[背景] 近年、重症心不全に対する移植治療の細胞ソースとして iPS 細胞由来心筋が期待されている。しかし、移植した自家 iPS 細胞由来心筋細胞をレシピエント組織から識別しうる有用な方法は確立されていない。GFP などの外的な遺伝子導入法は、腫瘍形成などに繋がる可能性があり、臨床化応用の観点からは適切でない。この問題について我々は T 細胞由来 iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞を用いることによって、T 細胞受容体遺伝子再構成を標的とした新規病理学的同定法を確立することを試みた。

[方法・結果] 健常人の末梢血 T 細胞から温度感受性センダイウイルスベクターを用いて Oct3/4、Klf4、Sox2、c-Myc の 4 因子を導入し、T 細胞由来 iPS 細胞(TiPS 細胞)を feeder-free 条件で樹立した。樹立した TiPS 細胞の多能性・未分化性を PCR や免疫染色などで確認し、浮遊培養で TiPS 細胞を心筋細胞へと分化誘導した。また、樹立した TiPS 細胞の T 細胞受容体 β の遺伝子配列をシークエンス、ImMunoGeneTics データベースと比較し V・D・J 領域を同定することで、T 細胞受容体 β 遺伝子の再構成により除去された配列に対する蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)プローブを作製した。作製した FISH プローブと 7 番染色体セントロメアに対する FISH プローブを用いて DNA FISH 法を行うことにより、TiPS 由来心筋細胞とヒト ES 細胞由来心筋細胞を T 細胞受容体 β 遺伝子再構成の有無で病理学的に識別することが可能であった。

[結論]我々は FISH 法を用いて T 細胞受容体 β 遺伝子再構成の有無を同定することに成功した。この方法を用いることで外的な遺伝子挿入をすることなく、自家 TiPS 由来心筋細胞をレシピエント組織と識別することが可能であり、同方法の今後の更なる検討・改善により、将来的に臨床応用化が期待される。

一般演題 4

脳室内への骨髄由来細胞自家移植は AngII 持続投与高血圧, DOCA 食塩高血圧ラットの交感神経活性を抑制する

中村 卓人 1、山里 正演 1、石田 明夫 1、山里 代利子 2、大屋 祐輔 1

1 琉球大学大学院医学研究科 循環器・腎臓・神経内科学

2 同 感染症・呼吸器・消化器内科学

【背景】骨髄由来間葉系幹細胞 (BMC) は抗炎症や組織修復に働くことが知られている。一方、脳内レニン-アンジオテンシン系 (RAS) の亢進は炎症や組織障害を通じて交感神経活性を亢進させ, neurogenic hypertension を引き起こすことが知られている。AngiotensinII (angII) 持続投与高血圧, deoxycorticosterone acetate (DOCA)食塩高血圧ラットでは脳内 RAS が亢進していることが知られており、これらのモデルに対して骨髄由来細胞の脳室内投与 (icv) を行い、血圧、交感神経活性を評価した。

【方法】実験 1. 1) angII 投与開始 2 週間前に骨髄を採取し、赤血球、浮遊細胞を除去したのち 3 週間培養した。2) angII 150ng/kg/min の投与を開始し、高血圧モデルを作成した。3) angII 投与開始 1 週間後に BMC あるいは medium を icv した。4) angII 投与開始後 3 週まで tail cuff 法で血圧を評価した。5) angII 投与開始 4 週後に大腿動静脈にカテーテルを留置し、無麻酔無拘束下血圧を評価し、その後にヘキサメソニウム(C6)による血圧降下度を交感神経活性として評価した。

実験 2. 実験 1 2)での介入を angII 持続投与から片腎摘+DOCA 食塩負荷に変更した。その他同様のプロトコールで実験を行った。

【結果】実験 1:最終週の安静時平均血圧は vehicle+medium 群、vehicle+BMC 群、angII+medium 群、angII+BMC 群でそれぞれ 125 ± 2 , 116 ± 2 , 174 ± 7 , 134 ± 8 mmHg と angII 投与により有意に上昇しており、BMC の icv によりそれが抑えられていた。また、C6 による血圧降下度は各群で 38 ± 3 , 46 ± 6 , 77 ± 5 , 48 ± 1 と angII 投与により交感神経活性の上昇が示唆され、BMC の icv によりそれが抑制されていた。

実験 2: 最終週の安静時平均血圧は vehicle+medium 群、vehicle+BMC 群、DOCA+medium 群、DOCA+BMC 群でそれぞれ 111 ± 4 , 112 ± 3 , 173 ± 5 , 166 ± 7 と DOCA 投与で有意に上昇を認めたが、BMC の icv で差は認めなかった。C6 投与後の血圧降下度はそれぞれ 41 ± 2 , 46 ± 5 , 97 ± 10 , 69 ± 5 mmHg で DOCA 投与群で血圧降下度は有意に大きく、BMC の icv によりその降下度は抑制されていた。

【結論】脳内骨髄由来細胞は angII 持続投与、DOCA 食塩負荷による交感神経亢進作用に対して保護的に働く可能性がある。

一般演題 5

細胞シート移植による幼若個体心筋再生の賦活化

本間 順、関根秀一、松浦勝久、清水達也
東京女子医科大学先端生命研究所

【目的】

近年、難治性心不全治療の一つとして再生医療の治験が成人を中心に始まっているが、乳児に対する治験は未だ少ない。また、乳児期心筋障害の基礎的な検討も少なく、細胞シート移植の効果を検証した報告はない。本研究ではラット心筋梗塞モデルを用い、授乳期における①心臓の自己再生能、及び②細胞シート移植の効果を検討した。

【対象および方法】

①授乳期ラットと成熟ラットの心筋梗塞後自己再生能の比較

2週齢、12週齢ラットの冠動脈左前下行枝を結紮し梗塞モデルを作製した(2週齢心筋梗塞ラット: Infant MI、12週齢心筋梗塞ラット: Adult MI)。3週間後に心機能と組織学評価を行った。

②授乳期心筋梗塞ラットに対する細胞シート移植の効果

ラット筋芽細胞 (cell line) を温度応答性培養皿へ 50×10^4 cells/dish で播種・培養後、温度処理により細胞シートを作製した。細胞シートは3枚積層化し移植を行った。

移植群 (Sheet 群) は、2週齢で梗塞モデルを作製し、1週間後に細胞シートを移植した。移植2週間後(梗塞作製3週間後)に心機能と組織学評価を行った。

心機能評価は心臓カテーテル検査で行い、左心室の収縮能(max dp/dt)、拡張能 (min dp/dt、LVEDP)を比較した。組織学評価は、梗塞部壁厚及び、線維化率を比較し、免疫蛍光染色で、c-kit陽性細胞数、血管数、分裂期心筋数を比較した。

【結果】

①授乳期ラットと成熟ラットの心筋梗塞後自己再生能の比較

心機能評価では、Infant MI 群が max dp/dt、min dp/dt で良く ($P < 0.05$)、組織学評価では、Infant MI 群で梗塞部壁厚が厚く ($P < 0.01$)、線維化率も低かった ($P < 0.01$)。免疫蛍光染色では、Infant MI 群で分裂期心筋数が多かった ($P < 0.05$)。

②授乳期心筋梗塞ラットに対する細胞シート移植の効果

心機能評価では、Sheet 群が max dp/dt、LVEDP で良く ($P < 0.05$)、組織学評価では、Sheet 群で梗塞部壁厚が厚く ($P < 0.01$)、線維化率も低かった ($P < 0.01$)。免疫蛍光染色では、Sheet 群の方が分裂期心筋数 ($P < 0.01$)、梗塞部血管数 ($P < 0.05$)、及び、c-kit 陽性細胞数 ($P < 0.01$) が多かった。

【考察】

授乳期のラットは成熟ラットよりも心臓の再生能が高く、更に細胞シートを移植することにより、再生能が賦活化していることが分かった。機序としては、線維化抑制、心筋分裂促進、血管新生促進作用が関わっていると示唆された。

【結論】

本研究により、乳児期の心筋自己再生能の優位性及び、細胞シート移植による再生能の賦活化を示すことができた。機序として、心筋分裂が関与していることは既存の報告に無く、本研究の成果の一つであるが、種差を含め検討していく必要がある。

一般演題 6

創傷治癒への低出力体外衝撃波血管再生療法の可能性

手塚晶人、高木 元、宮本正章、久保田芳明、乾 恵輔、桐木園子、高木郁代、清水 渉
日本医科大学付属病院 循環器内科

＜背景・目的＞創傷治癒過程において、血流障害の改善は不可欠であるが、創傷加療の実臨床ではカテーテル治療やバイパス術による血行再建術の適応患者を除き局所血流低下部位の血流改善を創傷治療に併用した報告は少ない。そこで我々は無侵襲で施行可能な血管再生治療である低出力体外衝撃波療法を用い末梢動脈疾患患者(peripheral artery disease : PAD)へ施行、その臨床効果を定量的血流評価にて検討した。

＜方法＞

膝窩動脈以下に局限した血流低下を伴う4人のPAD患者(平均年齢76歳)を登録。虚血下肢腓腹筋部へ低出力体外衝撃波(8000発/回、3回/週)を2週間照射し、血流指標の改善を検討した。血流評価項目はABI、経皮酸素分圧を、機能的評価として最大歩行距離を運動負荷検査を行った。＜結果＞治療開始より2週目までのクールで有害事象を認めなかった。ABIは前後で有意差を認めず(前 0.5 ± 0.1 、後 0.42 ± 0.1 、 $p=0.3$)。経皮酸素分圧において有意差は認めなかったものの改善傾向を認めた(前 $15.0 \pm 5.7\text{mmHg}$ 、後 $31.0 \pm 11.9\text{mmHg}$ 、 $p=0.05$)。最大歩行距離は個人差が大きいながらも全例で改善していた(前 $174 \pm 138\text{m}$ 、後 $242 \pm 229\text{m}$ 、 $p=0.6$)。＜結論＞重症の下肢虚血を伴うPAD患者においては低出力体外衝撃波治療が血流を改善する可能性が示唆され、創傷加療時の治療選択肢として有用であると考えられる。

プレナリー I

新法制度下での再生・細胞医療と細胞加工受託および支援サービス

鈴木 邦彦

株式会社メディネット 取締役事業本部長

再生医療等はこれまで医師法や医療法のもとで実施され、臨床研究や自由診療の広がりと共に法整備の必要性が指摘されてきたところ、本年11月、当該医療の特性を考慮した再生医療新法と改正薬事法が施行されることになった。新しい法的枠組みの下では、医療機関から企業への細胞加工委託が可能となる一方、医療機関は再生医療等のリスク分類に応じ、安全性審査、医療計画の提出、定期報告が求められることになった。

15年間に亘り、免疫細胞治療を実施する医療機関に総合支援サービスを提供してきた当社は、細胞加工や細胞加工技術開発、さらに細胞加工施設管理の実績を活かして新法施行後に対処していく。具体的には、再生医療等製品の開発を行う他、幹細胞も含めたあらゆる細胞の加工受託ニーズに応える。また、再生医療等を実施する医療機関にとって負担となるであろう、各委員会や医療計画提出用の関連文書作成を支援し、さらに細胞加工施設の管理等も受託する。

新法の下、当社の医療機関に向けた支援サービスは、顧客や対象技術を拡大し、多様なニーズに応じていくこととなる。

細胞加工業における競争優位性の源泉は、細胞加工に関わるバリューチェーンを機動的に運用できる組織力であると考え、当該組織力により新制度移行をビジネスチャンスと捉え積極的な事業展開を図りたい。

プレナリーII

脂肪酸摂取バランスによる心血管疾患予防戦略

松本太郎

日本大学医学部 細胞再生・移植医学分野

脂肪酸は、生体膜の構成成分であるとともに栄養素として機能し、生命維持に必須の物質である。動物性脂肪に多く含まれる飽和脂肪酸は、血中 LDL-C を増加させるとともに、それ自体に生理活性を有し、炎症を惹起することが明らかにされている。多価不飽和脂肪酸は二重結合の位置により、 ω -3 系と ω -6 系に分類され、 ω -3 系には、 α -リノレン酸、エイコサペンタエン酸(EPA)、ドコサヘキサエン酸(DHA)、 ω -6 系には、リノール酸、 γ -リノレン酸、アラキドン酸(AA)が含まれる。魚を多く含む伝統的な日本食から食生活の欧米化が進む我が国では、脂肪酸摂取バランスは飽和脂肪酸や ω -6 多価不飽和脂肪酸摂取に偏りがちであり、多くの若者が、低 ω -3 多価不飽和脂肪酸血症といえる状況にある。近年、生体内多価不飽和脂肪酸の質を表現する指標として、EPA/AA 比が注目され、食生活を反映する新たな心血管疾患のリスクマーカーとしての役割や、治療介入効果の判定基準としての役割が期待されている。 ω -3 多価不飽和脂肪酸は、生体内で合成されない必須脂肪酸であるため、日常の食生活で効率良く摂取する工夫が必要となる。日本で実施された高コレステロール血症の患者を対象に EPA 製剤を用いた大規模臨床介入試験(JLIS)では、スタチンによる通常治療に加えて EPA を併用することにより、冠動脈疾患の一次予防 18%、二次予防 19%と有意に冠動脈疾患の発症を減少させることが報告された。また欧米で実施された ω -3 脂肪酸エチル (EPA・DHA 製剤) を用いた大規模無作為化試験 (GISSI-Prevenzione 試験) でも心筋梗塞発症後の致死性イベントに対する EPA・DHA 製剤の抑制効果が確認されている。このように治療的介入を含め、積極的に脂肪酸摂取バランスを適正化することが、LDL-C 低下療法のみでは解消できない心血管疾患予防の残余リスクを減弱させる治療戦略として重要であると思われる。本プレナリーでは、脂肪酸に関する基礎的知見と脂肪酸摂取バランスの適正化による心血管疾患予防戦略について概説する。

特別講演 I

大腿骨頭壊死症に対する骨髄間葉系幹細胞を用いた骨再生治療

青山朋樹

京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻

現行の治療法で治癒を得られない難治性疾病を抱える患者にとって、再生治療の実用化は大きな福音をもたらす。細胞を用いた再生治療に期待されるのは、病的細胞や病的組織を健全な細胞や組織に置換することであるが、単に細胞を輸注あるいは移植するだけでは機能性を発揮できるわけではない。再生治療を実用化するには、疾患の病理、病態を十分に把握し、どのような治療戦略を構築し、分化細胞や幹細胞に何を期待するかを立案する事が必要である。

これまでに我々は基礎研究、探索的研究、前臨床試験を経て、自己骨髄由来の間葉系幹細胞を、難治性骨壊死疾患に対して臨床応用する臨床試験「大腿骨頭無腐性壊死患者に対する骨髄間葉系幹細胞を用いた骨再生治療の検討」「月状骨無腐性壊死患者に対する骨髄間葉系幹細胞を用いた骨再生治療の検討」を2007年から開始した。大腿骨頭壊死症は難病疾患にも指定されており、現行の治療法では満足できる治癒は困難である。この難病に対して本臨床試験を実施するにあたり、単に間葉系幹細胞を移植するだけでは骨再生は得られないと考え、その移植方法の工夫、移植後の骨へのリモデリングを考慮したりハビリテーションを実施した。本講演ではこれらの戦略とその運用について紹介を行う。

特別講演 II

音波を用いた低（非）侵襲性血管新生療法の開発

下川 宏明

東北大学大学院循環器内科学

急性期治療の進歩に伴い虚血性心疾患の予後は改善してきているが、その一方で高齢患者・重症例が増加してきている。我々は、ブタ慢性心筋虚血モデルにおいて、低出力の衝撃波（結石破碎治療に用いる出力の約 10 分の 1）を体外から虚血心筋に照射すると、血管内皮増殖因子の発現亢進を介して血管新生が促進され、心筋虚血や心機能が改善することを見出した (1)。この基礎研究で認めた有効性に基づき、重症狭心症患者を対象に低出力体外衝撃波治療の臨床試験を実施した。第 1 次臨床試験では、治療後には全例で狭心症症状が軽減し、その効果は 1 年以上持続した。また、負荷心筋シンチで評価した心筋血流は衝撃波照射部位でのみ改善を認めた (2)。第 2 次臨床試験では、衝撃波治療後には狭心症症状・運動耐容能・心機能の改善を認めたが、プラセボ治療後には改善を認めなかった (3)。以上から、低出力体外衝撃波治療により血管新生を介して心筋血流が改善したと考えられた。また、衝撃波治療に伴う合併症は認めなかった。これらの研究成果により、狭心症に対する低出力体外衝撃波治療は 2010 年に厚労省の先進医療に承認された。海外では、既に、20 ヶ国以上で、6000 名の患者に使用され、有効性と安全性が報告されている。

現在、東北大学では、本治療法に興味をもった診療各科が適応拡大に向けて、基礎研究および臨床研究を行っている。この中には、下肢の閉塞性動脈硬化症、リンパ浮腫、皮膚潰瘍、脊髄損傷などが含まれる。

最近、我々は、特殊な条件の超音波にも血管新生作用があることを見出し、動物実験での有効性・安全性の確認 (4) を経て、現在、医師主導の臨床試験を実施中である。

音波を使った血管新生療法は、自己修復能力を引き出す低（非）侵襲性の治療法であり、今後の発展が期待される。

(文献)

1. Nishida T, Shimokawa H, Oi K, et al. Extracorporeal cardiac shock wave therapy markedly ameliorates ischemia-induced myocardial dysfunction in pigs in vivo. *Circulation*. 110:3055-3061, 2004.
2. Fukumoto Y, Ito A, Takeshita A, Sunagawa K, Shimokawa H. Extracorporeal cardiac shock wave therapy ameliorates myocardial ischemia in patients with severe coronary artery disease. *Coronary Art Dis*. 17:63-70, 2006.
3. Kikuchi Y, Ito K, Ito Y, et al. Double-blind and placebo-controlled study of the effectiveness and safety of extracorporeal cardiac shock wave therapy for severe angina pectoris. *Circ J*. 74:589-591, 2010.
4. Hanawa K, Ito K, Aizawa K, et al. Low-intensity pulsed ultrasound induces angiogenesis and ameliorates left ventricular dysfunction in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *PLOS ONE*. 9(8):e104863. doi:10.1371/journal.pone.0104863.