

**Hypoxic-conditioned cardiosphere-derived cell sheet
transplantation for chronic myocardial infarction**

(慢性心筋梗塞モデルに対する低酸素刺激を併用した
CDC シート移植治療の検討)

氏名 藤田 陽

所属 山口大学大学院医学系研究科
医学専攻
器官病態外科学講座

令和元年 8 月

目次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	4
3. 目的	5
4. 方法	5
5. 結果	9
6. 考察	18
7. 結語	19
8. 謝辞	20
9. 参考文献	20
10. サプリメント	23

1. 要旨

細胞移植治療とは、移植細胞のパラクライン効果により、組織再生に適した環境を生み出し、再生を促進させる治療法である。なかでも、CDC (cardiosphere-derived cell) は再生医療に用いられる細胞種の中でも高いパラクライン効果を有すると考えられており、臨床応用が期待されている。我々は以前から細胞シート技術と低酸素培養による細胞機能賦活化を研究しており、今回、低酸素培養を併用した CDC シートのウサギ心筋梗塞モデルにおける治療効果を検討した。

In vitro では、低酸素培養 (2%O₂) が CDC シートに与える影響を ELISA と qPCR で評価した。低酸素培養を施行した CDC シートの培養上清では VEGF の分泌量が通常酸素培養と比較して高い傾向にあった。また、低酸素培養した細胞シートの mRNA を解析すると、VEGF に加え、ANG2 の発現量も有意に増加しており、低酸素培養によるパラクライン効果の増強が示唆された。一方で、低酸素培養による培養細胞の Apoptosis の増加は認められなかった。

In vivo では、CDC シートをウサギ慢性心筋梗塞モデル (CMI : chronic myocardial infarction) に貼付して治療効果を検討した。CMI モデルは左冠動脈の結紮で作製した。結紮 4 週間後に CDC シートを貼付し、貼付 4 週間(結紮 8 週間後)後に犠牲死させた。結紮前、シート貼付前、犠牲死前で心エコー評価を施行したところ、CDC シート治療で有意な左室駆出率の改善を認めた。また、この改善効果は低酸素培養を併施した CDC シート群で有意に大きかった。梗塞心の血管新生をトマトレクチン染色で評価したところ、低酸素 CDC シート治療群では梗塞境界領域および梗塞領域でコントロール群と比較して有意に血管新生が増強していた。梗塞面積についてもマッソントリクローム染色で評価したところ低酸素 CDC シート治療群では有意に梗塞面積が縮小していた。

CDC シート治療によりウサギ CMI モデルの心機能改善効果を認めた。また、低酸素培養は CDC の血管新生効果を増強し、シート治療の効果を高めることが示唆された。

2. 研究の背景

先進国における虚血性心疾患の患者数は増加傾向にある[1-2]。虚血による心筋リモデリングは左室拡大を引き起こし、その結果として虚血性僧帽弁逆流や致死的不整脈を引き起こす。虚血性僧帽弁逆流や不整脈はさらなる左室リモデリングを引き起こし、悪性サイクルを形成し、一部の患者は終末期心不全の状態へと移行していく。現在、終末期心不全に対する根治的治療法の第一選択として心臓移植がある。心臓移植は拒絶反応や術後の免疫抑制療法の必要性があるものの、成人に対する心臓移植は1年生存率が87.8%、5年生存率が71.7%と良好な治療成績が報告されている[3]。

しかし、心臓移植は絶対的なドナー数の不足から待機期間が長く、厳しい適応基準が厳しく定められているため、すべての終末期心不全患者に対して用いることができない。実際に、ステータス1Aもしくはステータス1の患者における平均待機時間は米国では113日[4]、本邦では1174日[5]となっている。

第2選択の治療法としては、心臓移植の代替としてVAD (ventricular-assisted device) の植え込みがある。REMATCH試験では、VADを用いた患者における予後の改善効果が報告されており、VAD使用患者の2年生存率は23%、内科的治療のみの患者の2年生存率は8%と報告された[6]。さらに、近年の心肺補助装置の発達により、VADがdestination治療として用いられる割合は、2006年の8.4%から2010年の13.8%と増加を認めている[7]。しかしながら、ドライブライン感染や、出血、塞栓症といった解決すべき課題も未だ多く山積している。

こうした状況の中で、細胞治療は心臓移植の新たな代替手段として注目されており、c-kit陽性幹細胞[8]、脂肪由来の間葉系幹細胞[9]、骨髄由来の間葉系幹細胞[10]、心筋幹細胞 (CDC) [11]などをカテーテルで移植する臨床試験が行われはじめている。今まで、細胞移植治療により梗塞領域が縮小する効果が報告されたが、左室拡張末期容積の縮小や、左室駆出率の改善を認めなかった。

細胞移植治療の効果は移植細胞それ自体が直接、心筋細胞や血管内皮細胞に分化するというよりも、むしろ移植細胞が持つパラクライン効果による間接的なもので、移植細胞により分泌された成長因子が細胞の成長に適した環境を整えることで組織再生が促されるものと考えられている。

CDCは心筋組織からcardiosphereを介して単離される体性幹細胞で、CD105/CD90陽性、CD31/CD34/c-kitに一部陽性を示す細胞と定義される。CDCは成長因子の分泌能が他の細胞種よりも高く、虚血にも強いとされる[12]。

細胞治療の効果を最大にするためには、移植細胞種だけでなく、移植方法と移植細胞の生着率についても検討する必要がある。移植細胞の投与方法で検討した動物モデルにおいて、心筋内注射による移植では 22.9%、冠動脈注射では 15.4%、静脈注射では 0.8%の移植細胞が心臓内に生着するとの報告がある[13]。細胞シート技術に関しては、心不全に対する骨格筋細胞シート移植の方法としても用いられており、生着率が高い[14,15]。

細胞賦活化の観点から、CDC 治療のさらなる発展のために、我々は低酸素培養と細胞シート技術を併用することに着目した。以前、我々は、マウスモデルにおいて CDC シート移植は左室駆出率を改善し、梗塞面積を縮小することを報告した。また、その治療効果は低酸素培養することで CDC シートの治療効果が高まることを証明した[16]。しかし、以前の CDC シート治療は温度感受性培養皿を用いた単層シート移植であり、更なる CDC シート治療の効果を高める方法の検討が必要であると考えられた。また、温度感受性培養皿を用いた単層シートを重ねることで作製する細胞数の多い積層細胞シートは高い治療効果が得られるとの報告が散見され、我々が開発した方法による積層 CDC シート治療という着想に至った。

3. 目的

本研究の目的は、積層化 CDC シートと低酸素培養とを組み合わせることにより、より高い治療効果を持つ新規細胞移植治療を開発することである。慢性心筋梗塞モデルに対する治療効果を検討し、心臓移植のドナー数が絶対的に不足している現状の高齢患者含めた患者に適応できる治療法の開発を目的とした。

4. 方法

使用動物

オスのニュージーランドホワイト種のウサギ (2.5-3.0kg) を KBT Oriental 社より購入した。実験に用いられたウサギは調整された環境 (室温: 22±2°C、12時間の明暗サイクル) で飼育された。すべてのウサギに対する手術は山口大学の動物実験倫理委員会の承認の下、そのガイドラインに則り、全身麻酔で施行し、除痛について最大限の配慮を行った (#31-104)。

ウサギ慢性心筋梗塞モデルの作製

ウサギにケタミン (1mg/kg) とキシラジン (3mg/kg) で静脈麻酔を施行し、3mm の気管挿管チューブで挿管を行い、人工呼吸下に手術を施行した。麻酔維持は 2-3%セボフルランで行った。感染予防目的に、ゲンタマイシン (2.5mg/kg) を術前投与した。手術は左第 4 肋間開胸で行った。左房組織を採取し、左冠動脈を 4-0 モノフィラメント糸で結紮した。心電図モニターで ST 上昇を確認し、心筋梗塞の発症を確認した。心筋梗塞発症後 4 週間のウサギの内、結紮前 LVEF が $75 \pm 2.5\%$ 、結紮後 LVEF が 50-55% の症例を慢性心筋梗塞モデルとして実験に用いた。慢性心筋梗塞モデルの均質性は追加実験で確認し、同等の虚血領域と梗塞領域を持つことを病理所見で確認した。

CDC の単離と CDC シートの作製

ウサギ自家 CDC は以前の我々の報告と同様にして行った[16.17.19]。図 1A に示すようにウサギ自家 CDC シートを作製した。左房組織をそれぞれのニュージーランドホワイト種のウサギから採取し、1-2mm に細切し、フィブロネクチンコーティングを施行した 10cm ディッシュ上で培養を行った。培養は Thermo Fisher Scientific 社から購入した IMDM を用いて、10%FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシンのメディウムで行った。培養は通常酸素培養 (37°C、20%O₂、5%CO₂) の環境で行った。播種した組織から由来した増殖細胞を継代し、ポリ 2 ハイドロメチルコーティングを施行したフラスコで浮遊培養を行った。浮遊細胞は cardiosphere メディウム(サプリメントテーブル 1)で行った。3 日間の培養後に浮遊細胞は cardiosphere を形成し、これを再度フィブロネクチンコーティングされた 10cm ディッシュに播種した。IMDM、10%FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシンのメディウムで継代を行い、passage2 の CDC をすべての実験に用いた。CDC シートは以前に報告した手順[20]で作製した。ウサギ CDC シート作製する際は、播種後 6 時間の時点で細胞の接着を確認し、低酸素培養(33°C、2%O₂、5%CO₂)または通常酸素培養の培養条件へと移動させた。最適な培養条件を決定するために 1-3 日間培養し、in vivo の実験を行った。

In vivo 実験に従い、In vitro 実験では、CDC を 6 well プレートに 2.0×10^6 cells/well に播種し、各培養条件下で 2 日間培養した CDC シートを用いて実験を行った。細胞シートを剥離する際は、10PU/ml のディスパーゼで 30 分間インキュベーションすることで剥離した。剥離後は PBS で洗浄し、CDC シートを

セプラフィルム®(Kaken Pharmaceutical 社)に載せることで心外膜表面に CDC シートを移植した。CDC シートは心筋梗塞領域から虚血境界領域を覆うように移植された。コントロール群ではセプラフィルムのみを移植した。

フローサイトメトリー

フローサイトメトリーは NovoCyte (ACEA Bioscience 社) を用いて解析された。抗 CD105 抗体 (#12-1057-42)、抗 CD90 抗体 (#11-0909-42) は Thermo Fisher Scientific 社から購入し、アイソタイプコントロールは #556650 と #566649 を BD Bioscience 社から購入した。CDC の陽性対照として、我々が以前実験で用いた人 CDC 細胞を用いて[17]細胞特性を検討した。

心エコー検査

経胸壁心エコーは Vivid i system (GE Medical System 社) で全身麻酔下に心機能を評価した。評価時期は左冠動脈結紮前 (0 週間)、治療前 (左冠動脈結紮後 4 週間)、治療後 (左冠動脈結紮後 8 週間、治療後 4 週間) の 3 時点で行った。評価項目は左室前壁厚、左室後壁厚、左室径、LVEF と %FS とした。

組織学的解析

犠牲死後のウサギ心臓は 10%ホルマリンを用いて一晩、室温固定を行った。その後パラフィン包埋を行い 3 μm 厚で組織を切り出して評価を行った。梗塞領域の線維化面積の評価にはマッソントリクローム染色を用いた。血管新生の評価はトマトレクチン (Vector Laboratories 社) 染色を用いて、梗塞領域、虚血領域、正常領域の毛細血管新生を評価した。すべての病理像は BZ-X710 (Keyence 社) を用いて得られ、解析は Image J を用いて行った[21]。

アポトーシスアッセイ

アポトーシスは DNA ラダーアッセイと TUNEL 染色を用いて解析された (サプリメント図 1)。DNA ラダーアッセイは ApopLadder Ex™ (TaKaRa Bio 社)、TUNEL 染色は In Situ Cell Death Detection Kit (Roche 社) を用いて行った。検体には通常酸素培養 (1-3 日間培養)、低酸素培養 (1-3 日間培養) を用いた。陽性対照として CDC シートをピューロマイシン 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 6 時間処理した検体を用いて実験を行った。

成長因子の分泌と遺伝子発現の定量

ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)を施行し、各培養条件で CDC シートが培養上清中に分泌する VEGF (vascular endothelial growth factor) の定量を行った。アッセイにはヒト用 VEGF Quantikine immune assay kit (RD System 社) を用いた。VEGF の産生量は培養期間中の積算量で計測した。その他の成長因子についても ELISA での定量を試みたが、適切にクロスする抗体を認めなかったため、VEGF、EGF、HGF、bFGF、IGF-1 の mRNA の発現量は定量 PCR で解析された。それぞれの培養条件下で作製した CDC シートから RNeasy Mini kit (Qiagen 社) を用いて RNA を抽出し、PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa Bio 社) を用いて逆転写し、1 本鎖 cDNA を作製した。定量 PCR は cDNA に SYBR® Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific 社) を加え、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて行った。プライマー配列はサプリメントテーブル 2 に記したものを作製し、実験に用いた。反応プロトコルは以下の様に行った。50°C、2 分、95°C、2 分後に、95°C 3 秒、60°C 30 秒を 40 サイクル反応させた。発現量は beta-actin を用いて $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法で補正して比較した。

血管様管腔形成アッセイ

HUVEC (Human umbilical endothelial cells) を用いて血管様管腔形成アッセイが行われた。HUVEC を EGM2 メディウム (Lonza 社) で培養・継代を行い、Matrigel® (Corning 社) でコーティングした 96 well プレートに 1×10^4 cells/well で播種した。その後、各種培養条件下 (低酸素・通常酸素) の CDC 培養上清を加え、血管様管腔形成を観察された。陽性対照には EGM2 メディウムを用いた。評価は播種後 0 時間と 6 時間で施行し、ジャンクション構造、メッシュ構造、枝分かれ構造をそれぞれ image J を用いて解析し、定量化した。

統計処理

結果は特に記載がない限りは、平均値±標準偏差で記した。2 群間比較は対応のない Student's t test で行った。他群間の解析は One way ANOVA で施行し、群間に有意差が示唆された際は Turkey test を施行した、すべての統計的処理は State 14.2(Lightstone 社) で行い、 $P < 0.05$ を統計的に有意と判断した。

5. 結果

CDC の細胞学的特性

ヒト CDC と同様、ウサギ CDC は CD105 と CD90 の高発現を認めた。(図 1B)

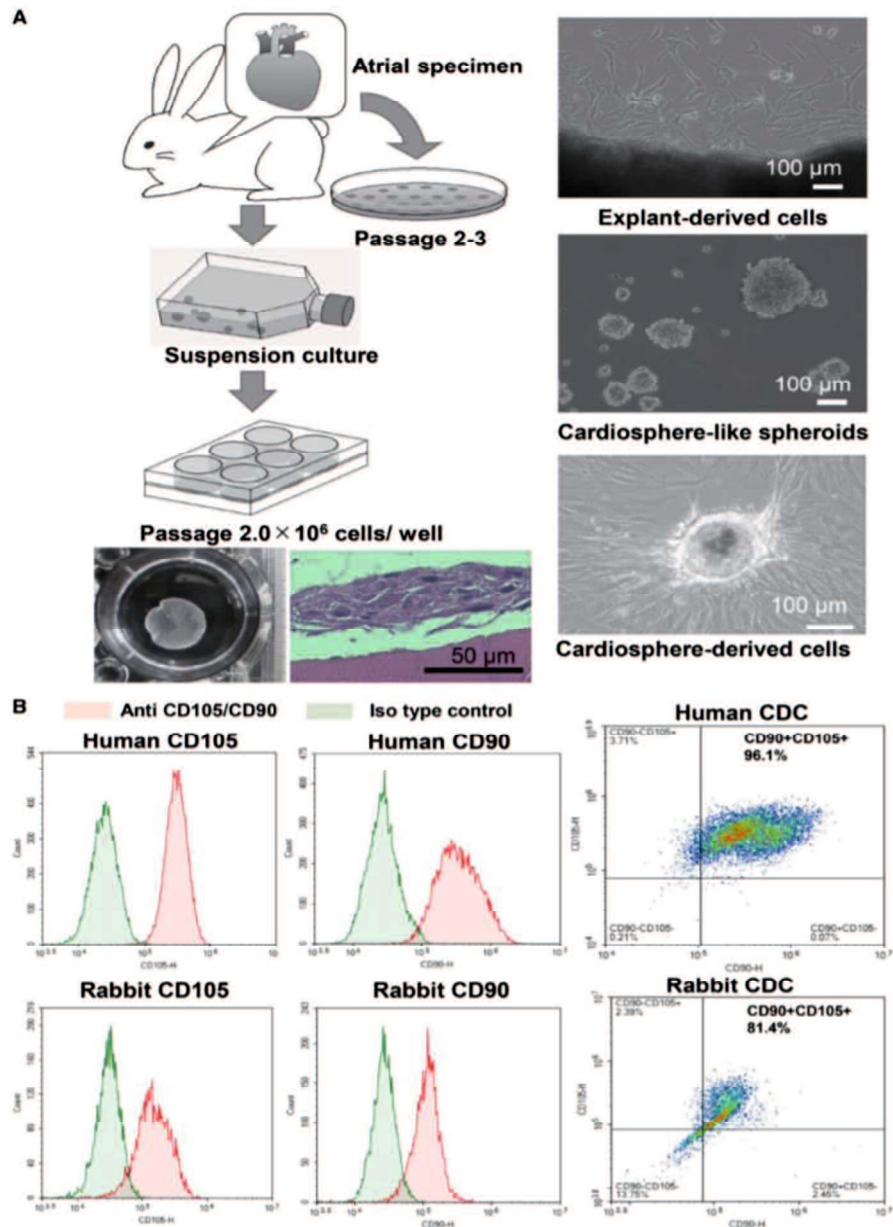


図 1: CDC シート作製の概略図

(A) CDC の単離：左心房標本から単離した。CDC シートを生ハムに移植し、HE 染色でシートの厚さを観察した。(B) ウサギ CDC の細胞表面抗原の分析。

ヒト CDC を実験対照として使用した。

低酸素培養下での成長因子の発現

CDC シートの治療効果を最も高め、アポトースが発生しない低酸素培養期間が検討された。ELISA では、低酸素培養を行った CDC 培養上清において通常酸素培養と比較し、VEGF 分泌が有意に多かった (図 2A)。また、2 日間以上の低酸素培養下において VEGF、MMP-3、BMP-10 の mRNA の発現は有意に高い結果であった。さらに、FGF、CD31、HIF1- α 、MMP-2、angiopoietin-2 の mRNA に関しても、低酸素培養下で発現が高い傾向であった。しかしながら、IGF-1 の発現は低酸素で減少し、EGF、HGF、Akt-1,2、Endoglin の発現レベルは培養条件によって変化しなかった (図 2B)。

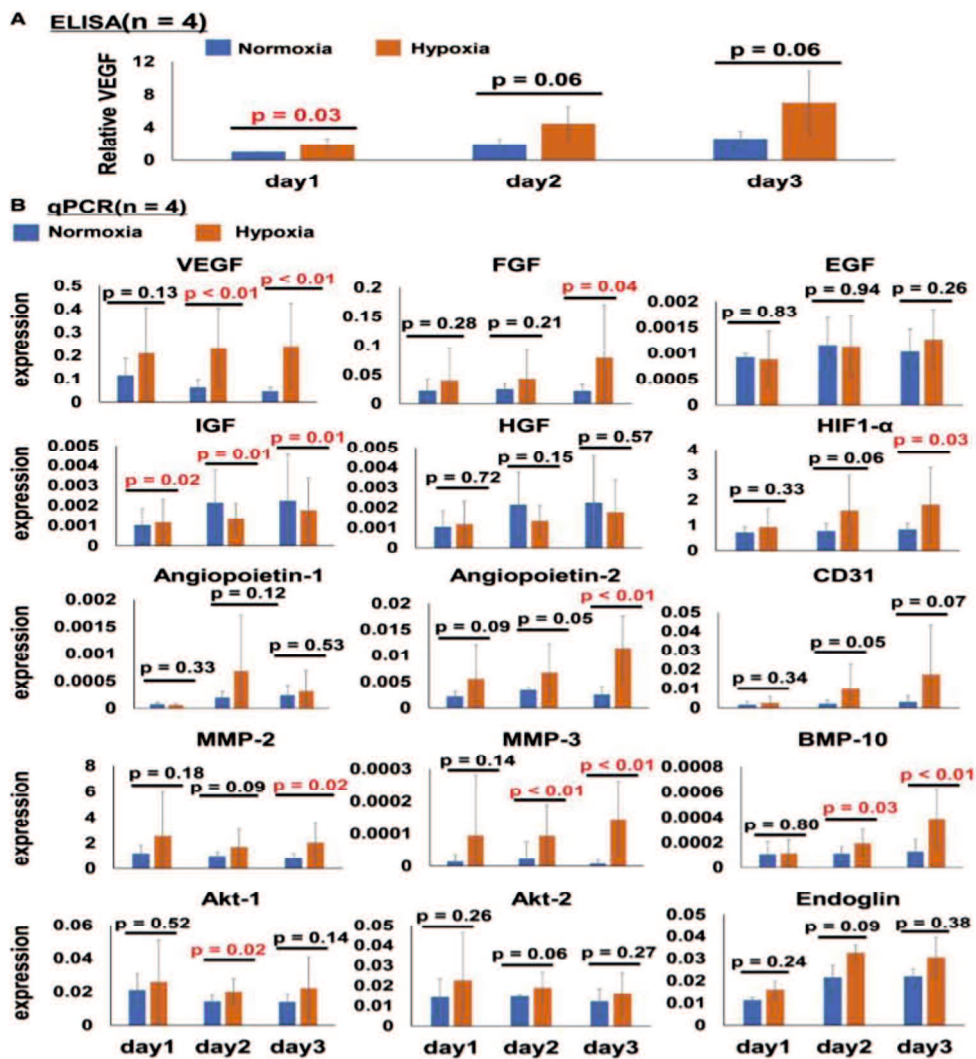


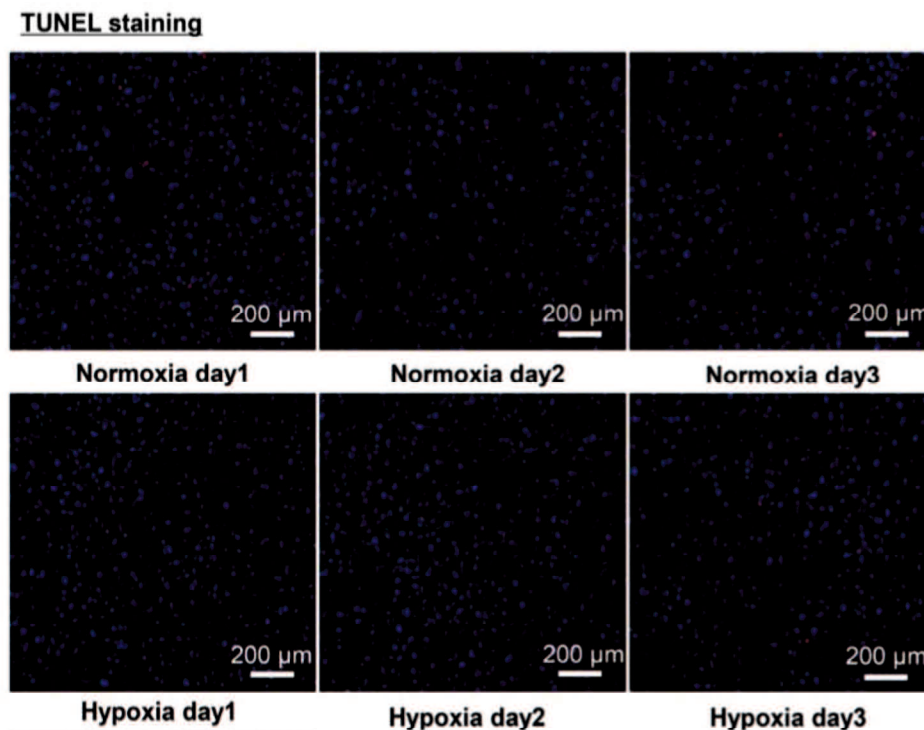
図 2: 低酸素培養下での成長因子の発現

(A) ELISA で測定された各培養条件において CDC シートから分泌された累積 VEGF 濃度 (n = 4)。 培養 1 日目の通常酸素状態の量を 1 に標準化した。

(B) 各培養条件の CDC シートにおける mRNA 発現を qPCR により定量した (n = 4)。 発現量は、beta-actin によって補正した。

低酸素培養が CDC のアポトーシスに与える影響

DNA ラダーは陽性対照以外の検体で検出されず、すべての培養条件下でアポトーシスの低酸素によるアポトーシスの亢進が観察されなかった (サプリメント図 1)。アポトーシスを定量するために、TUNEL 染色が image J で解析されたが、各群間でアポトーシス発生に有意な差は認められなかった (図 3)。以上の結果から、シート作製に要する日数も考慮し、2 日間の低酸素培養を行った CDC シートが最も治療効果が高いと考え、これを *in vivo* 実験に用いることとし、ウサギ慢性心筋梗塞モデルに貼付を行った。



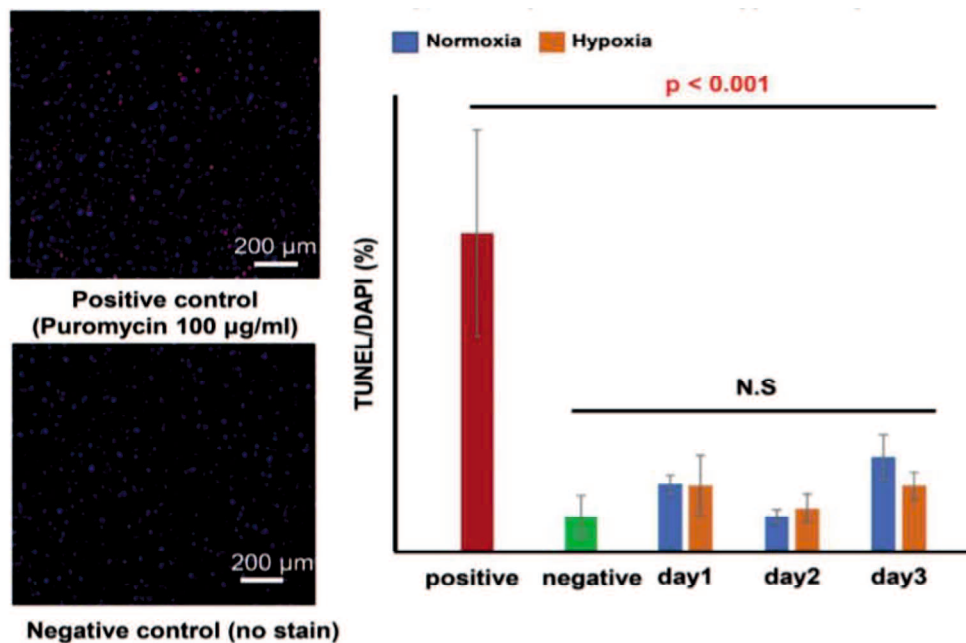


図 3：低酸素培養が CDC のアポトーシスに与える影響

各培養条件下における TUNEL 染色。ピューロマイシン(100 µg/ml) で 3 時間処理した CDC を陽性対照として使用した。断片化された DNA (赤) と DAPI で染色された核 (青)。

ウサギ慢性心筋梗塞モデルへの CDC シート移植

ウサギ慢性心筋梗塞モデルは以前の報告[18,22]を参考にして作製された。心筋梗塞の発症は左冠動脈結紮後に心電図で確認した (図 4A)。左冠動脈結紮による虚血性変化の肉眼的病理所見を示す (サプリメント図 1)。72 時間後には虚血による色調変化を認め、4 週間後には心室壁厚の菲薄化を認めた。CDC シートは 6 well プレートのウェル (9.6 cm²) を用いて作製され、ディスパーゼで剥離後は直径約 1.5cm のシートとなった。CDC をウサギ心臓に貼付する手技が正しく行えているかを確認するために、先行実験として PKH26 で染色された CDC シートがウサギ心筋梗塞モデルに貼付された。貼付 4 週間後に犠牲死させ、心外膜表面に PKH26 染色された CDC シートが存在することが確認された(図 4B)。

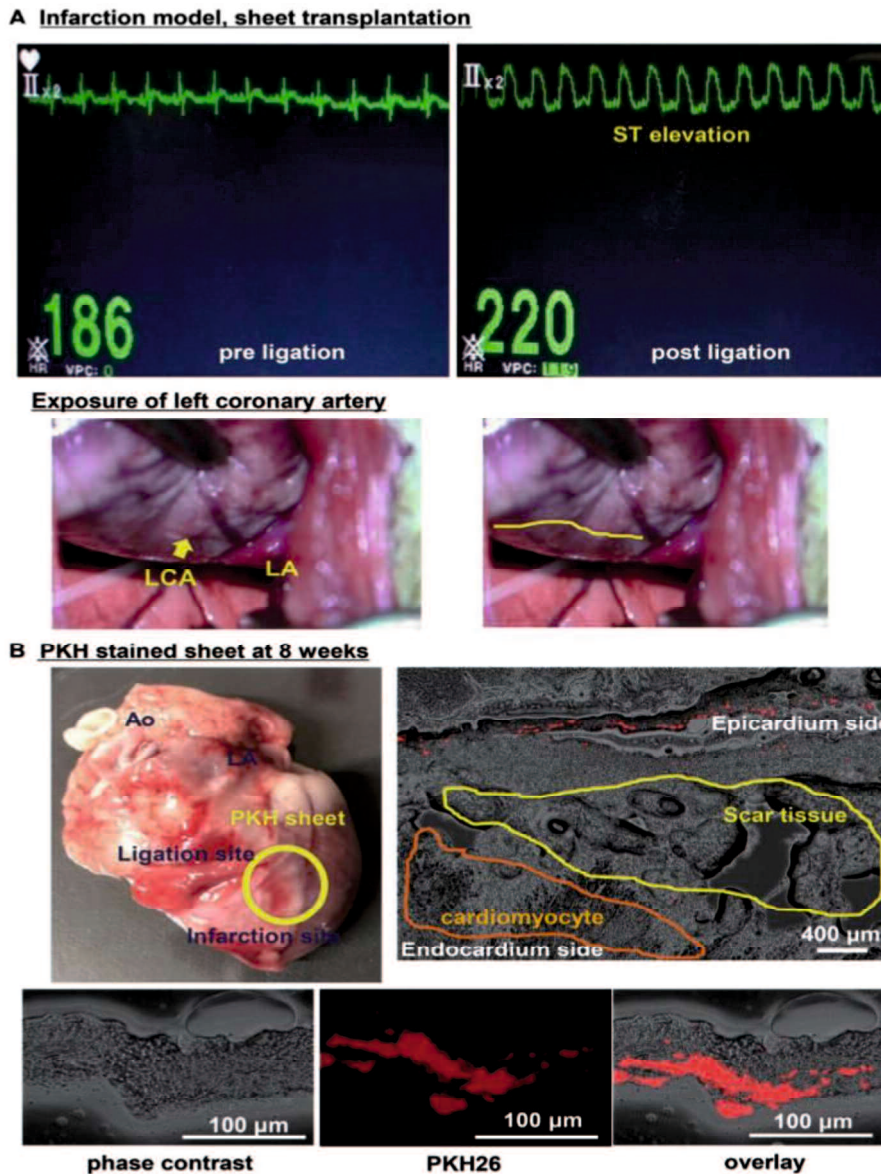


図 4：梗塞モデルおよび CDC シート移植。(A) LCA 結紮による梗塞モデル術中心電図は LCA 結紮後に ST 上昇を示した。(B) 8 週間時点の PKH26 染色 CDC シート。PKH26 染色 CDC シートは、心筋細胞と心外膜上の瘢痕組織との間に観察された。

低酸素培養 CDC シート貼付後の心機能改善

経胸壁心エコーデータから、左冠動脈結紮によって作成された慢性心筋梗塞モデルは十分に均質であると考えられた(図 5、サプリメント図 2)。左冠動脈結紮後 4 週間で、約 25%の LVEF 低下が認められた。低酸素培養を行った CDC

シートを移植した群では、通常培養を行った CDC シート移植群に比較して、治療後 4 週間時点で LVEF と %FS の両方の改善が認められた (図 5A、B)。

しかしながら、治療群、コントロール群において左室前壁厚、左室後壁厚、左室径に有意な差は認めなかった (図 5C-F、サプリメント図 3)。代表的なエコー所見を図に示す(サプリメント図 4)。

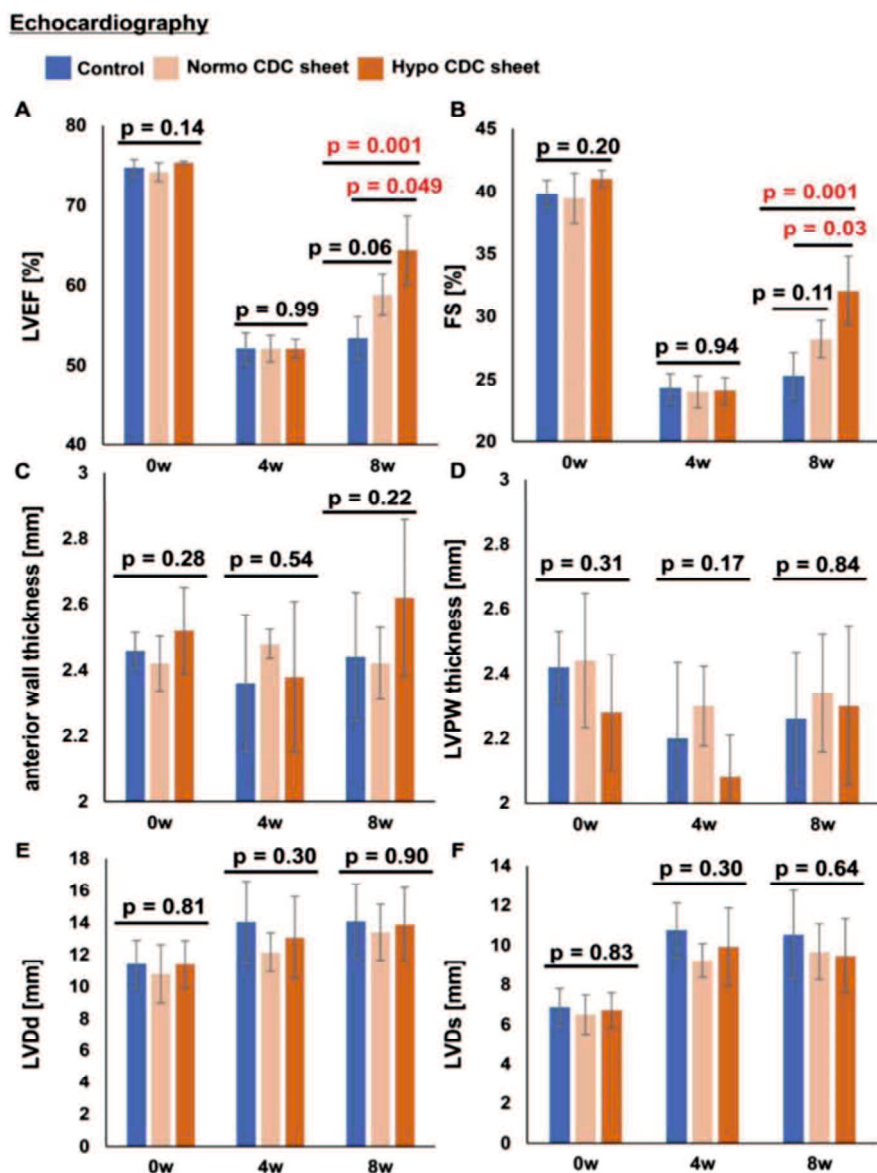


図 5：低酸素培養 CDC シートを移植したウサギにおける心機能の改善
心エコー検査 (A~F) は、左冠状動脈結紮術前 (0 週目)、左冠状動脈結紮術後 4 週目および 8 週目に行った。

低酸素培養 CDC シート貼付後の心臓における血管新生と梗塞面積

CDC シート移植治療後に認められた心機能改善効果のメカニズムを明らかにするために、移植後のウサギ心臓組織の解析が行われた。血管新生の評価としてトマトレクチン染色が行われた。CDC シート移植群ではコントロール群と比較して虚血領域におけるレクチン陽性面積が大きかった (図 6A)。また、他群と比較して、低酸素培養 CDC シート貼付後の心臓において、梗塞領域における血管新生が有意に多く認められた。また、梗塞面積は CDC 治療群において、コントロール群と比較して、有意に縮小していた(図 6B)。

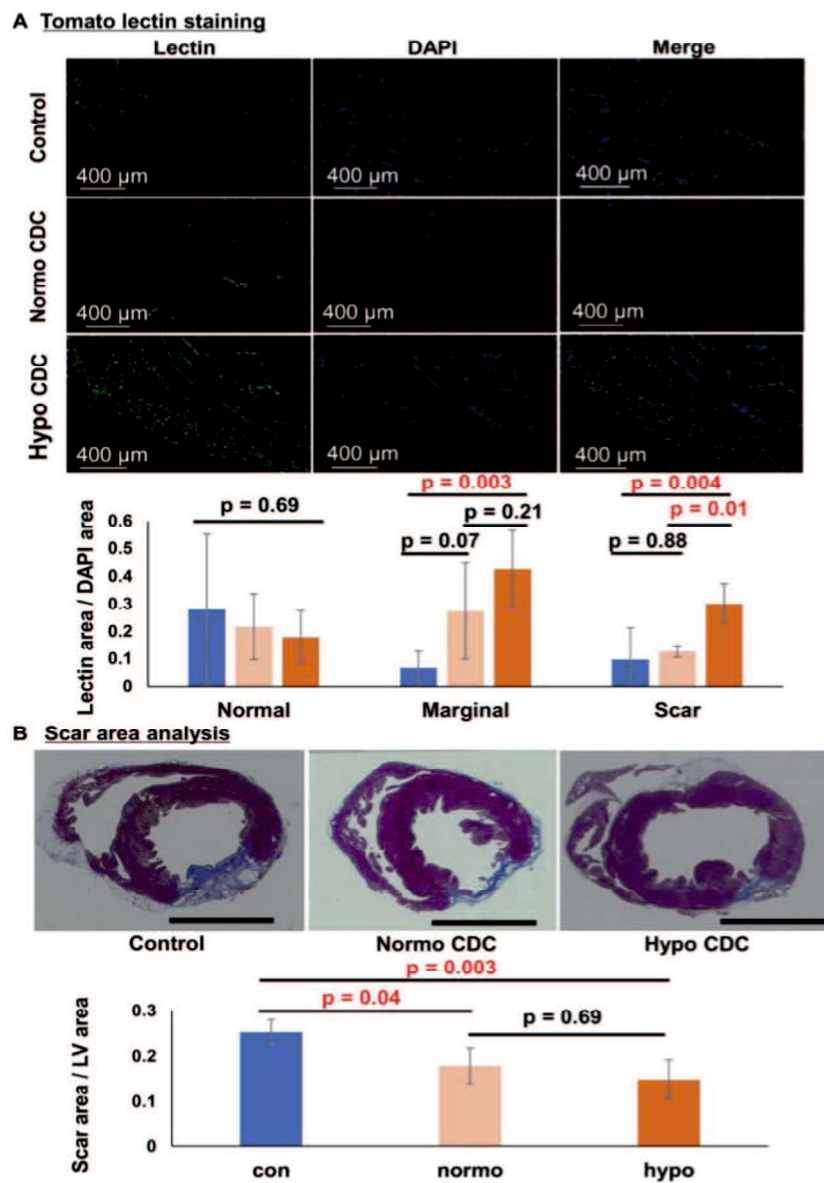


図 6 : CDC シート移植 4 週後の心臓組織の分析

(A) CDC シートを移植した梗塞心臓における血管新生能をトマトレクチン染色により定量した。トマトレクチン陽性領域(緑)は、正常領域、境界領域および梗塞領域における DAPI 陽性領域(青)によって標準化された。(B) マッソントリクローム染色による瘢痕面積の解析。

低酸素培養 CDC シートの血管新生能

In vitro で認められた低酸素培養 CDC シート貼付による梗塞領域の血管新生増加効果を検討するために、HUVEC を用いた血管様管腔形成アッセイが行われた。HUVEC に対して、各種条件下での CDC 培養上清を添加した分岐構造やジャンクション構造、メッシュ構造を評価したところ低酸素培養を行った CDC の培養上清で有意に多くの管腔形成が確認された (図 7)。

Tube formation assay

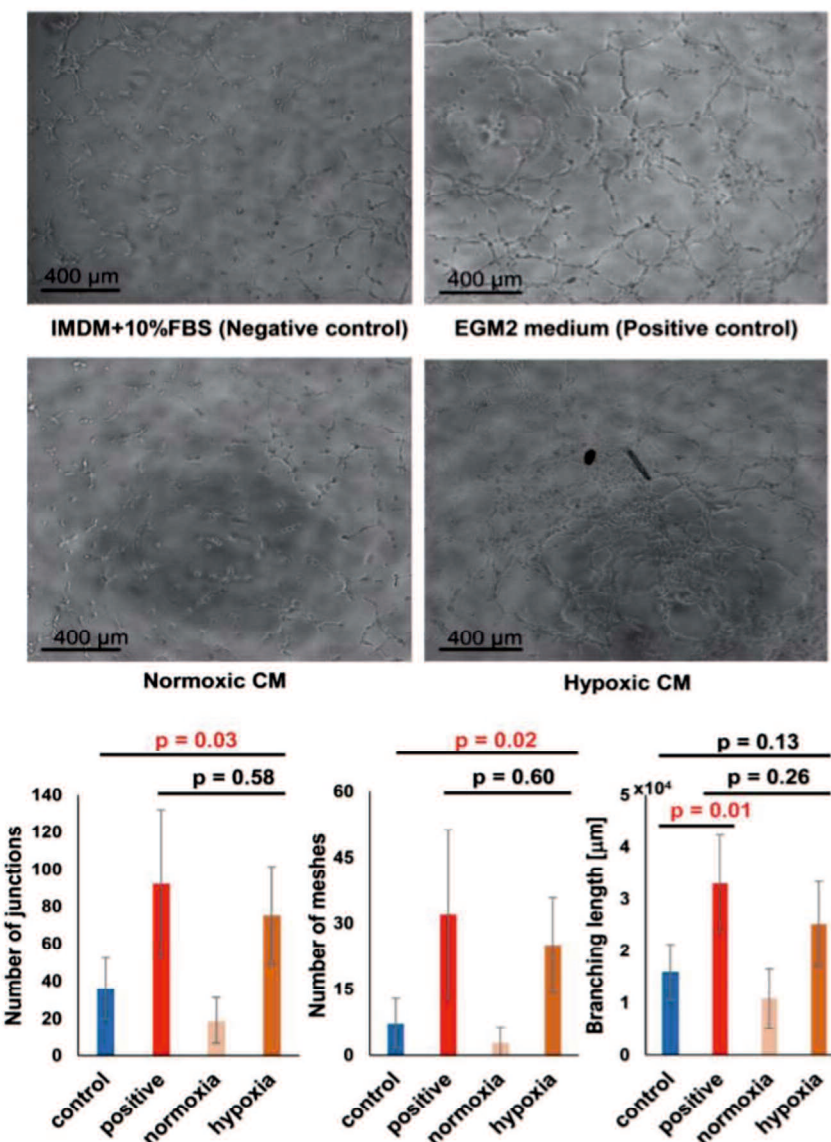


図 7：血管様管形成アッセイ

6 時間後の HUVEC を用いた血管様管形成を示す代表的な画像を示す。各培養条件下の CDC 培養上清を検体に用いた。EGM2 メディウムを陽性対照として使用した。血管新生は、Image J ソフトウェアの Angiogenesis Analyzer を使用して評価した。

6. 考察

細胞医療に用いられる候補となる様々な細胞種の中で、CDCは他の幹細胞と比較して高いパラクライン効果を持っている[12]。また、CDCは骨髄由来間葉系幹細胞と比較して、虚血再灌流障害に対して強い抵抗性を持つ[23]。それゆえ、CDCは虚血性心疾患の治療に適していると考えられる。しかし、心筋生検で得られた心筋組織から単離されたCDCを心臓カテーテル冠注するという方法で施行されたCADUCEUS試験では、僅かな組織学的改善しか認めなかった[11]。効果が十分に表れなかった原因として、CDCの生着率が低いことが可能性としてあげられる。この問題を解決するために、我々は細胞シート技術と低酸素培養を併用することで、CDC移植の治療効果を向上させた。CDCシート移植治療は、虚血心筋症に対する冠動脈バイパス術を施行する際などの外科的介入時に付帯する治療法として応用できる可能性がある。

臨床応用に際して、急性心筋梗塞に対する細胞移植の適応を考えると、冠注による方法では、微小塞栓による心筋障害の増悪や冠血流の減少を引き起こす可能性がある。さらに、心内膜側からの心筋内細胞投与ではカテーテルを用いた手技になるために、角度的に投与が難しい領域が発生し、穿孔の可能性も憂慮される。本研究で用いられている細胞シート技術では、これらの問題を解決し、細胞の生着率をも上昇させ得る。

48時間の低酸素培養は、血管新生の開始に関わるとされる **angiopoietin-2**をはじめとした、**VEGF**、**BMP10**などの血管新生に関与する因子の発現増強を促した。更に、低酸素培養はCDCシートを構成する細胞のアポトーシスを誘導しない。重要なことに、低酸素培養CDCシートは虚血領域において血管新生を引き起こし、梗塞面積を減少させ、心機能の改善をもたらした。更に、低酸素培養CDCシートの培養上清はHUVECの血管様管腔構造の形成を促進させた。これらの所見は、以前の動物モデルを用いた研究結果[24]と一致している。これらの結果は、低酸素培養がCDCの血管新生能を向上させたことを示唆している。細胞シート治療におけるパラクライン効果は、移植細胞数が増えるほど高まるとされる[17]。以前の研究と比較して、細胞治療による血管新生効果が高い原因としては、移植細胞数が高いことに起因する可能性がある。多くの研究が、血管新生と心筋再生の関連について行われているが、詳細な機序については未だ解明されていない。最近の研究では、常に血管新生が心筋細胞の増殖に先立って起こり、その後、心筋細胞が増殖することから、心筋再生

には血管新生が必要であることが報告されている[25]。そのため、低酸素培養 CDC シートの移植は血管新生を引き起こすことで、虚血領域における心筋再生の誘導をもたらしていることが示唆される。活性化 MMPs はコラーゲン代謝をコントロールしていることで知られており、活性化 MMPs は梗塞面積を縮小するメカニズムに関連している可能性がある。MMPs は梗塞部や血管内皮を含む様々なコラーゲンを分解し、血管内皮細胞を梗塞組織に誘導に関わっていることも考えられる。Cardiosphere の移植により、梗塞領域の pro-MMP2 や活性化 MMP2 蛋白の発現量が増加するとの報告がある[26]。また、低酸素培養 CDC シートで MMP2 の mRNA 発現が増加するという所見は、CDC シートから分泌される MMP2 が線維化組織の減少に関わっている可能性を示唆する。

しかしながら、このメカニズムはウサギモデルにおける有意な LVEF の改善を説明するには十分ではない。というのは、成体の哺乳類における心筋細胞の増殖は全体の 0.4-1.0% でしか発生しないと報告されているからである[27]。更に、血管新生が冬眠心筋に及ぼす影響が関与している可能性が考えられる。冬眠心筋の様な虚血領域はコラーゲンを蓄積しており、代謝活動を減弱させている。この状態が CDC シート移植を心外膜側に移植することによっておこる血管新生により、心筋血流が改善される可能性が考えられる[28]。このように、血管新生や MMPs の活性化などの多面的なパラクライン効果により、冬眠心筋に含まれる、増殖能を持つ細胞を増殖させ、左室心筋リモデリングの減弱をもたらしている可能性が示唆された。

7. 結語

我々の結果は、移植する CDC シートの低酸素培養期間は 48 時間であるという指針をもたらした。これらの低酸素培養 CDC シートはウサギ慢性心筋梗塞モデルにおいて高い治療効果を持っており、虚血領域における血管新生能を示した、この血管新生は、心筋再生を補助している可能性があり、CDC シートは移植により梗塞面積を縮小させる可能性がある。多面的なパラクライン効果により、本研究の組織で観察された、血管新生と梗塞面積の減少が認められ、LVEF の改善につながったと考えられた。

8. 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました山口大学大学院 器官病態外科学講座（第一外科）、濱野公一教授に深謝申し上げます。また、実験指導を頂きました上野耕司先生（山口大学大学院 器官病態外科学講座）に感謝申し上げます。

9. 参考文献

- [1] Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S et al. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2018;137:e67–492.
- [2] Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, LuengoFernandez R et al. *European Cardiovascular Disease Statistics 2017*. 15 Brussels: European Heart Network, 2017.
- [3] Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Christie JD, Dobbels F et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-eighth adult lung and heart-lung transplant report-2011. *J Heart Lung Transplant* 2011;30:1078–94.
- [4] Mancini D, Lietz K. Selection of cardiac transplantation candidates in 2010. *Circulation* 2010;122:173–83.
- [5] Fukushima N, Ono M, Saiki Y, Sawa Y, Nunoda S, Isobe M. Registry report on heart transplantation in Japan (June 2016). *Circ J* 2017;81: 298–303.
- [6] Rose EA, Gelijns AC, Moskowitz AJ, Heitjan DF, Stevenson LW, Dembitsky W et al. Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure. *N Engl J Med* 2001;345:1435–43.
- [7] Kirklin JK, Naftel DC, Kormos RL, Stevenson LW, Pagani FD, Miller MA et al. Third INTERMACS annual report: the evolution of destination therapy in the United States. *J Heart Lung Transplant* 2011;30:115–23.
- [8] Bolli R, Chugh AR, D’Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy

- (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet* 2011;26: 1847–57.
- [9]Houtgraaf JH, den Dekker WK, van Dalen BM, Springeling T, de Jong R, van Geuns RJ et al. First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:539–40.
- [10]Bartunek J, Behfar A, Dolatabadi D, Vanderheyden M, Ostojic M, Dens J et al. Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (Cardiopoietic stem cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *J Am Coll Cardiol* 2013;61: 2329–38.
- [11]Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* 2012;379:895–904.
- [12]Li TS, Cheng K, Malliaras K, Smith RR, Zhang Y, Sun B et al. Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:942–53.
- [13]Bonios M, Terrovitis J, Chang CY, Engles JM, Higuchi T, Lautamäki R et al. Myocardial substrate and route of administration determine acute cardiac retention and lung bio-distribution of cardiosphere-derived cells. *J Nucl Cardiol* 2011;18:443–50.
- [14]Hoashi T, Matsumiya G, Miyagawa S, Ichikawa H, Ueno T, Ono M et al. Skeletal myoblast sheet transplantation improves the diastolic function of a pressure-overloaded right heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;138: 460–7.
- [15]Yoshikawa Y, Miyagawa S, Toda K, Saito A, Sakata Y, Sawa Y. Myocardial regenerative therapy using a scaffold-free skeletal-muscle-derived cell sheet in patients with dilated cardiomyopathy even under a left ventricular assist device: a safety and feasibility study. *Surg Today* 2018;48: 200–10.

- [16] Hosoyama T, Samura M, Kudo T, Nishimoto A, Ueno K, Murata T et al. Cardiosphere-derived cell sheet primed with hypoxia improves left ventricular function of chronically infarcted heart. *Am J Transl Res* 2015;7: 2738–51.
- [17] Nakamura T, Hosoyama T, Kawamura D, Takeuchi Y, Tanaka Y, Samura M et al. Influence of ageing on the quantity and quality of human cardiac stem cells. *Sci Rep* 2016;6:22781.
- [18] Morrissey PJ, Murphy KR, Daley JM, Schofield L, Turan NN, Arunachalam K et al. A novel method of standardized myocardial infarction in aged rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2017;312:959–67.
- [19] Nakamura T, Hosoyama T, Murakami J, Samura M, Ueno K, Kurazumi H et al. Age-related increase in Wnt inhibitor causes a senescence-like phenotype in human cardiac stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;487:653–9.
- [20] Mizoguchi T, Ueno K, Takeuchi Y, Samura M, Suzuki R, Murata T et al. Treatment of cutaneous ulcers with multilayered mixed sheets of autologous fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells. *Cell Physiol Biochem* 2018;47:201–11.
- [21] Tanaka Y, Shirasawa B, Takeuchi Y, Kawamura D, Nakamura T, Samura M et al. Autologous preconditioned mesenchymal stem cell sheets improve left ventricular function in a rabbit old myocardial infarction model. *Am J Transl Res* 2016;8:2222–33.
- [22] Lee BH, Kim WH, Choi MJ, Rho JR, Kim WG. Chronic heart failure model in rabbits based on the concept of the bifurcation/trifurcation coronary artery branching pattern. *Artif Organs* 2002;26:360–5.
- [23] Rajendran Nair DS, Karunakaran J, Nair RR. Differential response of human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to hypoxia-reoxygenation injury. *Mol Cell Biochem* 2017;425:139–53.
- [24] Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* 2007;115: 896–908.

- [25]Ingason AB, Goldstone AB, Paulsen MJ, Thakore AD, Truong VN, Edwards BB et al. Angiogenesis precedes cardiomyocyte migration in regenerating mammalian hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2018;155:1001118–27.
- [26]Tseliou E, de Couto G, Terrovitis J, Sun B, Weixin L, Marba'n L et al. Angiogenesis, cardiomyocyte proliferation and anti-fibrotic effects underlie structural preservation post-infarction by intramyocardially injected cardiospheres. *PLoS One* 2014;9:e88590.
- [27]Laflamme MA, Murry CE. Heart regeneration. *Nature* 2011;473:326–35.
- [28]Michelis KC, Boehm M, Kovacic JC. New vessel formation in the context of cardiomyocyte regeneration—the role and importance of an adequate perfusing vasculature. *Stem Cell Res* 2014;13:666–82.

本論文は、下記論文を和訳したものであり、下記論文のデータを引用している。
 Hypoxic-conditioned cardiosphere-derived cell sheet transplantation for chronic myocardial infarction, Akira Fujita, Koji Ueno, Toshiro Saito, Masashi Yanagihara, Hiroshi Kurazumi, Ryo Suzuki, Akihito Mikamo and Kimikazu Hamano, *European journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2019
 Epub ahead of print, <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezz122>

10. サプリメント

サプリメントテーブル 1

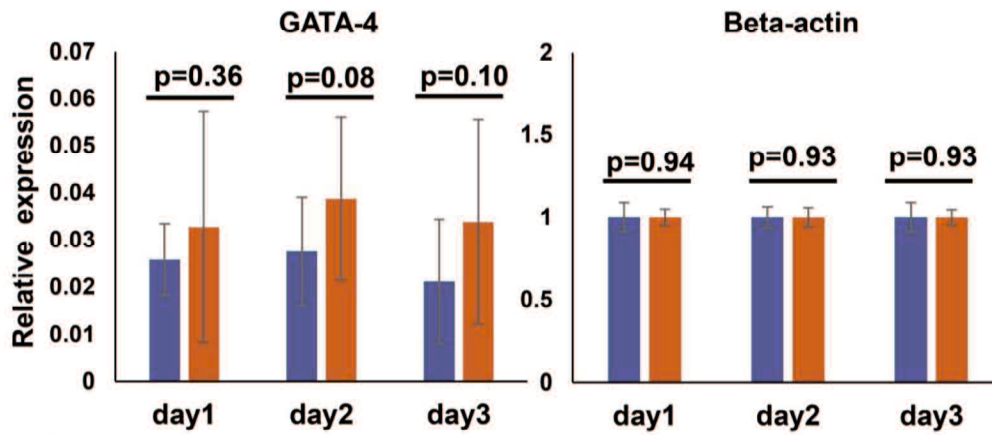
Products	Final concentration
IMDM (Thermo Fisher Scientific)	35%
DMEM/F12(Thermo Fisher Scientific)	65%
FBS (Thermo Fisher Scientific)	3.5%
Penicillin-Streptomycin (Thermo Fisher Scientific)	1%
L-Glutamine (Thermo Fisher Scientific)	1 mM
Thrombin (Sigma-Aldrich)	1 unit/ml
B-27 supplement x50(Thermo Fisher Scientific)	x1
bFGF (Sigma-Aldrich)	80 ng/ml
EGF (Sigma-Aldrich)	25 ng/ml
Cardiotropin-1 (Sigma-Aldrich)	4 ng/ml

Heparin (Sigma-Aldrich)		5 µg/ml
Gene name	Forward	Reverse
VEGF	gccttgcccttgctgctctac	cgtgggggtttattgtctccttc
FGF	gggggtttcttctgcgtatc	atgtgtgggtcgctcttctc
EGF	atggttcccaacgagaaagg	ccaatccagtcacagcaag
IGF-1	cccaattattaagtgtgcttttg	agagatgcgaggaggacagg
HGF	cggaatcccgacgatga	tcacaacgagcaagaggacaa
HIF1- α	gatgcttgccaaaagaggtg	ctgcggtgagagtcttgg
Angiopoietin-1	cttacaggaggttggtggttg	ttcagttgcccgtggtttg
Angiopoietin-2	ggaggtggtggttgatg	ttgtgtctgcctttgtggatag
CD31	aacacagcaagccacagacc	gcgtgctctcttcagacc
MMP-2	gtgtcttcccccttcaccttc	gcaccacatcttgccatcac
MMP-3	aatggacaaaggatacaacaggaac	aatggacaaaggatacaacaggaac
BMP-10	caaggagcggaaggaggaac	gaaaagccatccaagctgtc
Akt-1	cccaacaccttcgctcatcc	cactctcccgcctctct
Akt-2	tgctgaggagatggaagtgg	cccaggagtttgatagtcgaag
Endoglin	cgtcccagacaccatcc	ctccacgaaggacgcaac
GATA4	gaaaagccatccacgctgtc	gagaacgtctgggacatggag
β -actin	gccgcgtcctcctcctc	tcgttgccgatggtgatg

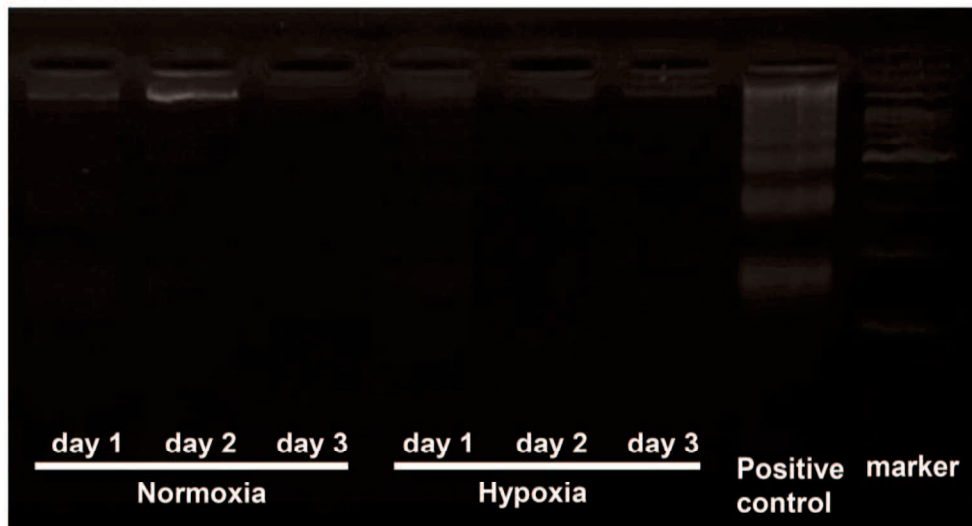
サプリメントテーブル 2

サブリメント図 1

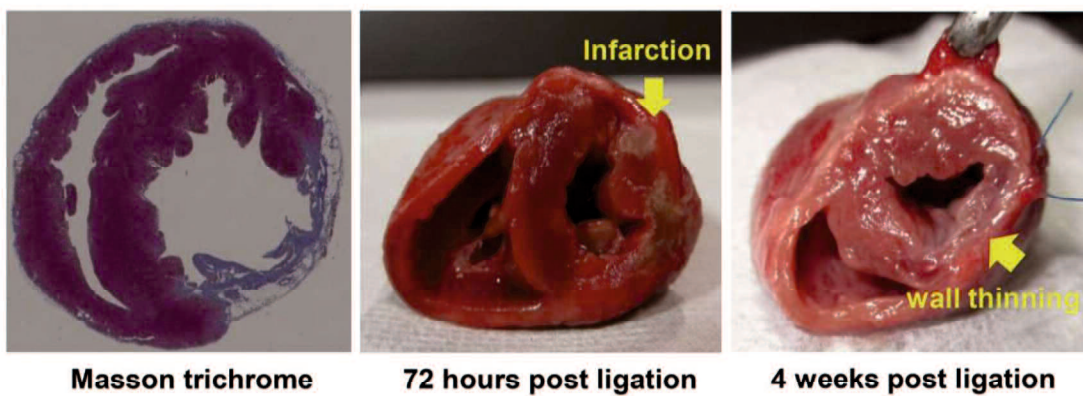
A. qPCR(n=4)



B. DNA ladder

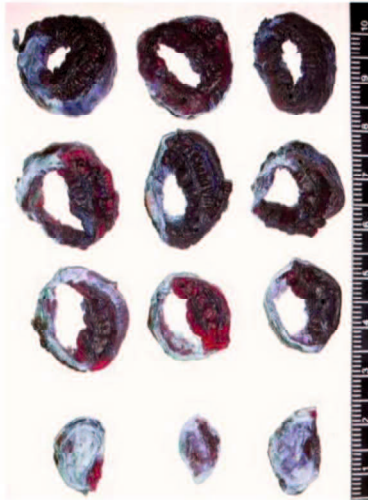


C. Infarction model

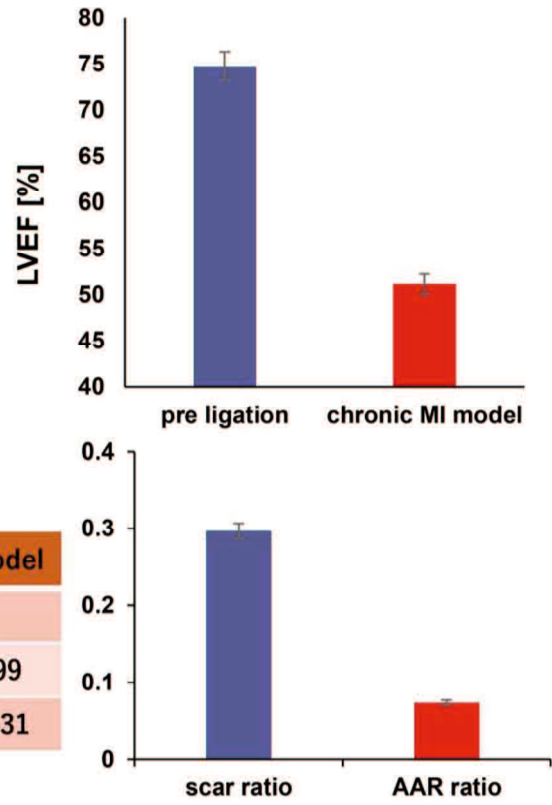


サブプリメント図 2

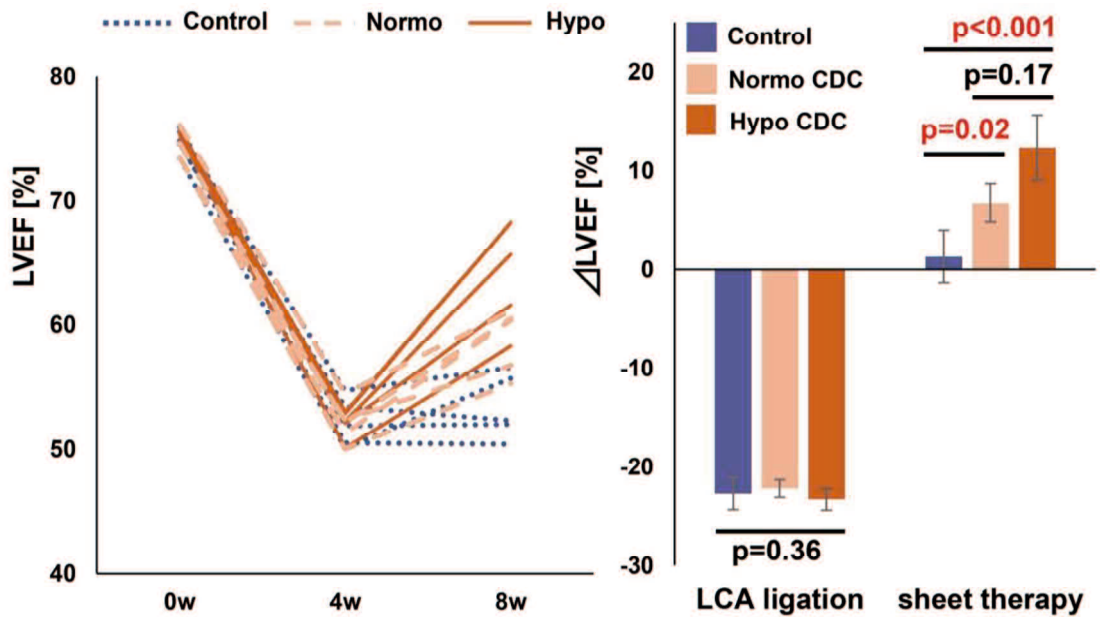
Infarction model (n=3)



	pre ligation	chronic MI model
LVEF(%)	74.8 ± 1.55	51.2 ± 1.1
Scar ratio	-	0.297 ± 0.0099
AAR ratio	-	0.0739 ± 0.0031

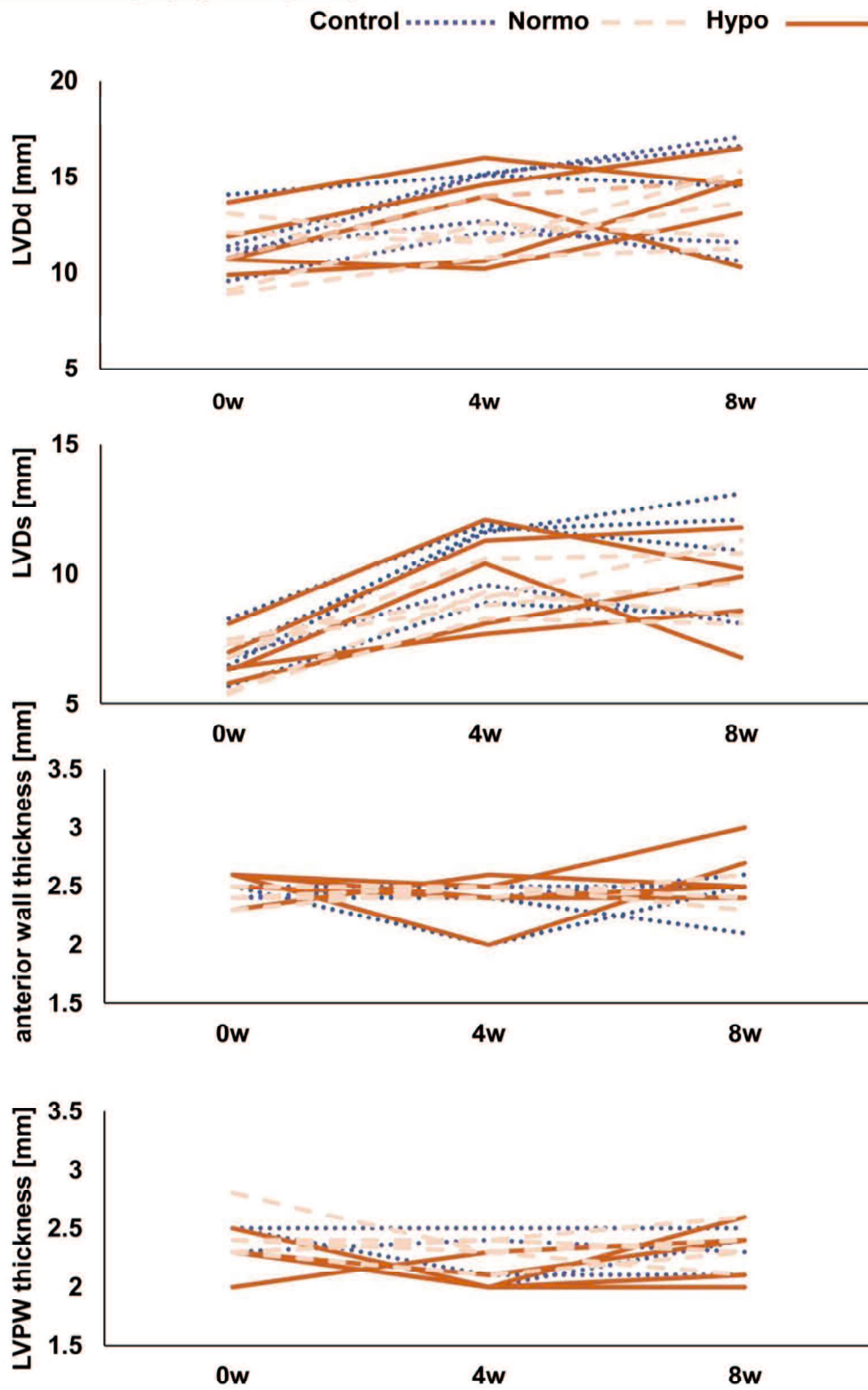


Echocardiography data (n=15)



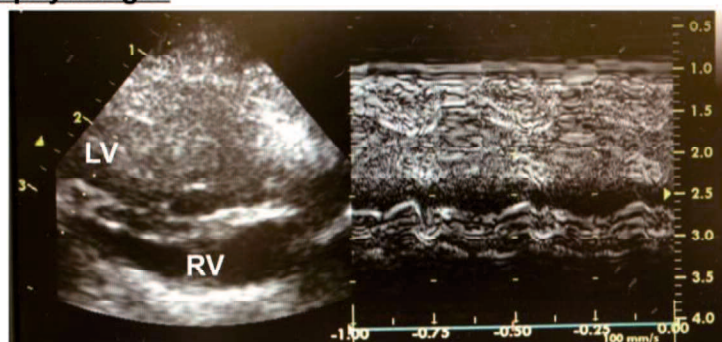
サブリメント図 3

Echocardiography data (n=15)

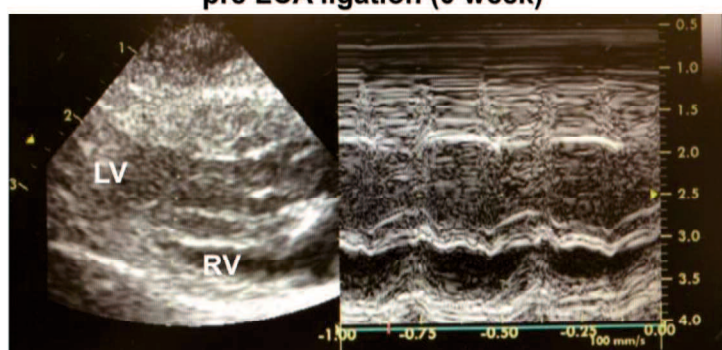


サブプリメント図 4

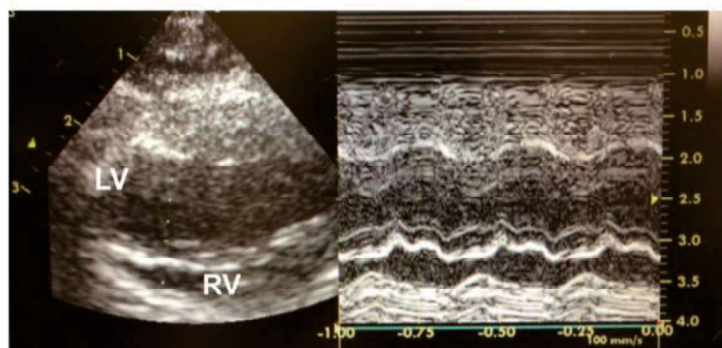
Echocardiography images



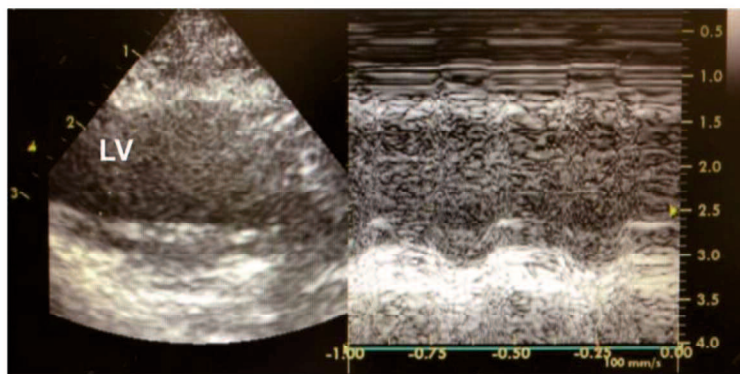
pre LCA ligation (0 week)



post LCA ligation (4 weeks after ligation, chronic MI model)



post CDC therapy (8 weeks after ligation)



control (8 weeks after ligation)