

# 主論文

## Impact of Cardiac Progenitor Cells on Heart Failure and Survival in Single Ventricle Congenital Heart Disease

(小児単心室症における心不全と生存率に対する心筋前駆細胞の効果)

### 【緒言】

機能的単心室症は先天性心疾患の中でも死亡率の高い疾患であり、段階的手術を経ても長期的な心不全、合併症のリスクは依然として残っている。2001年に心臓内幹細胞が発見され、心臓内幹細胞移植により心筋線維化領域の縮小と心機能の改善効果が報告されているが、これまで機能的単心室症に対する報告はほとんどない。当院では2011年から機能的単心室症を対象に心臓内幹細胞(cardiosphere-derived cells: CDCs)を用いた自家移植療法を行っており、移植後1年での安全性と心機能改善を認めた。今回は冠動脈内細胞注入における安全性と治療有効性に関して細胞移植後2年間の追跡調査を報告する。

### 【材料と方法】

#### 細胞移植群と非移植群との比較

2011年1月から2015年3月にかけて、前向き第1相臨床研究(TICAP試験)ならびにランダム化第2相臨床研究(PERSEUS試験)を行い、機能的単心室症48症例(2.8±1.4歳)を対象にCDCsを用いた細胞移植療法を登録実施した。方法として外科的修復手術時に右心房よりCDCsを分離培養し、24症例では手術後1ヶ月目に冠動脈注入にて心臓内幹細胞移植( $3.0 \times 10^5$ 個/kg)を行った。非移植群の24症例のうち、17症例では手術後4ヶ月目に細胞移植を行った。また同期間内において、当院で手術した機能的単心室症のうち、非移植群の連続60症例(標準手術単独群)とも比較し、安全性・有効性に関する後ろ向きコホート調査を行なった。

#### 動物実験

4週齢のメスSDRに対し、胸骨正中切開の上で20G針の径となるように肺動脈を絞扼し、右心不全モデルを作成した。肺動脈絞扼後4週でラットを心機能別に分け、EF $\geq$ 40%をHFpEF(Heart failure with preserved ejection fraction)、EF $<$ 40%をHFrEF(Heart failure with reduced ejection fraction)と定義した。上行大動脈経路で計 $3.0 \times 10^5$ 個/kgのCDCsを投与(CDC群)またはmediumのみを投与(control群)し、心機能の改善を比較した。

組織染色ではPicroSirius red染色とH&E染色を行い、治療後4週間でのCDC群、control群、sham群の繊維化の程度を評価し、細胞治療効果を判定した。

遺伝子発現解析では心筋組織からcDNAを抽出し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)にて遺伝子発現解析を行った。マーカーとしては心肥大マーカー(NPPA)、繊維化リモデリングマーカー(Col1A2、Col3A1、MMP2/9)、炎症マーカー(IL-6)を用いた。

### 【結果】

細胞移植群では非移植群に比べ、移植後3ヶ月目において、心駆出率(P $<$ 0.01)及び心筋局所壁運動

の指標であるcircumferential strainのいずれも有意に改善を認めた(P=0.049)。合計41症例の細胞移植群において、移植後30日間での有害事象を認めず、2年間における腫瘍形成症例も認めなかった。後ろ向きコホート調査を行い、非移植群の連続60症例と比較すると、移植後2年において細胞移植群では術後合併症を有意に回避できたが(P=0.01)、総死亡数においては有意な減少は認めなかった。また単心室の段階的手術別に比較すると、Stage2、Stage3のどちらにおいても細胞移植群で心駆出率の改善(Stage2: P=0.03, Stage3: P<0.01)と小児心不全の特徴である身体発育障害の改善(Stage2、Stage3: P<0.01)を認め、小児心不全の指標として用いられるNYUPHFI(New York University Pediatric Heart Failure Index)においても、Stage2、Stage3ともに細胞移植群で有意に改善を認めた(P<0.01)。

重回帰分析を用いて心臓内幹細胞自家移植における治療有効性を評価すると、移植前の心駆出率が保たれていない群(HFrEF群)で細胞移植による心機能改善率が高いことが示された(P=0.02)。さらに、HFrEF群では非移植群と比較して細胞移植により心駆出率の改善のみでなく、死亡回避率(P=0.04)、合併症回避率(P=0.046)の改善も認め、細胞治療効果が顕著に認められた。一方、移植前の心駆出率が保たれている群(HFpEF群)では、非移植群と比較し心駆出率の改善効果は高いが(P=0.04)、死亡回避率、合併症回避率では有意差を認めなかった。

小児単心室症に対する心臓内幹細胞自家移植療法後の治療効果をさらに評価するため、右心不全ラットモデルを用いてHFpEF群、HFrEF群における細胞移植による病態を比較した。HFpEF群においては細胞治療による心機能改善効果は軽度であったが、control群と比較すると心筋elastanceの有意な改善を認めた。HFrEF群では、細胞治療群で心機能改善を認め、end-systolic volumeの減少、心拍出量の増加など、control群と比べ、細胞治療効果は顕著であった。右心不全ラットモデルにおける繊維化心筋を比較すると、HFpEF群、HFrEF群でともに繊維化心筋の減少、炎症・繊維化リモデリングマーカーの減少を認め、特にHFpEF群で顕著であった。

#### 【考察】

我々が行ってきた小児機能的単心室症に対する心臓内自家移植療法は、移植後1年での安全性と有効性を示してきた。TICAP試験では移植後3年での有効性維持効果を示したが、左心低形成患者における合計14名での比較であり、小規模の報告でしかなかった。今回合計101人でのコホート研究を行い、平均38ヶ月の追跡による小児機能的単心室症細胞移植効果を検討することで、CDCs移植による治療効果を心機能のみでなく、死亡率、合併症回避率の側面でも比較しえた。

Stage2で細胞移植を行った症例では、観察期間中にStage3の手術へと達しえた症例は細胞治療群、非移植群で有意差はなかった。だが、細胞治療群では心機能、身体発育障害の改善を認めており、Stage3手術後の血行動態はよりよいものになると考えらえる。

機能的単心室症というのは異なる疾患群から成り立っているため、細胞治療の効果がどのような因子によって規定されるのか重回帰分析を用いて調査したところ、移植前の心機能に起因することが判明した。そのためHFpEF群とHFrEF群に分けて細胞移植の効果を検討したところ、HFrEF群では細胞移植後の観察期間内で死亡例はなく、非移植群と比較しても死亡回避率、合併症回避率の有意な改

善を認めた。HFpEF群では心機能、身体発育障害の改善は認めたが、死亡回避率、合併症回避率では細胞移植群と非移植群との間に有意差は認めなかった。細胞移植群では観察期間内に3例の死亡を認めたが、1例は突然死であった。2例はStage2で細胞移植を行なった症例であり、Stage3の手術後の人工血管内血栓を認め、循環不全のため亡くなった。

成人におけるHFpEFの血行動態に関する報告は多いが、小児単心室症におけるHFpEFの報告はまだ報告されていない。また、HFpEFに対して死亡率を改善する有効な治療も認められていないのが現状である。Angiotensin-converting enzyme inhibitorやmineralocorticoid receptor antagonistによる薬物治療が有効であるというretrospectiveな研究も認められるが、未だ先天性心疾患におけるHFpEFに対する有効な治療報告は認められていない。心臓内幹細胞治療では、死亡率には影響はなかったが、control群と比較し心機能の改善を認め、NYUPHFIや発育障害の改善も同様に認めた。小児単心室症のHFpEF群における細胞治療効果のメカニズムを検討するため、動物実験を行ったところ、細胞治療を行うことで抗炎症作用や繊維化改善作用が起り、心筋elastanceや繊維化心筋の改善が見られるのではないかと思われた。今回の結果は、肥大大心筋や虚血心筋でもCDCs投与により拡張能を改善するという報告と一致する。また、動物実験でcontrol群のHFpEF群とHFrEF群を比較すると、HFpEF群の方がCol3A1など繊維化マーカーも発現が多く、HFpEF、HFrEFによる心筋繊維化の程度が異なることが示唆された。両心不全群における繊維化心筋の差がどのようにして生じるのかは解明できていないが、両軍ともに細胞治療による繊維化心筋の有意な減少を認めた。近年ではT1 mappingによる心臓MRIにより繊維化心筋の程度がわかることも報告されており、単心室症や細胞治療による繊維化改善を継時的に評価することも可能となった。

最後に合併症回避率に対してCox回帰分析を行い、リスク因子を検討したところ、NYUPHFIが高い、つまり術前の心不全が強い症例は高率で合併症をきたすことがわかった。だが、何よりも重要なのは、細胞移植を行うことで、合併症のリスクを0.4倍へと減らせることであり、やはり細胞移植による治療効果は心機能のみでなく、死亡回避率、合併症回避率にも寄与していることが示唆された。

#### 【結語】

機能的単心室症を対象とした心臓内幹細胞自家移植の第1/2相臨床研究では合計41症例に対し冠動脈内に幹細胞注入を安全に実施でき、長期的に造腫瘍作用を認めなかった。また、2年間の追跡調査において、非移植群である標準手術単独の連続60症例と比較し、細胞移植群では心不全死や心血管イベントの回避ならびに身体発育障害と心機能の有意な改善を認めた。術前の心機能が細胞治療効果の予測因子となり、HFpEF群、HFrEF群のどちらでもCDCs投与による細胞治療効果は認めるが、死亡回避率や合併症回避率はHFrEF群でより改善を認め、HFpEF群ではcontrol群と比較し有意差を認めなかった。今後より長期の調査を行うことで小児単心室症におけるこの両群間の治療効果の差が明らかになるものと思われる。