

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08401

研究課題名(和文) 筋肉細胞の細胞-細胞外基質間相互作用を利用した新しい重症心不全治療法の開発

研究課題名(英文) Degenerative therapy for heart failure using skeletal muscle cell-extracellular matrix interaction.

研究代表者

河口 直正 (Kawaguchi, Naomasa)

大阪大学・医学系研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号：70224748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：重症心不全心に対する筋芽細胞(M)移植により不全心の心機能が改善される。本研究では、筋芽細胞の細胞-細胞外基質間相互作用を利用した新しい心不全治療法の開発を目的とした。筋芽細胞の接着分子である α -ディストログリカンのリガンドであるラミニン211を恒常分泌する線維芽細胞(LF)を作製し、LFとMを虚血性心筋症ラットの心臓に同時移植した。心不全心へのLFとM同時移植により、移植されたMのhost心筋での生存率が有意に上昇し、心機能の改善と心筋リモデリングの抑制が見られた。ラミニン211分泌線維芽細胞と筋芽細胞の同時移植法は、重症心不全の新しい治療法となることが示された。

研究成果の概要(英文)：Skeletal myoblast sheet transplantation, a method used for treating failing hearts, results in the secretion of cytokines that improve heart function. Enhancing the survival rate of implanted myoblasts should lead to more continuous and effective therapies. We hypothesized that laminin 211, which binds to α -dystroglycan on muscle cells, could inhibit dropout of implanted myoblasts from host myocardia. Laminin 211 expressed-fibroblasts and skeletal myoblasts multi-layered sheet were transplanted for an ischemic cardiomyopathy model rat. Laminin 211 secreted by implanted fibroblasts inhibited the dropout of implanted myoblasts from grafted myocardia, resulting in more permanent therapeutic effects upon myoblast sheet transplantation. This approach using laminin 211 could have been expected the application for the cell-based transplantation such as cardiomyocyte derived from induced pluripotent stem cells.

研究分野：心臓血管病理学

キーワード：再生医学

1. 研究開始当初の背景

現在では、重症心不全に対する唯一の治療法である心臓移植も本邦では、移植登録から平均約 1079 日の期間の待機を余儀なくされる状態にあり、実際には長い待機期間をブリッジとして左室補助人工心臓(LVAD)を装着して待機することがほとんどである。このような現状の中、心臓移植、LVAD に代わる新たな治療法として、筋芽細胞等を心臓に移植する心筋再生療法の研究が行われている。

我々は、組織工学技術を応用した温度応答性培養皿を使った筋芽細胞シート移植を手がけ、心不全心に対する筋芽細胞シート移植法は、心機能改善効果が期待できる次世代の重症心不全治療法であることを示してきた。

しかし、筋芽細胞シート移植法による心機能改善効果は長期間持続しないことが欠点である。これは、移植した筋芽細胞の生存率が低いことが原因と考えられる。そのため、移植する筋芽細胞の host 心臓に対する接着性を高め、移植された筋芽細胞の微小環境を改善し生着率を向上させる方法を開発する必要がある。

2. 研究の目的

生体内では、細胞は細胞外基質に囲まれて存在し細胞外基質との相互作用により機能を発揮している。筋肉細胞は細胞-細胞外基質間接着分子である α -1-デキストログリカン(α -1-DG) を介して基底膜を構成する成分の細胞外基質であるラミニン 211 と接着している。ラミニン 211 は、 α -1-DG との接着を介して筋肉細胞の機能維持に必要なシグナルを伝達することが知られている。このラミニン 211 と α -1-DG との接着不全により筋肉細胞の変性や壊死、細胞機能障害が起きる。ラミニン 211 と α -1-DG の接着障害による疾患として筋ジストロフィー (α -1-デキストログリカン症) が知られている。筋芽細胞シートの移植は、host 不全心の表面 (心外膜側) に行われる。しかし、host 心臓の表面に基底膜、すなわちラミニン 211 は存在していないため、移植した筋芽細胞の接着分子である α -1-DG と host 心臓のラミニン 211 との間に接着障害が生じていると考えられる。

本研究は、筋芽細胞の細胞-細胞外基質間接着分子の α -1-DG のリガンドであるラミニン 211 を恒常分泌する線維芽細胞を作製し、ラミニン 211 分泌線維芽細胞シートと筋芽細胞シートを重症心不全に同時移植し host 心臓への筋芽細胞の接着性を向上させ、生着率を高めることにより、移植した筋芽細胞シートで得られた心機能改善効果を増強させ、その効果を長期間維持する心不全治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1)ラミニン 211 分泌線維芽細胞の作製

ヒト心筋細胞の cDNA を用いてラミニン 211 における α -1-DG の結合部位である α 2 鎖

LG4-5 の DNA 断片を作製し、発現・分泌ベクターである pSecTag2B に α 2 鎖 LG4-5 を組み込んだ。この LG4-5/pSecTag2B をリポフェクション法によりラット皮膚線維芽細胞に導入しラミニン 211(LG)分泌線維芽細胞を作製した。

(2) 分泌 LG と α -1-DG とログリカンとの結合性の検討

マウス筋芽細胞 (C2C12) の細胞溶解液と wheat germ agglutinin (WGA) アガロースビーズを混和し、WGA アガロースビーズに結合した α -1-DG を N-アセチルグルコサミンを用いて溶出・精製した。精製した α -1-DG と LG 分泌線維芽細胞の培養上清を反応させた。その後、抗 LG4-5 抗体を結合した protein G-アガロースビーズを用いて LG と α -1-DG の結合体を溶出した。この溶出液を抗 α -1-DG を用いてウエスタン・ブロットを行った。

(3)ラット筋芽細胞および成獣ラット心筋細胞の単離と細胞接着実験

筋芽細胞は、3 週齢、雄性の Lewis ラットの前脛骨筋より単離・採取した。成獣心筋細胞は、8 週齢オスの Wistar ラットの心臓より単離・採取した。細胞接着実験に用いた溶液は 3% ウシ血清アルブミン (BSA) (陰性コントロール)、5 μ g/mL laminin (陽性コントロール)、LG 分泌線維芽細胞培養上清液、線維芽細胞培養上清液、細胞培養液 (筋芽細胞; 0.1% FCS 含有 DMEM 培養液、心筋細胞; 0.1% FCS 含有 M199 培養液)、心筋細胞単離用灌流 buffer の 5 種を用いた。各溶液でコートした培養皿に筋芽細胞 (1.0×10^6 個) および心筋細胞 (1.0×10^7 個) の細胞浮遊液をそれぞれ添加し、2 時間インキュベートした。その後、洗浄し接着細胞を 40 倍の顕微鏡下で計数した。

(4) 虚血性心筋症モデルラットの作製および細胞シートの作製

8 週齢、雌性のヌードラット (F344/NJcl-mu/mu) を気管内挿管後、イソフルラン麻酔下で開心し、左冠動脈前下行枝を結紮することにより、虚血性心筋症モデルラットを作製した。結紮 2 週間後に再度、全身麻酔下で左開胸にて細胞シートを左室前壁の梗塞領域に移植した。LG 分泌線維芽細胞、線維芽細胞および単離筋芽細胞をそれぞれ 3×10^6 個を温度応答性培養皿に播種し細胞シートを作製した。

(5) LG 分泌線維芽細胞と同時移植することによる筋芽細胞の host 心臓における生着率の検討

虚血性心筋症モデルラットを筋芽細胞シートのみ移植した群 (SMB 群、n=5)、筋芽細胞シートと線維芽細胞シートを移植した群 (SMB+NF 群、n=5)、筋芽細胞シートと LG 分泌線維芽細胞シートを移植した群

(SMB+LGF 群、n=5)の3群に分けた。筋芽細胞移植後1、2および4週後に心臓を摘出した。摘出した心臓の梗塞領域における移植した筋芽細胞の生着率を骨格筋細胞に特異的に発現しているネブリン(nebulin)を指標として定量PCRで評価した。

(6)移植筋芽細胞からの成長因子の定量

筋芽細胞移植後1、2および4週後に摘出した心臓の左室梗塞領域における心筋組織中のインスリン様成長因子、肝細胞増殖因子および血管内皮細胞増殖因子をELISA法により測定した。

(7)LG分泌線維芽細胞と筋芽細胞を虚血性心筋症モデルラット心に同時移植することによる心機能改善効果の検討

ヌードラット(F344/NJcl-mu/m;8週齢、雌性)の左冠状動脈前下行枝を結紮し虚血性心筋症を作製した。結紮2週間後に再度左開胸にて細胞シートを左室前壁の梗塞領域に移植した。実験群は、梗塞のみの群(C群、n=5)、筋芽細胞シート単体での移植群(SMB群、n=5)、筋芽細胞シートに加えてnormalの線維芽細胞シートを移植した群(SMB+NF群、n=5)、筋芽細胞シートに加えてLG分泌線維芽細胞シートを移植した群(SMB+LGF群、n=5)の4群に分けた。

心機能評価

心エコーにて細胞シート移植後2週、4週、6週、8週に左室収縮率、左室内径短縮率、左室断面積(拡張末期内腔面積、収縮末期内腔面積)を計測した。これらの値より、左室駆出率、左室内径短縮率を算出した。

左室心筋リモデリング抑制効果の検討

細胞シート移植8週(各群n=5)後に犠牲死せしめ、心臓を摘出しヘマトキシリン・エオジン染色、マッソン染色、シリウス赤染色、PAS染色を行い、梗塞近傍領域における心筋線維化(シリウス赤染色)、心筋細胞横径(PAS染色)、左室自由壁厚および左室腔直径(マッソン染色)を計測し、心筋リモデリング抑制効果を検討した。また、抗平滑筋アクチン抗体を用いた免疫染色を行い、毛細血管数を計測した。

アポトーシス抑制効果の検討

細胞シート移植8週(各群n=5)後の梗塞部および梗塞境界部でのアポトーシスの進行により生じるPoly ADP ribose polymerase(PARP)の分解産物であるcleaved PARPの発現をウエスタン・プロット法によりアポトーシスの抑制効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 作製したラミニン211(LG)分泌線維芽細胞からのLG分泌確認および分泌LGと

ディスとログリカン(-DG)との結合性の検討

作製したLG分泌線維芽細胞の培養上清を抗LG抗体を用いてウエスタンプロットを行った。その結果、LGに対する特異的バンドを認め、遺伝子導入したLGがLG分泌線維芽細胞より分泌されていることを確認した。

そして精製した-DGと分泌されたLGを反応後に抗LG4-5抗体を結合させたProtein G-アガロースビーズにより溶出した液を抗-DG抗体でウエスタンプロットを行った結果、バンドが認められ、分泌LGは-DGと結合することが確認できた。

(2) ラット筋芽細胞および成獣ラット心筋細胞の単離と細胞接着実験

筋芽細胞では、LG分泌線維芽細胞の培養上清液および陽性コントロールのlaminin溶液で細胞接着が高値であった。さらに、DMEM培養液、線維芽細胞の培養上清液でも、陰性コントロールの3%BSA溶液と比較すると高い細胞接着がみられた。心筋細胞では、LG分泌線維芽細胞の培養上清液および陽性コントロールのlaminin溶液で高い細胞接着がみられた。線維芽細胞培養上清液、M199培養液、単離用還流bufferでは細胞接着はみられなかった。

(3) LG分泌線維芽細胞と同時移植することによる筋芽細胞のhost心臓における生着率の検討

SMB群では細胞シート移植1、2、4週後と経過を追うごとにネブリンのmRNA量が低下した。細胞シート移植1週後でのネブリンのmRNA量は、SMB+NF群、SMB+LGF群でSMB群と比較し有意に高かった。細胞シート移植2および4週後では、SMB群およびSMB+NF群と比較してSMB+LGF群でネブリンのmRNA量が有意に高値であった。このことより、LG分泌線維芽細胞と筋芽細胞の同時移植群でhost心臓における移植した筋芽細胞の生着率が上昇した。

(4)移植筋芽細胞からの成長因子の定量

梗塞部における心筋組織中のインスリン様成長因子、肝細胞増殖因子および血管内皮細胞増殖因子は、細胞シート移植1および2週間までは、SMB+LGF群でSMB群、SMB+NF群と比較して有意に高値であった。しかし、細胞シート移植4週間後では、3群の間に有意な差はみられなかった。

(5)LG分泌線維芽細胞と筋芽細胞を虚血性心筋症モデルラット心に同時移植することによる心機能改善効果の検討

心機能評価

左室駆出率および左室内径短縮率共に、SMB+LGF群で細胞シート移植2週から8週間後までC群、SMB群およびSMB+NF

群に比較して有意に高値であった。これより、LG 分泌線維芽細胞と筋芽細胞の同時移植により長期間の心機能改善と増強強化を認めた。

細胞シート移植 8 週後の左室心筋リモデリング抑制効果の検討

SMB+LGF 群で C 群、SMB 群および SMB+NF 群に比較し左心室腔の拡張が有意に抑制されていた。SMB+LGF 群の梗塞境界領域における心筋細胞横径は、C 群、SMB 群および SMB+NF 群に比較して有意に小さく心筋細胞肥大が抑制されていた。梗塞境界領域における心筋線維化についても SMB+LGF 群で、C 群、SMB 群および SMB+NF 群に比較して有意に低値であった。梗塞境界領域における毛細血管数については、SMB 群、SMB+NF 群および SMB+LGF 群で C 群に比較して増加していた。しかし、3 群の間に有意な差はみられなかった。

アポトーシス抑制効果の検討

梗塞領域での cleaved PARP の発現は、4 群間で有意な差は認められなかった。しかし、梗塞境界領域では、C 群、SMB 群および SMB+NF 群に比較し SMB+LGF 群で cleaved-PARP の発現低下が見られアポトーシスの抑制が認められた。

以上の結果より、ラミニン 211 分泌線維芽細胞シートと筋芽細胞シートを同時に心不全心に移植することにより移植した筋芽細胞の host 心不全心への生着率が筋芽細胞シート単独移植に比較して有意に向上することが示された。この生着率の上昇により、移植された筋芽細胞からの成長因子分泌量が増強されことにより、左室心筋リモデリングの抑制作用が増強され長期間の心機能改善効果が得られたと考えられる。

虚血性心筋症等の重症心不全心に対してラミニン 211 分泌線維芽細胞シートを筋芽細胞シートと同時に移植する治療法は、重症心不全の新しい治療法となることが示された。また、この方法は、重症心不全に対する心筋再生療法に利用され ES 細胞由来心筋や iPS 由来心筋細胞にも利用可能になると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Uchinaka A, Hamada Y, Mori S, Miyagawa S, Saito A, Sawa Y, Matsuura N, Yamamoto H, Kawaguchi N, SVVYGLR motif of the thrombin-cleaved N-terminal osteopontin fragment enhances the synthesis of collagen type III in myocardial fibrosis. Mol. Cell Biochem. 査読有 408:

191-203, 2015

DOI: 10.1007/s11010-015-2495-y

Mizuno Y, Uchinaka A, Horii Y, Mori S, Hamada Y, Miyagawa S, Saito A, Sawa Y, Matsuura N, Kawaguchi N, Improvement of cardiac function after implanting osteopontin-derived peptide SVVYGLR in a hamster model of dilated cardiomyopathy. Interact Cardiovasc. Thorac. Surg. 査読有 21 :506-514, 2015

DOI: 10.1093/icvts/ivv197

Uchinaka A, Yoshida M, Tanaka K, Hamada Y, Mori S, Maeno Y, Miyagawa S, Sawa Y, Nagata K, Yamamoto H, Kawaguchi N, Overexpression of collagen type III in injured myocardium prevents cardiac systolic dysfunction by changing the balance of collagen distribution. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 査読有 2018, Feb21(Epub ahead of print)

DOI: 10.1016/j.jtcvs.2018.01.097

[学会発表](計 1 件)

Uchinaka A, Hamada Y, Mori S, Matsuura N, Kawaguchi N: Improvement effects on cardiac function after osteopontin-derived SVVYGLR peptide-secreting myoblast sheets transplantation for ischemic cardiomyopathy. International Academy of Cardiology Annual Scientific Sessions 2015 20th World Congress on Heart Disease, Vancouver (Canada), July. 25-27, 2015

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河口 直正 (KAWAGUCHI, Naomasa)
大阪大学・医学系研究科・特任准教授
研究者番号：70224748

(2) 研究分担者

濱田 吉之輔 (HAMADA, Yoshinosuke)
大阪大学・医学系研究科・特任准教授
研究者番号：10362683

内仲 彩子 (UCHINAKA, Ayako)
名古屋大学・医学系研究科・助教
研究者番号：40746921

松浦 成昭 (MATSUURA, Nariaki)
大阪大学・医学系研究科・特任教授
研究者番号：70190402

森 誠司 (MORI, Seiji)
大阪大学・医学系研究科・招へい教授
研究者番号：90467506

(3) 連携研究者

宮川 繁 (MIYAGAWA, Shigeru)
大阪大学・医学系研究科・特任教授
研究者番号：70544237

(4) 研究協力者

()