

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10218

研究課題名(和文) 機能賦活化した心筋幹細胞シートによる重症心不全治療

研究課題名(英文) Activated cardiosphere-derived cell sheet therapy improves left ventricular function of old infarcted heart

研究代表者

美甘 章仁 (MIKAMO, Akihito)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30372709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では低酸素プレコンディショニング法(HPC法)を用いた心筋幹細胞(Cardiosphere-derived cells: CDCs)シートのマウス陳旧性心筋梗塞モデルにおける治療効果を検討した。CDCsシートは、VEGFをはじめとする成長因子の産生を介したパラクライン効果で、梗塞境界領域における、血管新生の増加をもたらし、梗塞領域の縮小効果を認め、心エコー上も左室駆出率の改善を認めた。CDCsシート治療の効果は、HPC法により増強した。HPC法は簡便にCDCsシート機能賦活化が可能であり、HPC法を併用したCDCsシート治療は虚血性心疾患における治療法として有効な可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of cardiac stem cell (Cardiosphere-derived cells: CDCs) sheet using the hypoxic preconditioning (HPC) on the mouse old myocardial infarction model. The CDCs sheet was suggested to have a paracrine effect via the production of growth factors including VEGF. The paracrine effect resulted in an increase in angiogenesis in the border area of myocardial infarction. This effect also shows the improvement of the wall motion of the mice hearts in echocardiography, and the reduction effect of the infarct region. The effect of CDCs sheet treatment was enhanced by HPC. The HPC can easily activate the CDCs sheet function, suggesting the possibility that CDCs sheet treatment with HPC may be effective for ischemic heart disease.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：再生医療 細胞移植 心筋幹細胞

1. 研究開始当初の背景

現在、我々は高齢化社会を迎え、我が国の心不全患者数は潜在的患者も含めると約160万人に上る。そのうち虚血性心疾患が原因疾患である患者は約半数の80万人とされる。とりわけ冠動脈の梗塞によって引き起こされる心筋梗塞は高齢者に多く、心筋細胞の壊死や線維化が進行し重篤な心不全を招く。重症心不全患者に対する根本的な治療法としては心臓移植が考えられる。しかし、ドナー不足や移植後の免疫抑制に伴う管理の難しさを考えると現実的な選択肢ではない。これに対して、心筋幹細胞、間葉系幹細胞などの幹細胞を不全心に移植する細胞移植療法が心臓移植に代わる治療方法として期待されている。

米国で行われたCADUCEUS試験では、患者心臓から調整したCardiosphere由来細胞を不全心に移植することで、梗塞領域の減少や心筋再生効果などを認めた。しかし、これまでの臨床試験の多くは、組織学的な変化は認められたにも関わらず心機能の劇的な改善には至らず、不全心における移植細胞の低い生着率、自家移植細胞による移植治療の限界、が考えられている。このため、これらの問題点を改善させる新たな方法の必要性が言われている。これらの細胞移植治療の問題点を解決する方法の一つとして、我々は、移植細胞の血管新生能や酸化ストレス抵抗性、組織生着性を向上させる“低酸素プレコンディショニング法”を独自に開発し発展させてきた。本法は、「移植24時間前に細胞を低酸素条件で前培養するのみ」という極めてシンプルな方法で、臨床現場で求められる“スピード”や“簡便さ”を解決し得る。

2. 研究の目的

本研究では、独自技術である低酸素プレコンディショニング法を細胞シート技術に応用し、世界初の試みである“低酸素刺激により機能賦活化した心筋幹細胞シートを用いた新たな重症心不全治療法”を開発する。また、マウス心筋梗塞モデルを用いた同系移植試験による詳細な検証を行い、本法の早期臨床応用の足掛かりとする。

3. 研究の方法

(1) 心筋幹細胞の単離と培養方法

予定心臓手術の患者から事前に承諾を得て、100mg程度の右心房の組織を採取した。これらを、0.5%トリプシンで5分間処理した後、フィブロネクチンでコーティングされたディッシュ上に静置した。細胞培養には10%FBSを含むIscove's Modified Dulbecco's mediumを用いた。心房組織から得られた細胞を、poly-2-hydroxymethylでコーティングしたフラスコで浮遊培養を施行し、Cardiosphere-like spheroidを得た。これを再び、フィブロネクチンコーティングを施した10cmディッシュに播種し、接着培養でCardiosphere-derived cells(CDCs)を得た。CDCsの精製度は表面抗原で確認した。

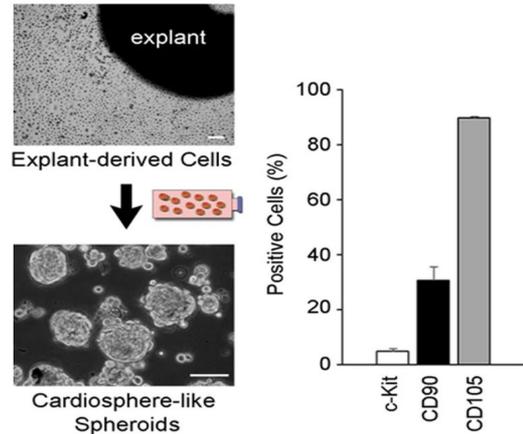


図1. Cardiosphere-derived cellの単離

なお、本研究は臨床研究における倫理審査委員会の承認を得ている(no.2010025)。

(2) 低酸素プレコンディショニング法と細胞シート作製

CDCs細胞シートの作製に関しては、温度応答性培養皿(Upcell®; CellSeed)を用いた。24wellプレートのwell内に播種されたCDCsを100%コンフルエントとし、細胞シートを作製した。低酸素プレコンディショニングを行う際は、移植24時間前に通常培養(37°C、5%CO₂、大気圧酸素濃度)から、低酸素培養(33°C、5%CO₂、2%O₂)へと変更し、低酸素プレコンディショニングとした。

(3) 培養上清中の成長因子の測定

CDCs細胞シートの機能を評価するため、hepatocyte growth factor(HGF), basic fibroblast growth factor(b-FGF), Vascular endothelial growth factor(VEGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I), endoglin/CD105とmatrix metalloproteinases(MMPs)の測定をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)を用いて行った。測定には、ELISA kit(R&D systems)を用いた。

(4) CDCs培養上清の血管新生能解析

Human umbilical endothelial cells (HUVEC)をマトリゲルでコーティングした96wellプレートの3.5×10⁵cells/wellで播種した。これらの細胞の培養上清をCDCsシート培養上清(通常酸素培養・低酸素培養)に変更し、12時間培養した。Conditioned mediumによる血管新生能の亢進をHUVECによる血管様管腔形成を評価した。

(5) マウスモデルを用いた治療実験

8-10週齢のC57BL/6マウスを用いてマウス陳旧性心筋梗塞モデルを作製した。全身麻酔人工呼吸下に左第4肋間開胸で心臓に到達した。8-0 monofilamentを用いてマウスの左冠動脈を結紮し、心筋梗塞を作製した。4週間後に陳旧性心筋梗塞モデルとして実験に用いた。また、先述のヒトCDCs培養プロトコールに則ってマウスCDCsを単離した。低酸素プレコンディショニングを施したマウスCDCsシートと通常酸素培養で作製し、マウ

ス陳旧性心筋梗塞モデルに貼付した。CDC s シート貼付後 4 週間て犠牲死させ、心エコー結果と病理組織について検討した。

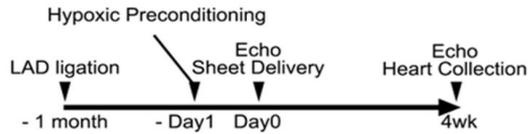


図 2. CDC s シート作製プロトコル

なお、動物実験については山口大学大学院に承認されている (no.31-089)。

(6) 移植した細胞シート残存性の解析

マウスモデルを用いた治療実験で移植した細胞シートが、実際に術後も残存しているかについて検討を行った。マウス CDCs を温度応答性培養皿に播種する前の状態で培養上清に PKH (Sigma Aldrich) を加え、細胞膜を染色した CDCs を得た。これを、先述のように温度応答性培養皿に播種し、PKH によって染色された CDCs シートを得た。PKH によって染色された CDC s シートを移植したのちに犠牲死させ、細胞シートの残存を確認した。

4. 研究成果

(1-3) 培養上清中の成長因子の測定

ヒト CDCs 細胞シートの培養上清を回収し、ELISA で検討した。培養上清に含まれる成長因子は図 3 の如くであり、CDC s シートの培養上清には多くの成長因子が含まれていた。中でも、VEGF の分泌能が高く、梗塞後の血管新生を促進する可能性が示唆された。

また MMP-2 活性も高く、CDC s シートは虚血領域に移植された際に生存に適した環境を形成している可能性も示唆された。

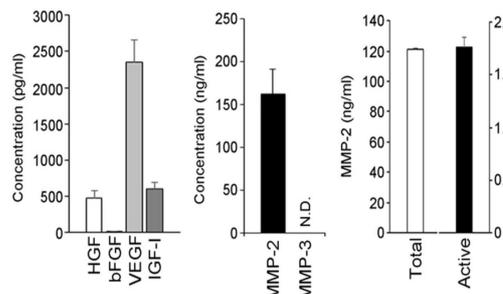


図 3. CDC s シートのパラクライン効果

また、ヒト CDCs、マウス CDCs の両者において低酸素培養を行うことで、CDCs シートの VEGF 産生能が向上した。(図 4)

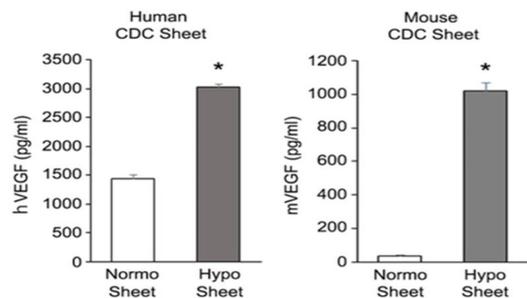


図 4. 低酸素プレコンディショニングによる VEGF 産生能の亢進

(4) CDC s 培養上清の血管新生能解析
続いて、CDCs シートのパラクライン効果としての血管新生能を検討する目的で HUVEC を用いて検討を施行した。

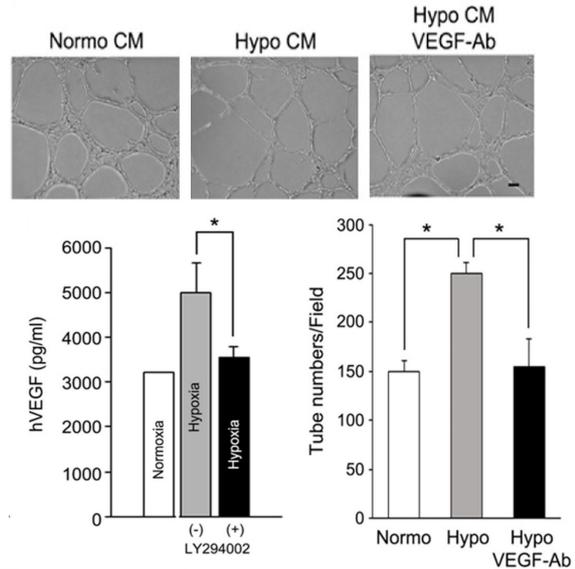


図 5. CDC s シート上清による血管標構造形成

CDCs シート培養上清 (conditioned medium; CM) を 通常酸素培養、低酸素プレコンディショニング、低酸素プレコンディショニング + 抗 VEGF 抗体の 3 群に分けて検討したところ、図 5 に示す如く、低酸素プレコンディショニングを施行した CDCs シートの培養上清で有意に最も多く血管様管腔形成が認められた。この効果は、抗 VEGF 抗体で、VEGF 濃度を低下させることで消失することから、VEGF による効果であることが示唆された。

(5) マウスモデルを用いた治療実験

In vivo の実験として、マウス陳旧性心筋梗塞モデルを用いた実験を施行した。CDCs シート治療により、左室駆出率 (LVEF)、左室内径短縮率 (LVFS) の改善を認めた。また、この治療効果は特に低酸素プレコンディショニングを施行した CDCs シートを貼付した群で有意に高かった。

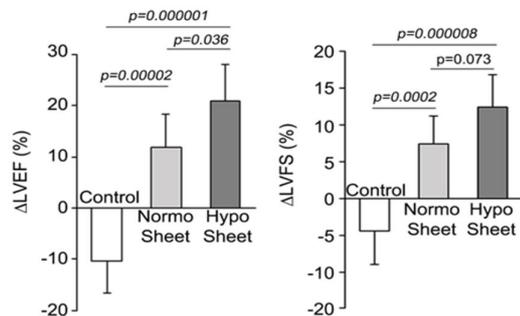
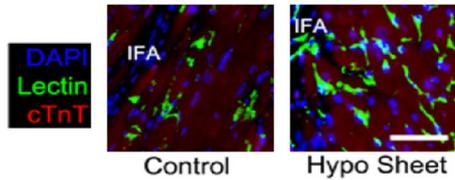


図 6. CDC s シートによる心収縮力改善

続いて、病理標本を用いて血管新生をトマトレクチンによる染色で検討した。結果は図 6 の如く、CDC s シート貼付群では心筋梗塞境界領域での血管新生がコントロールと比較し亢進していた。この効果は、低酸素プレコンディショニングを施行した CDCs シートに

において高かった (図 7)。



DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindol
Lectin: tomato lectin
cTnT: Cardiac troponin
IFA: infarcted area

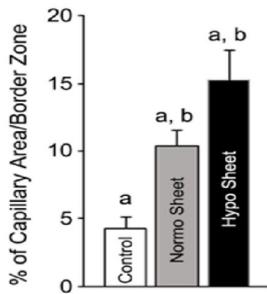


図 7 . CDC s シートによる心筋梗塞境界領域における血管新生亢進

梗塞領域においては、CDCs シート貼付群において梗塞面積は小さかった。低酸素プレコンディショニングを施行した CDCs シートにおいてより梗塞面積を縮小させる効果が高かった。(図 8)

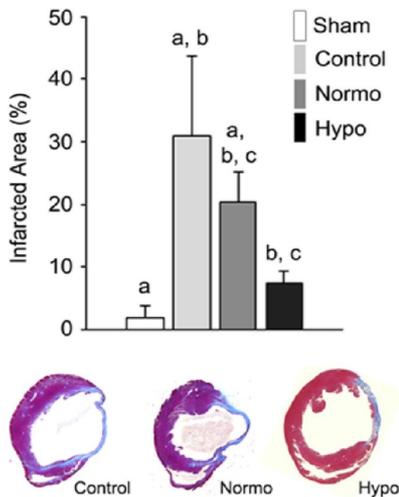


図 8 . CDC s シートによる梗塞領域縮小効果

(6) 移植した細胞シート残存性の解析

細胞シートを貼付するという手技が適切に施行されているかを PKH 染色した CDCs シートを用いて検討した。

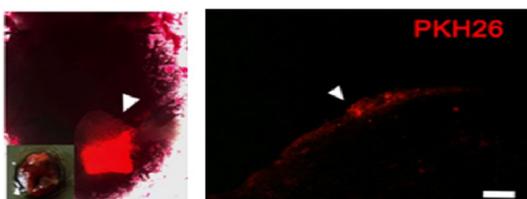


図 9 . CDC s シート貼付

図 9 に示す如く、PKH 染色を施した CDCs シートは貼付 4 週間後においても心外膜面にとどまっております。本研究の In vivo の検討における心機能改善効果は、CDCs シート貼付による効果であることが示された。

(7) 結論

米国で施行された CADUCEUS 試験では、患者心臓から単離した CDCs を不全心に移植することで、梗塞領域の減少や心筋再生効果などを認めた。しかし、組織学的な改善は認められたにもかかわらず心機能の劇的な改善には至っていなかった。

本研究では、細胞シートという投与方法を選択することにより、以前の冠動脈内投与と比較して長期間に渡り患部に CDCs をとどまらせることが可能であった。これによるパラクライン効果の持続期間が延長し、心エコーによる心機能改善効果、組織学的な梗塞縮小効果が得られたことが示唆される。

さらに、低酸素プレコンディショニングを施行することで CDCs シートの VEGF 産生を介して、梗塞境界領域に血管新生作用と梗塞縮小効果のさらなる向上を認めた。

低酸素プレコンディショニングは煩雑な操作が不要であり、臨床応用に即したシンプル且つ低コストの細胞シート機能賦活化法であることが示唆された。しかし、成長因子以外の要因、エクソソームやマイクロ RNA に与える影響は明らかでなく、今後は、さらなるパラクライン効果の機序解明と、急性期疾患に対応可能な他家幹細胞移植について検討していく必要があると考えられた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Nakamura Tamami, Hosoyama Tohru, Murakami Junichi, Samura Makoto, Ueno Koji, Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Mikamo Akihito, Hamano Kimikazu. Age-related increase in Wnt inhibitor causes a senescence-like phenotype in human cardiac stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;487(3):653-659. (査読あり)

DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.04.110

Nakamura Tamami, Hosoyama Tohru, Kawamura Daichi, Takeuchi Yuriko, Tanaka Yuya, Samura Makoto, Ueno Koji, Nishimoto Arata, Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Ito Hiroshi, Sakata Kensuke, Mikamo Akihito, Li Tao-Sheng, Hamano Kimikazu. Influence of aging on the quantity and quality of human cardiac stem cells. *Sci Rep.* 2016;7; 6:22781 (査読あり)

DOI: 10.1038/srep22781.

Hosoyama Tohru, Samura Makoto, Kudo Tomoaki, Nishimoto Arata, Ueno Koji, Murata Tomoaki, Ohama Takashi, Sato Koichi,

Mikamo Akihito, Yoshimura Koichi, Li Tao-Sheng, Hamano Kimikazu. Cardio-sphere-derived cell sheet primed with hypoxia improves left ventricular function of chronically infarcted heart. Am J Transl Res. 2015; 7(12):2738-51. (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

Tohru Hosoyama, Tamami Nakamura, Koji Ueno, Akihito Mikamo, Kimikazu Hamano. Possible contribution of Wnt antagonist to human cardiac stem/progenitor cell aging. KEYSTONE SYMPOSIA: Aging and Mechanisms of Aging-Related Disease. 2017.5.15-19

中村玉美、細山 徹、竹内由利子、田中裕也、佐村 誠、西本 新、上野耕司、美甘章仁、濱野公一、加齢がヒト心筋幹細胞(cardiosphere-derived cells)の量と質に与える影響、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016.4.14-16

中村玉美、細山 徹、竹内由利子、田中裕也、佐村 誠、上野耕司、美甘章仁、李 桃生、濱野公一、加齢や心機能低下がヒト心筋幹細胞(cardiosphere-derived cells)の量と質に与える影響、第 15 回日本再生医療学会総会、2016.3.17-19

〔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

美甘 章仁(MIKAMO, Akihito)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：30372709

(2) 研究分担者

濱野 公一(HAMANO, Kimikazu)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60263787

藏澄 宏之(KURAZUMI, Hiroshi)
山口大学・医学部・特別医学研究員
研究者番号：50645116

細山 徹(HOSOYAMA, Tohru)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20638803

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし