

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15508

研究課題名(和文)次世代型心不全治療法の開発へ向けたゲノム編集による老化心筋幹細胞の若返り

研究課題名(英文)Challenges to rejuvenate aged-cardiac stem cells by genome editing to develop next generation therapeutic strategies for heart failure.

研究代表者

濱野 公一 (HAMANO, Kimikazu)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60263787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、高齢者由来心筋幹細胞が幹細胞老化に陥っている可能性が指摘されており、特に高齢患者に対する心筋幹細胞移植の実施には慎重な対応が迫られている。本研究では、2-83歳の26名の心不全患者から単離した心筋幹細胞を用いて個体老化と心筋幹細胞老化との関係性を明らかにし、心筋幹細胞の老化誘導因子の同定と老化幹細胞の若返り誘導法の開発を当初の目的とした。しかし結果として、高齢患者由来のヒト心筋幹細胞における“老化”は極めて限定的であり、若返りの必要性は必ずしもないことが明らかとなった。このことは、高齢者が大半を占める重症心不全患者に対する自己心筋幹細胞移植療法の実施を大いに後押しする成果である。

研究成果の概要(英文)：In recent years, it has been pointed out the possibility of “aging” in elderly patients-derived cardiac stem cells, leading to take measures against stem cell therapy for elderly patients with severe heart failure. In this study, we aimed to clarify the correlation of stem cell aging with patient’s age and to develop novel strategies to induce rejuvenation of “aged” cardiac stem cells using 26 patients-derived cardiac stem cells isolated from 2-83 years old. As a result, however, “aging” in elderly patients-derived cardiac stem cells was quite limited, meaning that it is not necessary to induce rejuvenation of elderly patient-derived cardiac stem cells. This encouraged us to use elderly patient-derived cardiac stem cells in cell-based therapy for elderly patients with severe heart failure.

研究分野：心臓外科

キーワード：心筋幹細胞 幹細胞老化 心不全 細胞移植療法

1. 研究開始当初の背景

近年、心不全患者に対する心筋幹細胞 (Cardiac Stem Cell: CSC) 移植治療の臨床試験において良好な成績が報告されている (Makkar et al. *Lancet*. 2012)。しかし、これまでの臨床試験では対象患者がいずれも 65 歳未満であり、高齢者が大半を占める重症心不全患者に対する自己 CSC 移植においては、CSC の持つ高い心筋再生能が発揮されない可能性が指摘されている。なぜならば、高齢者の CSC は細胞レベルで“老化”に陥り、分裂能や自己複製能が著しく低下しているためである (Chimenti, et al. *Circ Res*. 2003; Torella, et al. *Circ Res*. 2004)。

一方で最近、細胞老化に陥った骨格筋幹細胞 (SMPC) を p38MAPK 経路の阻害剤で処理し適切な条件で培養すると、老化 SMPC の若返りが生じ移植後の筋再生誘導効果が著しく向上することが報告され (Cosgrove et al., *Nat Med*. 2014)、CSC を含む体性幹細胞の細胞老化を *ex vivo* で初期化できる可能性が示された。しかし老化 CSC においては、薬剤による細胞老化関連因子 (経路) の一過的抑制では、不全心への移植後に再び細胞老化の状態に陥ってしまう可能性は否定できない。すなわち、移植後のストレス環境下においても“若返り”が維持されるような細胞老化関連因子 (経路) の恒常的な抑制が必要である。

2. 研究の目的

重症心不全に対する細胞移植療法は、心臓移植に代わるより現実的な治療法としてその可能性が認知されており、特に自己心筋幹細胞移植には大きな期待が寄せられている。しかし患者の多くが高齢者であることから、移植に用いる自己幹細胞において細胞老化が生じており、「移植後の細胞生着率」や「心筋幹細胞の心筋再生効果」の著しい低下を招くと予想される。

本研究では、患者から単離した心筋幹細胞の年齢による比較により、老化心筋幹細胞において特異的に発現増加している因子 (Senescence-Associated Factors in CSC: SAFC) を同定し、“心筋幹細胞の細胞老化との関連性”および“ゲノム編集技術による移植後に老化しない心筋幹細胞の作出の可能性”を明らかにする。本研究により、老化に伴い機能低下した心筋幹細胞を *ex vivo* で若返らせて移植する“次世代型心不全治療”実現の道を切り開く。

3. 研究の方法

(1) 心不全患者由来心筋幹細胞の単離

山口大学医学部附属病院において心臓手術を施行した患者 26 名 (2~83 歳) の右心房組織より心筋幹細胞の一種である Cardiosphere-derived cells (CDCs) を単離

した (Hosoyama et al., *Am J Transl Res*. 2015)。本研究では、65 歳未満を若齢者、65 歳以上を高齢者と定義した。本臨床研究は、山口大学医学部附属病院医薬品等治験・臨床研究等審査委員会及び山口大学医学部附属病院治験及び人を対象とする医学系研究等倫理審査委員会により承認 (No. H22-29-4) を得て実施した。被験者本人に口頭および文書による十分な説明を行い、本人あるいは同意補助者の自由意志による同意を文書で得た後に研究を実施した。研究実施に関わるデータ類および同意文書等は、匿名化を図るために識別番号でデータ識別を行うなど、被験者の秘密保護には十分配慮し実施した。

(2) 細胞増殖アッセイ

単離した心筋細胞の増殖能の評価には、population doubling time (PDT) を用いた。本評価では、 $PDT = CT / \log(N/N_0) \times 3.31$ の計算式による算出法を用いた (Choudhery et al., *J Transl Med*. 2014)。CT は time in culture、N は最終的な細胞数、 N_0 は播種した細胞数、とする。

(3) Senescence-associated- β -galactosidase staining (細胞老化アッセイ)

患者由来の心筋幹細胞における細胞老化状態を評価する為に、SA- β -Gal 染色を行った。

(4) Flow cytometry アッセイ

単離した患者由来心筋幹細胞の細胞分布を比較する為に、心筋幹細胞の細胞表面抗原マーカーである CD90 および CD105 に対する Flow cytometry アッセイを行った。

(5) 細胞周期および DNA 障害

患者由来心筋幹細胞の細胞周期状態と DNA 障害の状態について、それぞれ Ki67 および γ H2AX 陽性細胞数で評価した。

(6) ELISA

患者由来心筋幹細胞の液性因子分泌能の変化について、VEGF、IGF-I、HGF、IL-8、IL-1 β 、に対する ELISA で評価した。

(7) *In vitro* tube formation アッセイ

患者由来心筋幹細胞の血管形成能について、マトリゲル上に播種した心筋幹細胞の 6 時間後の総 tube length で評価した。

(8) 統計解析

全てのデータに対する統計解析には、Stata version 12.0 を用いた。2 群間の比較には student's t-test もしくは Mann-Whitney test を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意な差とした。

4. 研究成果

(1) 心不全患者からの心筋幹細胞の単離と

その比較

まず、2-83歳の心不全患者26名から、それぞれ心筋幹細胞を単離し、その増殖能について比較した。その結果、細胞間で多少のバラツキは認められたものの若齢患者と高齢患者との間に細胞増殖能に有意な差は見られなかった ($p=0.24$) (Fig. 1A)。

次に、心筋幹細胞の表面抗原マーカーであるCD90とCD105の割合について、若齢者と高齢者との間で比較した。その結果、心筋幹細胞集団に含まれるCD90、CD105陽性細胞の割合は若齢者と高齢者との間で差はなく (Fig. 1B)、このことは、加齢に伴って心筋幹細胞のポピュレーションに変化がないことを意味している。

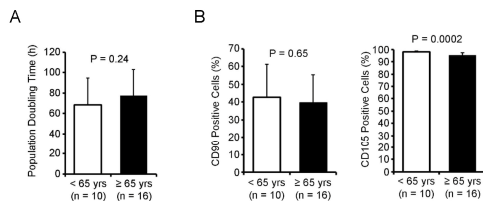


Fig.1. 個体老化が心筋幹細胞の増殖能およびキャラクターに与える影響
(A) 若齢者および高齢者由来の心筋幹細胞のpopulation doubling time
(B) 心筋幹細胞マーカーの比較 (左: CD90, 右: CD105)

(2) 個体老化による心筋幹細胞の老化誘導の評価

続いて、若齢者由来心筋幹細胞と高齢者由来心筋幹細胞における細胞老化状態の比較を行った。主に実験動物を用いて行われてきたこれまでの報告では、個体老化に伴い心筋幹細胞の老化も誘導されるとされていたが、ヒト心筋幹細胞での評価に関する報告はほとんどなく、その真偽については意見が分かれていた。

本研究では、細胞老化マーカーである、SA- β -Gal, p53, p16, p21の発現およびDNA障害マーカーである γ H2AX陽性細胞数の比較を行った (Fig. 2A)。その結果、p53 ($p=0.025$)とp21 ($p=0.0084$)の発現が高齢者で有意に増加している以外は、若齢者と高齢者との間で差はなかった。さらに、老化細胞に特徴的な表現型であるSenescence-associated secretory phenotype

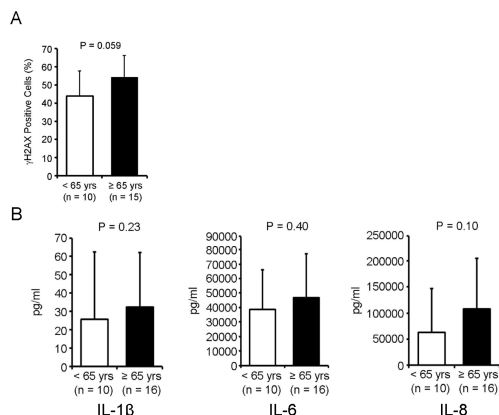


Fig.2. 個体老化がDNA障害およびサイトカイン分泌に与える影響
(A) 若齢者および高齢者由来の心筋幹細胞の γ H2AX陽性細胞数の比較
(B) サイトカイン分泌の比較

(SASP)と細胞成長因子発現についても評価したところ、IL-1 β やIL-6、IL-8などの代表的なSASP因子の発現 (Fig. 2B)とVEGFやIGF-Iといった細胞成長因子においても有意な差は認められなかった。このことは、個体老化が心筋幹細胞の老化に与える影響は限定的であることを示唆している。

(3) まとめ

当初の研究計画では、「個体老化に伴い心筋幹細胞の老化が導かれる」と想定し、その誘導因子の同定と老化細胞のゲノム編集による恒常的若返りの誘導を目的としていたが、ヒト心筋幹細胞を用いた多角的かつ詳細な検証により個体老化が心筋幹細胞の老化誘導に与える影響は極めて限定的であることが明らかとなった。このことは当初の予想していたものと大きく異なる結果であり、研究計画立案が未熟であったと認めざるを得ない。しかし一方で、当該研究領域にこれまでの通説を覆す非常に重要な情報をもたらしても言える。事実、本成果を示した学術論文に対するAltmetric score(学術論文の注目度を数値化したもの)は高値であり、世界的に大きなインパクトを与えたことがうかがえる。

日本国内では、心臓移植の年齢制限が65歳未満と定められており、65歳以上の高齢者が患者の大半を占める重症心不全患者に対して心臓移植をそもそも実施することができない。その代替法として心筋幹細胞の移植が期待されていたが、これまでの報告で高齢動物由来の心筋幹細胞は老化状態に陥っている可能性が示されており、大きな懸念材料とされてきた。しかし本研究により、高齢心不全患者由来の心筋幹細胞における細胞老化は限定的であることが明らかとなり、今後の心筋幹細胞移植治療の発展に非常に重要な示唆を与えることができた。

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1件)

Nakamura T, Hosoyama T, Kawamura D, Takeuchi Y, Tanaka Y, Samura M, Ueno K, Nishimoto A, Kurazumi H, Suzuki R, Ito H, Sakata K, Mikamo A, Li TS, Hamano K. Influence of aging on the quantity and quality of human cardiac stem cells. Sci Rep. 2016. 6: 22781. DOI: 10.1038/srep22781. (査読あり)

(学会発表)(計2件)

Tohru Hosoyama 「Influence of Aging on Cardiac Stem/Progenitor Cells」 BIT's 7th World Gene Convention-2016 2016年

11月3-5日 上海市(中国)

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 2016年3月17-19日 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

〔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

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

(2) 研究分担者

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

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()