

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15509

研究課題名(和文) 心臓再生ニッチの探索と構築

研究課題名(英文) Searching the potential factor(s) of regulating endogenous regeneration in infarcted heart of mice

研究代表者

李 桃生 (LI, Tao-Sheng)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授

研究者番号：50379997

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)：本研究は、急性心筋障害後における心筋組織内の液性因子や細胞外基質分子の経時的変化を調べ、内因性心筋再生に関わる可能性のある因子を網羅的にScreeningした。その結果、心筋梗塞の中心と境界領域以外に、遠隔健常心筋領域にも多くのサイトカイン/ケモカインおよび細胞外マトリックス/接着分子などの関連遺伝子の発現変化が認められた。しかし、心筋再生に盛んな梗塞と正常心筋の境界領域には、Interleukinなどの炎症性サイトカインや細胞外マトリックス関連タンパク酵素の発現変化が梗塞後の経過と共に徐々に減少していたことが判明した。これらの因子は内因性心筋再生を制御していると思われる。

研究成果の概要(英文)：By focusing on the kinetic changes of cytokines/chemokines and extracellular matrix/adhesion molecules after myocardial infarction, we tried to search the potential factor(s) of regulating endogenous regeneration in heart. We ligated the left anterior descending artery in healthy mice, and then collected heart tissues from infarct area, border area, and remote area at 1, 3, 7 and 14 days, respectively. RT2 ProfilerTM PCR array analysis showed that many genes were up- or down-regulated over 2-fold in each area during the 14 days following-up. Interestingly, the number of up- and down-regulated genes encoding cytokines/chemokines and extracellular matrix/adhesion molecules tended to decrease in the border area but not in the infarct area with time after MI. Further experiments are required to identify the key factor(s) involving in the regenerative process of heart after injury.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：心筋再生 因子

1. 研究開始当初の背景

心筋再生を含めて、今までの再生医療の研究は様々な細胞(ドナー細胞)を障害臓器へ移植する方法が主流で、いわゆる細胞の補充による外因性再生治療である。しかし、これまでに、様々な幹細胞を用いた心血管再生治療臨床試験の結果では、その治療効果が限定的である。

一方、内因性再生とは臓器に元々秘めている自己再生修復機能のことである。近年の研究により、心臓内にも心筋幹細胞と増殖する心筋細胞が確認され、自己再生修復能力を有することが明らかになった。しかし、実際の臨床においては重篤な心不全に陥った患者が多く存在し、自然治癒することはほとんどない。その原因としては加齢や傷害心臓の内在的な局所組織環境の悪化などにより、内因性再生能が低下していることが考えられる。

障害臓器の自己再生修復には、組織幹細胞のみならず、多くの分子・細胞が関与していると思われる。我々は、その組織再生修復に必要な複雑な局所組織環境のことを「再生ニッチ」と提唱する。最近の研究では、細胞を移植せず、障害心臓の細胞外基質を制御することにより、心筋の内因性再生が促進されることが報告されていた。そのため、心臓における再生ニッチを解明できれば、再生ニッチの制御による内因性心筋再生の誘導が可能と思われ、新たな心筋再生の道を開くこととなる。

2. 研究の目的

本研究は、急性心筋障害後における心筋組織内の液性因子、細胞外基質および接着分子の経時的变化を調べ、心筋再生に適切な組織環境(=「再生ニッチ」)をより深く理解すると共に、内因性心筋再生を制御しうる因子を探す。

3. 研究の方法

(1) 心筋梗塞モデルの作製と組織採集：

健常マウス(C57BL/6, 12w)を全身麻酔、気管内挿管(22-G)下に人工呼吸管理し、左開胸を行った。冠動脈左前下行枝の結紮により心筋梗塞モデルを作製した。心筋梗塞モデルを作製1, 3, 7, 14日後に、心筋梗塞領域(Infarct area)、梗塞外側境界領域(Border area)、および遠隔健常心筋組織(Remote area)をそれぞれ採集し、解析に用いた。

(2) 心筋組織内におけるサイトカイン/ケモカインおよび細胞外マトリックス/接着分子の定量分析：

各領域の心筋組織からTotal RNAを抽出し、RT₂ Profiler™ PCR Arrayによりサイトカイン/ケモカインおよび細胞外マトリックス/接着分子の発現を調べた。また、顕著な変化を示した因子は組織から蛋白を抽出し、蛋白レベル(Western blot法)を調べる。

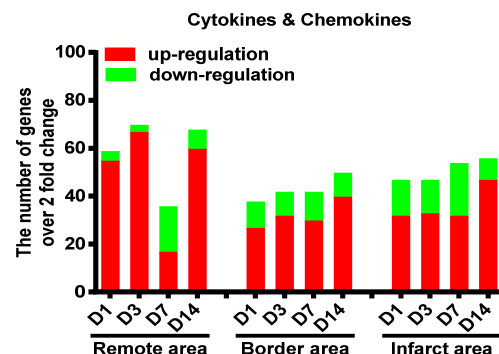
4. 研究成果

(1) 心筋組織内におけるサイトカイン/ケモカインの発現変化：

心筋梗塞後の1, 3, 7, 14日目に梗塞中心領域、境界領域、及び遠隔健常心筋領域におけるサイトカイン/ケモカインの発現の動態変化はRT₂ Profiler™ PCR Arrayにより調べた。

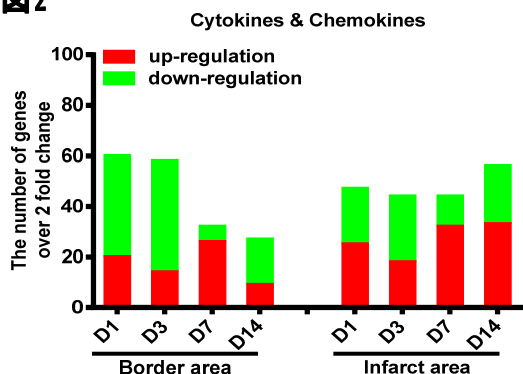
解析に含まれる84個の遺伝子のうち、2倍以上の変化を示す遺伝子の数を図1に示す(図1)。心筋梗塞の中心と境界領域以外に、遠隔健常心筋領域にも多くのサイトカイン/ケモカイン関連遺伝子の発現変化が認められた。

図1



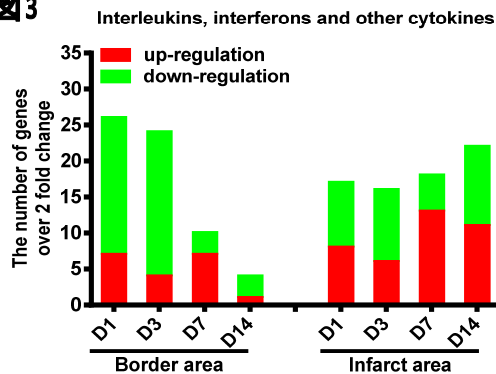
内因性心筋再生関連因子を見出すために、遠隔健常心筋領域における遺伝子の発現レベルを基準として補正し、アレイのデータを再解析したところ、2倍以上の変化を示す遺伝子の数は、境界で7, 14日目に減少する傾向を示した(図2)。

図2



我々は、これらのサイトカイン/ケモカイン関連遺伝子をさらに機能的に分類し、その発現変化を調べた。その結果、特に心筋の再生に盛んな境界領域には、Interleukinなどの炎症性サイトカインが梗塞後の7, 14日目に変化を示す因子の数が劇的に減少していたことが判明した(図3)。これら炎症性サイトカインは心筋再生に深く関わっていたことが示唆された。

図3



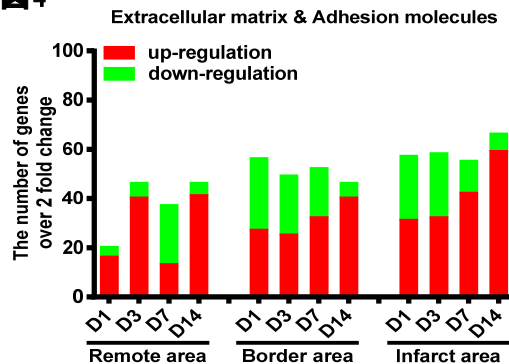
(2) 心筋組織内における細胞外マトリックス/接着分子の発現変化:

前記と同様に、心筋梗塞後の1, 3, 7, 14日目に梗塞中心領域、境界領域、及び遠隔健常心筋領域における細胞外マトリックス/接着分子の発現の動態変化はRT₂ Profiler™ PCR Arrayにより調べた。

解析に含まれる84個の遺伝子のうち、2倍以上の変化を示す遺伝子の数は、前記と同様に、心筋梗塞の中心と境界領域以外に、遠隔

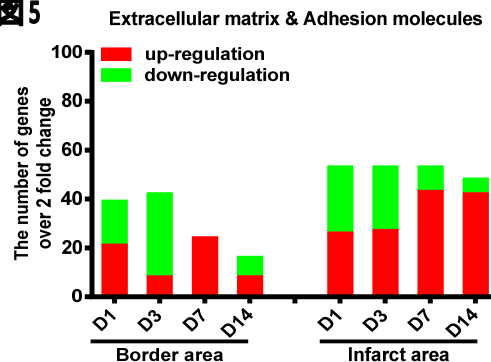
健常心筋領域にも多くの細胞外マトリックス/接着分子関連遺伝子の発現変化が認められた(図4)。

図4



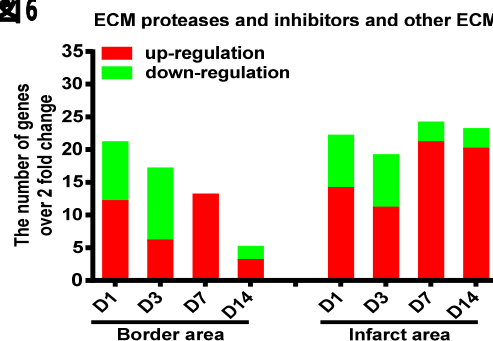
内因性心筋再生関連因子を見出すために、遠隔健常心筋領域における遺伝子の発現レベルを基準として補正し、アレイのデータを再解析したところ、2倍以上の変化を示す遺伝子の数は、境界で7, 14日目に減少を示した(図5)。

図5



これらの細胞外マトリックス/接着分子関連遺伝子をさらに機能的に分類し、その発現変化を調べた。その結果、特に心筋の再生に盛んな境界領域には、細胞外マトリックス関連タンパク酵素が梗塞後の経過と共に変化を示す因子の数が徐々に減少していたことが判明した(図6)。これらの因子は心筋再生に深く関わっていたことが示唆された。

図6



本研究は内因性心筋再生に関わる可能性のある因子を網羅的に Screening し、多くの因子が見出された。今後は発現変化を示した個々の因子が心筋再生に与える影響を検証し、さらなる心筋再生ニッチの全容解明を進めていく予定である。

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 5 件)

Tang J, Cores J, Huang K, Cui X, L Luo, Zhang J, Li TS, Qian L, Cheng K. Concise review: Is cardiac cell therapy dead? Embarrassing trial outcomes and new directions for the future. *Stem Cells Transl Med.* 2018;7(4):354-359. doi: 10.1002/sctm.17-0196. (査読あり)

Luo L, Tang J, Nishi K, Yan C, Dinh PU, Cores J, Kudo T, Zhang J, Li TS, Cheng K. Fabrication of synthetic mesenchymal stem cells for the treatment of acute myocardial infarction in mice. *Circ Res.* 2017;120(11):1768-1775. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310374. (査読あり)

Hasan AS, Luo L, Yan C, Zhang TX, Urata Y, Goto S, Mangoura SA, Abdel-Raheem MH, Zhang S, Li TS. Cardiosphere-derived cells facilitate heart repair by modulating M1/M2 macrophage polarization and neutrophil recruitment. *PLoS One.* 2016;11(10):e0165255. doi: 10.1371/journal.pone.0165255. (査読あり)

Zhang S, Li TS, Soyama A, Tanaka T, Yan C, Sakai Y, Hidaka M, Kinoshita A, Natsuda K, Fujii M, Kugiyama T, Baimakhanov Z, Kuroki T, Gu W, Eguchi S. Enhanced extracellular matrix and inflammatory chemokines may negate the regeneration of cholestatic liver. *Sci Rep.* 2016;6:26540. doi: 10.1038/srep26540. (査読あり)

Shen D, Tang J, Hensley MT, Li T, Caranasos TG, Zhang T, Zhang J, Cheng K. Effects of matrix metalloproteinases on the performance of platelet fibrin gel spiked with cardiac stem cells in heart repair. *Stem Cells Transl Med.*

2016;5(6):793-803. doi: 10.5966/sctm.2015-0194. (査読あり)

[学会発表](計 2 件)

Lan Luo, Yoshishige Urata, Chen Yan, Shinji Goto, Tao-Sheng Li. Searching the potential factor(s) of regulating endogenous regeneration in infarcted heart of mice. 第 17 回日本再生医療学会 2018 年

Lan Luo, Al Shaimaa Hasan, Chen Yan, Shinji Goto, Tao-Sheng Li. Cardiosphere-derived cells repair an infarcted heart by regulating M1/M2 macrophage polarization. 第 16 回日本再生医療学会 2017 年

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

李 桃生 (LI, Tao-Sheng)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授
研究者番号: 50379997

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし