

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18390376  
 研究課題名(和文) 骨格筋芽細胞移植により誘導される心筋再生因子の同定と治療応用に関する実験的研究  
 研究課題名(英文) Identification and therapeutic effect of growth factor inducing myoblast sheet transplantation in infarcted rat hearts.  
 研究代表者  
 福島 教偉 (FUKUSHIMA NORIHIDE)  
 大阪大学・医学系研究科・准教授  
 研究者番号：30263247

## 研究成果の概要：

比較的早期に臨床応用可能で、かつ in vivo で梗塞心の心機能改善効果を示す「心筋再生因子；特に分泌蛋白」を系統的に同定する事を目的とした。公開されたマウス心発生でのマイクロアレイデータを解析して、骨格筋芽細胞の心修復課程で同定された分子のうち心臓発生及び成長に關与する分泌蛋白について選出した。上記で検討した蛋白をラット梗塞心に局所注入し、その後の経時的に心機能改善効果について検討を行った。心筋梗塞部への候補因子投与群において、心機能の改善とリモデリングの抑制、残存心筋の増加が確認され、細胞移植を必要としない新たな心筋再生治療の可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,600,000	0	5,600,000
2007年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	2,880,000	18,080,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：心筋再生、細胞移植、心筋梗塞、心筋再生因子

## 1. 研究開始当初の背景

Taylorら及びOrlicらのパイオニア的報告以後、骨格筋芽細胞や骨髄幹細胞移植による心筋梗塞の「細胞治療」についての基礎研究が急速に進み、早くも世界中でPhase I, IIのclinical trialが行われる現状となった。これらの早期臨床治験結果が、傷害心に対する「細胞治療」の臨床的有効性を示唆するため、さらに大規模な臨床研究が進められようと

しているが、なおこの治療によって得られる心機能改善が如何なるメカニズムに依るかについては不明な部分が多い。

現状の「細胞治療」開発上の問題点は以下の2点に集約される。

治療により心機能が改善する点は、移入細胞種、実験動物種や研究施設を通じて概ね一致するが、何れにおいても移植細胞の生着数が限られ、移植細胞の力学的貢献で心機能改善を単純に説明出来るか否かに疑問があ

る。

治療用細胞は疾患患者自身から採取する必要があり、分離・培養など移植細胞の準備に労力と時間を要し、急な対処や大量の細胞調整が難しいばかりでなく対象患者のリスクも伴う。

したがって、もしも「心筋梗塞の細胞治療」の効果発現メカニズムが明らかになり、これを代替する分子治療が創出されれば、心臓における再生医療が格段に進歩すると予想される。

これまでに我々は、骨格筋芽細胞移植の効率を向上させるために、層状に培養した骨格筋芽細胞をシート状組織片として移植する方法を開発し、既存の Needle injection 法より優れた心機能改善効果を得ることに成功している(6)。同一細胞の移植法の違いで得られる心機能改善効果が異なることから、この両移植法を比較する事で心機能改善の分子メカニズムが明らかになる可能性がある。

本研究の特色は、筋芽細胞移植による梗塞心の機能改善効果の少なくとも一部が、心発生時と共通した増殖因子の再発現による自己修復機構の増強によると仮定し、その網羅的同定を試みる点にある。

元来、魚類・両生類の心臓には再生・修復機構が存在する(7)、哺乳類の成熟心筋細胞は再生しないとされてきた。しかし、この2~3年、ヒト、マウスおよびラット成体の心臓に、傷害時に心筋細胞に分化する心筋前駆細胞が存在すると複数の施設から報告され(8-13)、哺乳類成体にも心再生機構の少なくとも遺残が残ることが明らかになった。したがって、この遺残再生機構を有効活用する方法が理にかなった心筋梗塞治療となる可能性があるが、哺乳類遺伝子の総数が限られた数(23,000~25,000程度)であることから、心発生と心再生に共通の遺伝子が用いられる可能性が高いと考える。

実際、我々を含めてこれまで hepatocyte growth factor の心・肝・肺再生効果が数多く報告されている事は上記の仮定に良く一致すると考えられるし、より最近には Thymosin beta 4 による ITK 活性化が、胎生心の成長と成体心の修復の両者に重要であることが明らかにされた。したがって、本研究が偏った仮定の上に立つとの危惧が当然予想されるが、最新の報告はむしろその妥当性を支持し、準備の項で述べる我々の pilot study も上記のような分子が複数存在することを示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究の期間内のゴールは上記移植法の

比較から、比較的早期に臨床応用可能で、かつ In vivo で梗塞心の心機能改善効果を示す「心筋再生因子；特に分泌蛋白」を系統的に同定する事にある。そのため、

A. ラットゲノムを現在最も広くカバーする Affymetrix 社 Rat 230-2 array を用いて、骨格筋芽細胞の針移植後およびシート移植後の梗塞心修復過程での遺伝子発現を網羅的に解析し、心機能改善効果と定量的発現相関を示す分子を同定する。

B. 可能なら Web 上に公開されたマウス心発生でのマイクロアレイデータと TIGR ゲノム情報(後述)の利用で、不十分ならさらにラット心発生を独自にアレイ解析して、A で同定された分子のうち心臓の発生及び成長に関与する分泌蛋白を同定する。

C. 上記で同定した蛋白を完成したラット梗塞心に局所注入し、その後の経時的心エコー解析から心機能改善効果のあるものを選別する。

の3つを実施した。

## 3. 研究の方法

細胞治療を行う群は移植後2週目からすでに心機能改善を示すので、細胞移植1週後に遺伝子発現解析を行い、その後の心機能との相関を検討した。アレイデータ解析は GeneSpring(SiliconGenetics 社)を用いて行った。

約31,000遺伝子(断片を含む)を対象とした解析であるので、クラスタ解析などの手法を用いても数百以上の遺伝子に心機能改善効果との相関が観察されると予想され、ラットゲノムの annotation 状況から考えて、その内の約半数は機能未知あるいは Expressed sequence tag (EST)であると思われる。そこで、TIGR を通じてこれら候補のマウス相同遺伝子リストを作成し、公開されているマウス心発生解析結果と比較することで、胎生心の発生・成長期に発現し成長とともに消失する事が予想される遺伝子を選別した。

前下行枝(LAD)結紮2週後の梗塞周囲部にコラーゲンゲルに溶解したリコンビナント蛋白を注入し、2, 4, 8週後に心エコー検査を行って治療効果の有無を判定した。効果が認められた因子について、組織線維化率、新生血管数、増殖心筋細胞数(PCNAまたはBrdU染色)などの面から組織学的解析を行った。

同定分子の annotation 情報から、すでに増

殖因子や分泌蛋白であることが分かっている分子について、PCR クローニングにて cDNA を作成し、市販の昆虫細胞利用リコンビナント蛋白作成系（糖鎖付加があり大量作成に有利な長所を持つ）を用いて蛋白作成を試みた。

機能不明の分子については、leader 配列の検索や、functional domain 検索 (SWISS-Prot 利用) を行って分泌蛋白の可能性のあるものを選別する。EST に関しては rat genome sequence 上での Blast 検索から染色体上の位置を推定し、隣接する部位に分泌蛋白が存在する場合には、その蛋白の非翻訳部である可能性が強いので、EST の上流または下流の coding sequence を RACE 法で決定し、分泌蛋白か否かの最終判断をした。

#### 4. 研究成果

本研究は、比較的早期に臨床応用可能で、かつ in vivo で梗塞心の心機能改善効果を示す「心筋再生因子；特に分泌蛋白」を系統的に同定する事を目的とした。そのため、骨格筋芽細胞の針移植後およびシート移植後の梗塞心修復課程での遺伝子発現を網羅的に解析し、心機能改善効果と定量的発現相関を示す分子について検討した。さらに、公開されたマウス心発生でのマイクロアレイデータを解析して、同定された分子のうち心臓発生及び成長に關与する分泌蛋白について選出した。上記で検討した蛋白をラット梗塞心に局所注入し、その後の経時的に心機能改善効果について検討を行った。

解析対象として以下の 5 群の心筋梗塞部組織を用いた。

- A. 正常 LEW ラット心
- B. LAD 結紮 2 週後ラット心 (治療直前)
- C. コラーゲン支持膜のみ移植 (sham 治療群)
- D. 遊離骨格筋芽細胞の針移植群
- E. 骨格筋芽細胞シート移植群

細胞治療を行う D, E 群は移植後 2 週目からすでに心機能改善を示し、その効果は D < E である事が分かった。C は経時的に心機能が悪化したので、細胞移植 1 週後に遺伝子発現解析を行い、その後の心機能との相関を検討した。

各群 n=6 で行い、3 匹ずつプールしたサンプルで、5 群 10 サンプルでの解析を行った。

これらの遺伝子発現解析の結果から得られた候補因子について、リコンビナント蛋白を入手し、心筋梗塞部とその周辺部に注入し、経時的に心臓超音波検査を行い、その治療効果を検討した。評価項目としては、左室拡張

期面積、収縮期面積、左室駆出率、左室拡張期径、左室収縮期径を検討した。さらに、組織学的評価として、組織繊維化率、新生血管数などの解析を行った。

心筋梗塞部への候補因子投与群において、心機能の改善とリモデリングの抑制、残存心筋の増加が確認された。以上の結果から、候補因子投与群において残存心筋の増加と心筋肥大の抑制により、心機能改善効果が示されたと考えられる。本研究は、細胞移植を必要としない新たな心筋再生治療として有用である。

#### 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 1 件)

Fukui S, Kitagawa-Sakakida S, Kawamata S, Matsumiya G, Kawaguchi N, Matsuura N, Sawa Y, Therapeutic effect of midkine on cardiac remodeling in infarcted rat hearts. Ann Thorac Surg. 2008 Feb;85(2):562-570.

(査読有)

[学会発表](計 1 件)

Fukui S, Matsumiya G, Fukushima N, Ichikawa H, Kuratani T, Sakaki M, Ueno T, Matsue H, Fujita T, Sawa Y. Heart Failure Models of Large Animals for Preclinical Trial of Myocardial Regeneration Therapy, 日本心不全学会 学術集会, 浦安, 9.9-10, 2007

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 教偉 (FUKUSHIMA NORIHIDE)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号: 30263247

(2) 研究分担者

澤 芳樹 (SAWA YOSHIKI)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 00243220

松宮 護郎 (MATSUMIYA GORO)  
大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20314312

西村 元延 (NISHIMURA MOTONOBU)  
鳥取大学・医学部・教授  
研究者番号：90291442

上野 高義 (UENO TAKAYOSHI)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：60437316

市川 肇 (ICHIKAWA HAJIME)  
大阪大学・医学系研究科・特任教授 (常勤)  
研究者番号：60303939

坂口太一 (SAKAGUCHI TAICHI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：10467574

(3)連携研究者

倉谷 徹 (KURATANI TORU)  
大阪大学・医学系研究科・寄付講座准教授  
研究者番号：90448035

白川 幸俊 (SHIRAKAWA YUKITOSHI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：20457013

宮川 繁 (MIYAGAWA SHIGERU)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：70544237

齋藤 充弘 (SAITO ATSUHIRO)  
大阪大学・医学部附属病院・特任助教 (常勤)  
研究者番号：20448038

(4)研究協力者

福井 伸哉 (FUKUI SHINYA)  
大阪大学・大学院医学系研究科・大学院生

今西 悠基子 (IMANISHI YUKIKO)  
大阪大学・大学院医学系研究科・大学院生