

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08525

研究課題名(和文) 心筋梗塞の再生微小環境内の再生アソシエイト細胞解析研究

研究課題名(英文) Role of Regeneration-Associated Cells in Myocardial Ischemia

研究代表者

浅原 孝之 (Asahara, Takayuki)

東海大学・医学部・客員教授

研究者番号：20246200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：再生微小環境の血液細胞群のフェノタイプは、臓器・血管再生メカニズムにおいて重要な役割を担うが、糖尿病・肥満・老化などの慢性炎症病態では、このフェノタイプ異常から再生環境不全が起こり、動脈硬化症・虚血性疾患の進行に繋がると考えられている。本研究では、健康マウスおよび糖尿病・肥満・老化などのモデルマウスにおける、組織虚血モデルでの再生環境細胞を病期ごとに分離し、そのフェノタイプ・機能を比較解析し、再生アソシエイト細胞に比した炎症関連細胞の浸潤優位の観察など、心筋梗塞後の再生環境細胞の動態を明らかにする事が出来た。ただし、メカニズムあるいは治療応用のへ解明に必須の課題が残された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病あるいは高齢による虚血組織における慢性炎症と再生不全は、再生環境細胞の機能不全が大きな原因になっていると考えられ、細胞のフェノタイプ解析によって、それを証明することが出来た。このことは、再生環境細胞の機能不全の原因を探ることで疾患あるいは高齢による治療不全を治療出来る可能性を示している。その治療薬の開発で、疾患あるいは高齢における健康寿命を大幅に延伸できると期待され、国民の健康生活の質を高め医療費の削減に大いに貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Phenotypes of blood cells in the regenerative microenvironment play an important role in organ and vascular regeneration mechanisms. In chronic inflammatory diseases such as diabetes, obesity, and aging, phenotypic abnormalities in the regenerative microenvironment are thought to cause regenerative environment failure, leading to the progression of atherosclerosis and ischemic diseases. In this study, we isolated regenerative environmental cells in healthy mice and in tissue ischemia models of diabetes, obesity, and aging, and compared their phenotypes and functions. We were able to clarify the dynamics of regenerative environmental cells after myocardial infarction. However, we still need to clarify the mechanism and therapeutic application of these cells.

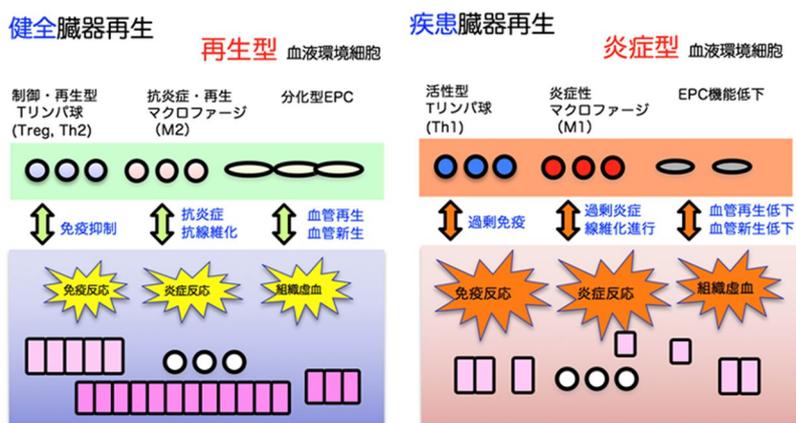
研究分野：再生医療

キーワード：再生環境 血管再生作用 抗炎症作用 抗免疫作用

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療の実現化に伴い、移植細胞・組織の開発だけでなく、疾患再生環境の治療が非常に重要であると認識されている。再生臓器の微小環境は、血管（血管内皮細胞・平滑筋細胞）間質組織（間葉系細胞）および浸潤血液細胞で構成されているが、この中で浸潤血液細胞による血管再生・炎症・免疫に関連する細胞活動およびそのタンパク・エクソゾーム分泌が、再生微小環境のメカニズムであるという過言ではない。例えば、再生環境では抗炎症・再生型の M2-マクロファージと免疫抑制・抗炎症型の制御性 T 細胞 (T-reg)・Th2 が相補的に誘導され (Mosser DM, Nat Rev Immuno, 2008) 抗炎症・免疫抑制効果によって血管再生・臓器再生が促進されると報告されていた。反対に、糖尿病などの代謝性慢性炎症シグナル環境下では、炎症型の M1-マクロファージと免疫活性型の Th1 細胞が誘導され、過剰炎症・免疫状態が血管再生能低下とともに再生環境不全を招くと考えられていた。しかし、単球・リンパ球細胞などの炎症免疫関連細胞が成長因子・サイトカインなどで炎症免疫あるいは抗炎症免疫フェノタイプに表現型を変化させるメカニズムは血液免疫学・腫瘍学である程度研究されているが、再生組織環境における細胞群の systemic biology としての研究は全く進んでいなかった。



### 2. 研究の目的

以上の背景から、健全な再生環境での再生関連細胞コミュニティ、疾患・老化環境での炎症関連細胞コミュニティが再生臓器の病態を反映しているのではないかと仮説を立て、以下の目的で研究を進め将来的な再生環境治療に役立てようとした。

(1) 健全動物の虚血性疾患では、各時期（急性期・亜急性期・慢性期）にどのような再生関連細胞（再生アソシエイト細胞）あるいは炎症関連細胞（炎症アソシエイト細胞）が再生微小環境を構築して、臓器再生に貢献するのか研究する。

(2) 糖尿病・老化動物の虚血性疾患では、どのような再生アソシエイト細胞あるいは炎症アソシエイト細胞が再生微小環境を構築し、臓器再生を妨げているのか研究する。

(3) 糖尿病・老化動物の虚血性疾患の再生環境に再生アソシエイト細胞を移植して、再生微量環境の改善が可能か研究する。

### 3. 研究の方法

研究は、健常マウス・糖尿病マウス・老齢マウスの心筋梗塞モデルを利用し、再生環境細胞の分離・解析を行う為の in vivo 実験を中心に進めた。

## (1) in vivo 動物実験

再生臓器実験としてマウスの心筋梗塞モデルを採用し、心筋梗塞前(正常時)、心筋梗塞後1日、3日、7日それぞれのタイミングで心臓・末梢血液・骨髄・脾臓を取り出して細胞分離を行った。本研究室ではPintoらの原法(CircRes, 2016)を改変し、心筋梗塞の再生微小環境から細胞活性・表現型を失わないように心筋細胞以外の細胞を分離した。

マウスは、1) 健常マウス(C57BJ6N)、2) 糖尿病マウス(ストレプトゾシン投与モデル、摂食誘導肥満マウス)、3) 老齢マウス(12ヶ月齢以上)を用いた。

## (2) 細胞解析実験

### FACS 解析

分離された細胞は FACS 測定され、研究室で確立された多元解析による clustering method (SPADE, tSNE) などで再生微小環境の構成細胞とそのフェノタイプを同定した。

抗体は、血管再生系マーカー:c-Kit, Sca-1, CD34, CD31, など、骨髄系マーカー: CD45, Ly-6C, Ly-6G, CD11b, CD11c, CD68, CD206, F4/80, リンパ系マーカー: CD3e, CD4, CD8a, CD25, CD127, CD19, NK1.1 などを用いて網羅的に細胞分類した。

### EPC コロニーアッセイ

分離細胞群の中の血管内皮前駆細胞(EPC)の血管再生能を評価するために、EPC コロニーアッセイを利用し未分化型コロニー形成 EPC、分化型コロニー形成 EPC を定量化した。

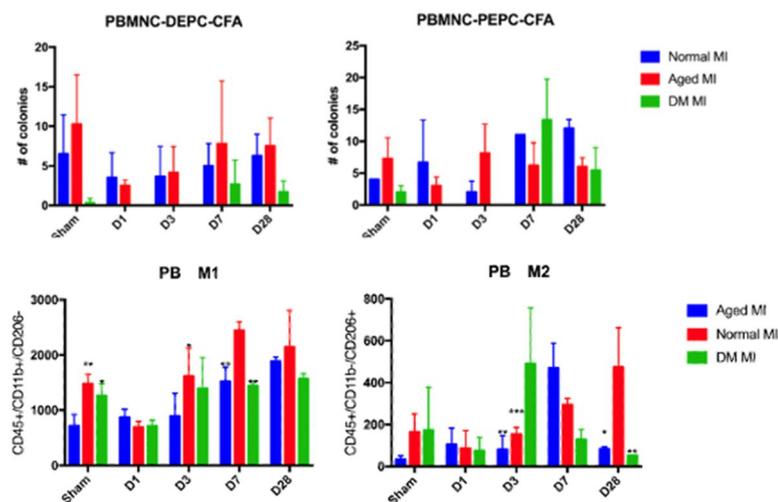
### 組織解析

心筋梗塞部位の組織免疫染色解析を行い、各時期の微小環境組織の病態評価、分離細胞データとの比較評価などを行った。

## 4. 研究成果

(1) 健常・糖尿病・高齢マウスの心筋梗塞後の流血中 EPC とマクロファージ phenotype を比較したところ、以下の所見が得られた。

【図1】

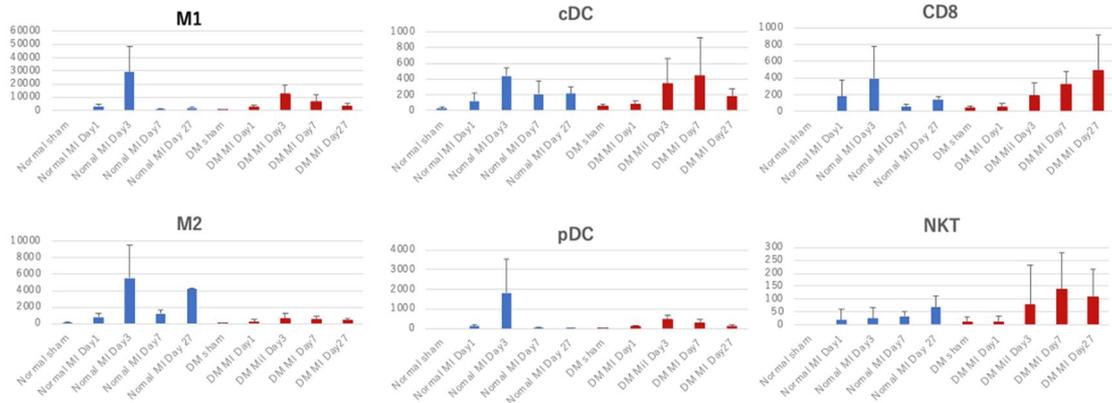


糖尿病心筋梗塞の造血系(PB, BM, Spleen)では、梗塞前後全期を通じてEPCコロニーが減少し、再生後期のM2マクロファージ増幅が欠如している(図1)。

老齢心筋梗塞の造血系(PB, BM, Spleen)ではでのEPCコロニー減少は観察されないが、再生後期のM2マクロファージ増幅が欠如している(図1)。

(2) さらに、健常・糖尿病・高齢マウスの心筋梗塞後の再生組織部位の細胞群でのEPCとマクロファージ phenotype を比較したところ、以下の所見が得られた。

【図2】



糖尿病心筋梗塞の再生環境部位では、マクロファージ M1, M2 両フェノタイプの細胞浸潤が全期で抑制されるが、M2 に比べ M1 マクロファージ優位である。また、炎症免疫制御型の pDC に比べ cDC 樹状細胞が優位であった。

糖尿病心筋梗塞の再生環境部位では、免疫炎症を誘導する CD8, NKT が再生後期に増幅した。

ただし、現場の MI 再生環境で、各機能細胞群（例えば EPCs, M1/M2, ）が組織的にどのように分布し、疾患ではどの細胞群の機能低下が起きているのか、どの分子・シグナル・代謝が原因であるかなど、メカニズムあるいは治療応用のへ解明に必須の課題が残ってしまい、次世代研究が必要である事を痛感させられた。（2022 年度基盤 C での継続研究で明らかにする予定である。）

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tanaka Rica, Ito Hirano Rie, Fujimura Satoshi, Arita Kayo, Hagiwara Hiroko, Mita Tomoya, Itoh Masayoshi, Kawaji Hideya, Ogawa Takasuke, Watada Hirotaka, Masuda Haruchika, Asahara Takayuki, Mizuno Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Ex vivo conditioning of peripheral blood mononuclear cells of diabetic patients promotes vasculogenic wound healing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STEM CELLS Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/sctm.20-0309	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Wolfien Markus, Klatt Denise, Salybekov Amankeldi A., Kawamoto Atsuhiko, Klopsch Christian, Kowallick Johannes T., Krebs Stefan, Nesteruk Julia, Reichenspurner Hermann, Ritter Christian, Stamm Christof, Tani-Yokoyama Ayumi, Blum Helmut, Wolkenhauer Olaf, Schambach Axel, Asahara Takayuki, Steinhoff Gustav	4. 巻 57
2. 論文標題 Hematopoietic stem-cell senescence and myocardial repair - Coronary artery disease genotype/phenotype analysis of post-MI myocardial regeneration response induced by CABG/CD133+ bone marrow hematopoietic stem cell treatment in RCT PERFECT Phase 3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 102862 ~ 102862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ebiom.2020.102862	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 McIntyre Brendan, Asahara Takayuki, Alev Cantas	4. 巻 -
2. 論文標題 Overview of Basic Mechanisms of Notch Signaling in Development and Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 9 ~ 27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-3-030-36422-9_2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 I T, Sumita Y, Yoshida T, Honma R, Iwatake M, Raudales JLM, Shizuno T, Kuroshima S, Masuda H, Seki M, Tran SD, Asahara T, Asahina I.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Anti-inflammatory and vasculogenic conditioning of peripheral blood mononuclear cells reinforces their therapeutic potential for radiation-injured salivary glands	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Res Ther	6. 最初と最後の頁 304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-019-1414-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nagata Eiichiro, Masuda Haruchika, Nakayama Taira, Netsu Shizuka, Yuzawa Hiroko, Fujii Natsuko, Kohara Saori, Sorimachi Takatoshi, Osada Takahiro, Imazeki Ryoko, Matsumae Mitsunori, Asahara Takayuki, Takizawa Shunya	4. 巻 9
2. 論文標題 Insufficient production of IL-10 from M2 macrophages impairs in vitro endothelial progenitor cell differentiation in patients with Moyamoya disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-53114-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kashiyama Noriyuki, Miyagawa Shigeru, Fukushima Satsuki, Kawamura Takuji, Kawamura Ai, Yoshida Shohei, Nakamura Yuki, Harada Akima, Masuda Haruchika, Toda Koichi, Asahara Takayuki, Sawa Yoshiki	4. 巻 14
2. 論文標題 Vasculogenically conditioned peripheral blood mononuclear cells inhibit mouse immune response to induced pluripotent stem cell-derived allogeneic cardiac grafts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0217076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0217076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Masuda Haruchika, Sato Atsuko, Shizuno Tomoko, Yokoyama Keiko, Suzuki Yusuke, Tokunaga Masayoshi, Asahara Takayuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Batroxobin accelerated tissue repair via neutrophil extracellular trap regulation and defibrinogenation in a murine ischemic hindlimb model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0220898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0220898	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kuroshima Shinichiro, Nakajima Kazunori, Sasaki Muneteru, I Takashi, Sumita Yoshinori, Asahara Takayuki, Asahina Izumi, Sawase Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Systemic administration of quality- and quantity-controlled PBMCs reduces bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw-like lesions in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-019-1308-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 T. Asahara
2. 発表標題 Current update of endothelial progenitor cell biology and medicine
3. 学会等名 International Society of Applied Cardiovascular Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅原孝之
2. 発表標題 血管内皮前駆細胞を用いた血管再生療法の開発
3. 学会等名 日本再生医療学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅原孝之
2. 発表標題 再生アソシエイト細胞の再生・抗炎症作用
3. 学会等名 日本炎症・再生医学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------