

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08589

研究課題名(和文) 心臓由来幹細胞の分化能を活性化する因子の同定と臨床応用への道のり

研究課題名(英文) Determine the factor(s) for enhancement of cardiac stem cell

研究代表者

松下 訓 (Matsushita, Satoshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20407315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：心臓には臓器特異的な幹細胞があることが報告されて久しいが、その働きや効果、機序などは不明な点が多い。本研究では実際の心疾患症例における組織を解析し、幹細胞の発現を賦活化する内因性因子を見出すとともに、それらを細胞導入することにより実際の幹細胞治療として有用かどうかを評価することを目的とした。約500例の組織解析を行ったところ、幹細胞は炎症により賦活化され同時に成長因子も活性化されることが示された。また心臓の発生に関与している遺伝子および心臓ホルモンとも関与しており、これらを導入することにより血管新生および幹細胞の活性化が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全に対する再生医療の臨床応用が始まるなか、その効果やどの細胞が最も有用かなど未だ不明な点が多い。近年、心臓にも自己再生能があり幹細胞が関与していることが報告されており我々は心臓由来の幹細胞を心筋再生に使用できれば最適な治療法として確立できると考えた。

本研究で幹細胞の賦活化に関する因子として炎症やホルモンにより活性化されること、また他の発生因子と相関することが示唆された。さらにこれらの因子の導入により血管新生が誘導されることが示唆された。これは新たな細胞種を用いた心不全治療の可能性を示すものであり、特に自己心臓組織を用いた治療は免疫抑制剤が不要など意義深い知見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：As the existence of cardiac stem cell has been reported, their functions, effects, and mechanisms remain unclear. In this study, we analyzed cardiac tissues to determine endogenous factors that activate the expression of the stem cell, subsequently, the transfection of these factors into cardiac outgrowth cell to analyze the effect. The cardiac tissue was obtained from the 504 patients during cardiac surgery. The cardiac stem cells were activated by inflammation accompanied with the elevation of some growth factors. In addition, the increase was associated with the expression of the cardiac transcription factors and cardiac natriuretic hormones. The induction of these factors induced angiogenesis and stem cell activation of the cardiac outgrowth cells.

研究分野：再生医療

キーワード：細胞治療 心筋幹細胞 血管新生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心臓には臓器幹細胞が存在すること、この細胞が心筋のターンオーバーに関係することが示され、心疾患に対する心筋幹細胞治療の研究が進められている。しかしその効果はいまだ満足いくものではない。その大きな理由の一つに、心筋幹細胞の分化能の低さが挙げられる。申請者らは心筋幹細胞の分化能を調節する因子として、心臓発生期における心臓特異的転写因子の可能性を考えている。実際にある一因子を心筋梗塞モデルマウスに投与したところ、心機能の回復効果がみられた。しかしその効果にはばらつきが大きく、またこの因子を心筋幹細胞に導入しても心筋への分化は不十分であった。その後の検討で心筋分化は周辺環境に影響されること、また複数の転写因子が系統的に関与している可能性が高いことが示唆された。

### 2. 研究の目的

心筋幹細胞の心筋分化を促す因子を特定するとともに、心筋分化に最適な周辺環境を検討、心臓の自己修復能力を賦活することにより心不全治療の早期の臨床応用とその確立を目指す。

### 3. 研究の方法

当院で施行された心臓手術症例において術中に左房組織が得られたものを対象とした。組織に含まれる炎症性サイトカイン、成長因子や心臓発生にかかわる転写因子の発現を RT-PCR 法にて測定し、各症例の患者背景と比較した。また組織の線維化を Masson's Trichrome 染色で定量化した。同時に組織の一部をもちいて explant 法にて組織由来の細胞を培養した。得られた細胞に含まれる幹細胞マーカー：c-Kit 陽性細胞の発現率をフローサイトメトリーで測定、残りの細胞の継代培養をおこなった。次に細胞にヒト心房利尿ホルモンである ANP および islet-1 を electroporation 法にて細胞導入を試みた。またリコンビナントタンパクを培地に混入し、14 日 (d14) まで培養を行った。d3、d7、d10、d14 のタイミングで細胞を剥離し、それぞれ免疫染色および遺伝子発現を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト組織と患者背景

504 例の左房組織の解析を行った。平均年齢=66.0 歳、うち女性は 181 例 (35.9%) であった。平均 BMI=23.2、NYHA=1.7 であった。高血圧は 296 例 (58.7%)、糖尿病 121 例 (24.0%)、脂質異常症 218 例 (43.3%) に合併していた。スタチンは 163 例 (32.3%) が服用していた。術前心エコーにおいて左房径は 42.5 mm、左室拡張/収縮末期径はそれぞれ 51.5/34.2、左室中隔厚/後壁厚は 10.2/10.2 mm、左室駆出率は 61.2% であった。

次いで組織解析を行った。それぞれの因子について幹細胞マーカーとして設定した c-Kit の発現と比較検討した。

- ・炎症性サイトカイン：多くの炎症性サイトカインが c-Kit の発現と正に相関していた (IL-1 (p <0.01), IL-2 (p <0.001), IL-6 (p <0.01), IL-10 (p <0.001), IL-17 (p <0.001), IL-33 (p <0.001) TNF- $\alpha$  (p <0.05))
- ・マクロファージ：CD11c (p <0.001), CD68 (p <0.001), CD206 (p <0.001) も正の相関を見せた。
- ・成長因子：IGF-1 (p <0.05), bFGF (p <0.001), VEGF (p <0.001), VEGF-R2 (p <0.001), TGF- $\beta$ 1 (p <0.001), TGF- $\beta$ 2 (p <0.001), TGF- $\beta$ 3 (p <0.001) と有意な正の相関を見せた一方で HGF の発現とは有意差はなかった (p=0.103)
- ・胎生期心臓特異的転写因子：GATA-4 (p <0.001), MEF2c (p <0.001), NKx-2.5 (p <0.01), islet-1 (p <0.001), HAND-2 (p <0.001), および TBX-18 (p <0.001) と正の相関を見せたが、HAND1 (p=0.196), TBX-5 (p=0.315), TBX-20 (p=0.155), IRX-4 (p=0.122) との相関はなかった。
- ・心臓由来ホルモン：ANP とは有意に正の相関をしたが (p <0.01) BNP との相関は見られなかった (p=0.161)
- ・その他：HIF-1 は発現に有意な相関はなかった (p=0.307)。またミトコンドリアのマーカーである因子のうち NRF-1 (p <0.001), ND6 (p <0.05) は有意差が見られた。なお ND6 は負の相関であった。PGC-1 (p=0.073) NDUFB-8 (p=0.319) は有意な相関がみられなかった。

#### (2) 細胞解析

上記の結果をもとに islet-1 と ANP を electroporation 法にて細胞導入を試みた。様々な導入条件にて試みたが、一部の細胞には高率に導入可能なものの同条件においても導入効率に大きな差が見られた。また細胞株によっても大きく異なっていた。これはこの細胞がヘテロな細胞群であり、導入条件に差異があることが考えられた。このため培地にリコンビナントタンパクを混入して培養を行った。条件設定を行ったところある濃度にて混入群と非混入群で有意な違いが得

られた。ANP 混入群では非混入群に比べて 1 週間後の細胞数が 17% 減少した。一方、ANP では細胞塊の形成が多くみられた。免疫染色を行ったところ細胞塊は CD31+/cKit+ であった。これは ANP により細胞の血管内皮への maturation が増加したことが考えられた。次に islet-1 のリコンビナントを同細胞に混入、その後低酸素チャンバーにて 1 週間培養を行った。1 週間後に TUNEL 染色にてアポトーシスの細胞数を総核数の比率で算出したところ、リコンビナントタンパク混入群で TUNEL 陽性細胞が 53% 減少していた ( $p < 0.05$ )。次いでラットの心筋梗塞モデルで梗塞エリアを解析したところ、リコンビナント細胞投与群で梗塞範囲が 23% 減少した。免疫組織染色では Ki67 陽性細胞が 30% 増加した。これらの結果から心筋傷害時に上昇する因子は、ヒト組織幹細胞を活性化するとともに抗アポトーシスの作用から心筋を保護する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	門口 智泰  (Kadoguchi Tomoyasu)  (10762049)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員   (32620)	
研究分担者	山本 平  (Yamamoto Taira)  (70301504)	順天堂大学・医学部・先任准教授   (32620)	

	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
研究協力者	横山 典彦  (Yokoyama Norihiko)		

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