

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590861

研究課題名(和文) 自律神経支配を有する「バイオペースメーカー」構築の試み

研究課題名(英文) Engineering of biological pacemaker with autonomic innervation

研究代表者

李 鍾國 (LEE JONG-KOOK)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：60303608

研究成果の概要(和文)：

神経栄養因子が、心筋細胞への交感神経軸索誘導に重要な役割を果たしていることが本課題研究で明らかとなった。このことは、神経栄養因子を適切に用いることにより、移植心筋細胞における自律神経支配を促すことが可能であることを示しており、バイオペースメーカー等の心筋再生治療における機能的再生心筋の構築を行う上で重要なステップになりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：

The present study showed that neurotrophic factors play important roles in axon guidance of sympathetic neurons to cardiomyocytes. The results suggest that appropriate use of neurotrophic factors enable autonomic innervations in transplanted cardiomyocytes. Thus, the technique may be an important step to engineer functional myocardium in myocardial regeneration therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心筋再生、バイオペースメーカー、自律神経、不整脈、細胞移植

1. 研究開始当初の背景

近年の細胞工学の進歩により、種々の幹細胞から心筋細胞などへの分化・誘導が可能となり、重症心不全治療への応用が関心を集めている。不整脈領域においても、徐脈性不整脈治療への新しいアプローチとして「バイオペースメーカー」に注目が集まっている。

バイオペースメーカー開発は、ES細胞由来胚様体などの移植により、心室のペ

ーシングが可能であったとの報告がなされている(Kehat et al. Nature Biotechnology, 2004; Xu et al. Circulation, 2005)、しかし、それらの実用化にあたっては多くの未解決の課題が残されている。

洞結節・房室結節などの生体本来のペースメーカー・刺激伝導系組織は、交感神経・副交感神経から緻密な制御を受け、心臓が生体と調和のとれた拍動をするこ

とを可能としている。今後「バイオペースメーカー」が徐脈性不整脈治療の一つの選択肢となるためには、自律神経支配の構築は必須と考えられる。しかしながら、現在まで再生心筋の自律神経支配に関する研究は、国内外を問わずほとんどなされていない。

2. 研究の目的

本研究課題においては、移植再生心筋と宿主側の交感神経間のネットワーク形成プロセスを調べ、自律神経支配を有する理想的な「バイオペースメーカー」を構築することを目的とする。本研究課題においては、以下の2点に焦点をおく：

(1) 心臓における交感神経伸長・神経-筋接合部形成のプロセスにおいて、種々の神経成長促進因子・神経成長抑制因子がどのような役割を果たしているかを調べる。

(2) 移植再生心筋（幹細胞由来心筋細胞）に対して、神経支配を構築するための基盤技術を開発する。

3. 研究の方法

(1) In vitro 実験

①心筋細胞培養

生体由来心筋細胞培養：新生仔ラットから心筋細胞を単離培養した。

②幹細胞由来心筋細胞培養：マウス iPS 細胞を hanging drop 法により胚様体に分化させ、その後自己拍動する心筋細胞を単離し培養する。上記と同様の方法で GDNF を発現させた。

上記①、②で得られた心筋細胞に、神経成長因子の一つである GDNF を、アデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、新生仔ラット上頸神経節由来交感神経細胞と共培養および近接培養し、神経突起の発現を、形態および機能両面から調べた。

(2) In vivo 実験：

①ラット除神経心モデルの作成：左室自由壁表面に cryoinjury を与えることにより、ラット除神経モデルを作成した。

② 除神経部位における神経栄養因子遺伝子導入：アデノウイルスを用いて GDNF を発現させ、周辺の生体心筋からの神経突起伸長の程度を調べた。

③ 培養心筋塊の除神経心への移植：上記(2)-①で作成された心筋除神経ラット（作成5日後）を、人工呼吸管理下に再開胸し、上記(1)-①で作成した培養

心筋を心臓に移植した。

(3)免疫染色：上記(2)-③で細胞移植を行ったラットから心臓を摘出し、免疫染色法にて、交感神経細胞の線維の伸長の様子を調べた。

4. 研究成果

(1) In vitro 実験

交感神経細胞と生体由来心筋細胞との共培養実験において、心筋細胞上に分布する神経突起密度を最も増加させたのは、glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) であった (Miwa et al. Biomed Res 2010)。また、交感神経細胞と生体由来心筋細胞を 1 mm の距離で近接培養を行い、neurofilament-M 陽性の神経突起密度を調べたところ、GDNF の神経突起伸長効果は nerve growth factor (NGF) より有意に増大していた。また、心筋細胞と神経突起が交差する部位での、シナプス膜蛋白の synapsin の面積は GDNF 添加群で有意に増大していた。さらに、電子顕微鏡による観察においても、GDNF 添加群においては、交感神経突起と心筋細胞間に神経-筋接合部が形成されているのが観察された。

また、交感神経細胞-生体由来心筋細胞の近接培養で交感神経作動薬のニコチンを添加したところ、あらかじめ GDNF を添加して培養していた群における、心筋細胞の自己拍動レートの増加率が NGF や非添加対照群よりも有意に増大していた。

また、交感神経細胞に近接して、GDNF をアデノウイルスで強制発現させた生体由来心筋細胞と対照心筋細胞を置いて培養したところ、交感神経細胞はほぼ GDNF 発現心筋細胞にのみ神経突起を伸長させた。

(図1)

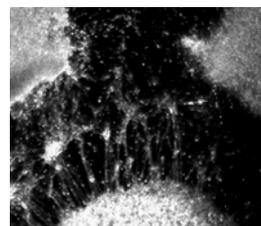


図1：GDNF 発現心筋細胞（ラット新生仔由来）による上頸神経節細胞の軸索誘導（左上方：GDNF 発現心筋細胞、中央下：神経細胞、右上方：対照細胞）

マウス iPS 細胞由来胚様体から自己拍動部位を単離し、自己拍動細胞の電気生理特

性を調べた。その結果、生体由来心筋細胞と同様に、イソプロテレノール添加で自己拍動数の増加がみられ、カルバコールで減少が見られた。アデノウイルスを用いてGDNFを強制発現させたiPS細胞由来心筋細胞を非発現対照細胞とともに、交感神経細胞に近接して培養したところ、交感神経細胞の神経突起はGDNF発現細胞に向かって伸長するのが観察された。(図2)

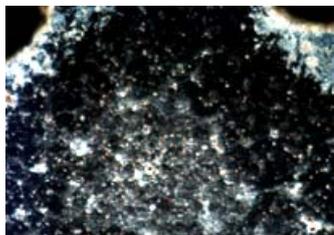


図2 GDNF発現心筋細胞(マウスiPS細胞由来)による上頰神経節細胞の軸索誘導(左上方:GDNF発現iPS細胞由来心筋細胞、中央下:神経細胞、右上方:対照iPS細胞由来心筋細胞)

以上のin vitro実験より、神経栄養因子を適切に作用させることにより、交感神経細胞から心筋細胞への神経突起(軸索)の誘導および機能的な接合が可能であることが示された。

(2) In vivo 実験:

成獣ラットの左室自由壁心外膜側に液体窒素で凍結したガラス棒によりcryoinjuryを起こし、心表面に除神経領域を作成した。その後、除神経領域中心部に、GDNF発現アデノウイルスを注入し、除神経領域に伸びる神経突起伸長の程度をneurofilament Mの免疫染色で調べ、非発現対照群と比較した。その結果、GDNF発現群においては、除神経領域に伸びる神経突起の密度が有意に増大していることが判明した。(図3)

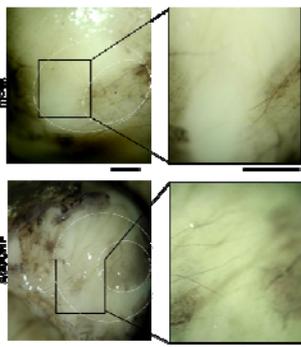


図3

局所的除神経心における神経突起再生とGDNFの効果。

上段:対照心(右は左図中枠部の拡大)

下段:GDNF発現心(GDNF発現アデノウイルスを局所注入)。

白色リング状部位はリング状の凍結ガラス棒を押しつけて作成した凍結傷害部位。対照群では、凍結傷害部位にneurofilament-Mが見られない除神経部位が見られたが、一方GDNF発現群(下段)では、同じ部位にneurofilamentの発現が観察された。

また、温度感受性培養皿を用い新生仔ラット由来培養心筋シートの作成を行い、あらかじめアデノウイルスを用いてGDNFを発現させた上で、上記除神経領域に心外膜側から貼付移植し、神経突起の伸長の程度を調べた。その結果、GDNF発現心筋シート移植群の移植心筋のtyrosin hydroxylase, growth associated protein 43 (GAP43)の遺伝子発現が有意に増大していた。

以上の結果から、神経栄養因子GDNFの使用により、in vivoにおいても神経突起の軸索誘導が可能であることが判明した。

本研究結果から、神経栄養因子を用いることにより、バイオペースメーカーに自律神経支配をもたらすことが可能と考えられた。

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4件)

①Miwa K, Lee JK, Takagishi Y, Opthof T, Fu X, Kodama I. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) enhances sympathetic neurite growth in rat hearts at early developmental stages. *Biomed Res* 2010;31(6):353-61.

②Hidaka K, Shirai M, Lee JK, Wakayama T, Kodama I, Schneider MD, Morisaki T. The cellular prion protein identifies bipotential cardiomyogenic progenitors. *Circ Res* 2010;106(1):111-9.

③Suzuki S, Ohkusa T, Sato T, Yoshida M, Yasui K, Miwa K, Lee JK, Yano M, Kodama I,

Matsuzaki M. Effects of aldosterone on Cx43 gap junction expression in neonatal rat cultured cardiomyocytes. *Circ J* 2009;73:1504-1512.

④ Kado M, Lee JK, Hidaka K, Miwa K, Murohara T, Kasai K, Saga S, Morisaki T, Ueda Y, Kodama I. Paracrine factors of vascular endothelial cells facilitate cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;377:2:413-418

[学会発表] (計 5件)

① Lee JK et al. 再生心筋への交感神経支配の確立. 日本心不全学会学術集会シンポジウム. 2010年10月8日. Tokyo, Japan.

② Miwa K, Lee JK et al. Axon guidance to induced pluripotent stem cell-derived cardiac cells by glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2010年3月5日. Kyoto, Japan

③ Miwa K, Lee JK et al. Axon guidance of sympathetic neurons to native and induced pluripotent stem (iPS) cell-derived cardiomyocytes using glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). Scientific Sessions 2009 America Heart Association.. 2009年11月17日. Orlando, USA

④ Miwa K, Lee JK et al. Axonal guidance for sympathetic neuron to cardiac myocyte by glial cell line-derived neurotrophic factor. The 25th Annual meeting of international society for heart research Japanese section. 2008年12月5日. 横浜

⑤ Takanari H, Lee JK et al. A novel technology to prevent proarrhythmia of myoblast transplantation: "Patterning" of cell alignment using magnetic nanoparticles. American Heart Association Scientific Session 2008. 2008年11月12日, New Orleans, LA, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李鍾國 (LEE JONG-KOOK)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
准教授

研究者番号 : 60303608

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :