

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09149

研究課題名(和文) 抗線維化作用を有する間葉系幹細胞による心筋梗塞後心機能低下の抑制

研究課題名(英文) mesenchymal stem cells with antifibrotic effect prevent impairment of cardiac function after myocardial infarction

研究代表者

高橋 信也 (Takahashi, Shinya)

広島大学・医系科学研究科(医)・教授

研究者番号：70423382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラット心筋梗塞モデルに対する骨髄由来MSC・脂肪由来MSCの治療効果の比較を検討した。ラット前下行枝結紮モデルでの心機能の評価を心エコーおよびPVループを用いて行うことは妥当と判断した。モデルの生存率が極めて低いため幾つかの改変を必要とした。呼吸管理ではマスク換気を高粘度ゲルにて気密とする方法を考案し死亡率は半減した。結紮モデルに対して、骨髄・脂肪由来MSC投与を含む4群にて比較検討を行った。脂肪由来MSCは死亡率が80%と高かった。またモデルの安定性が問題であった。同様のLAD結紮手技においても心筋梗塞量にばらつきがあり、前年までの検討の再検証が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラットないしマウスを用いた心筋梗塞モデルの実験系は広く行われているものの、ときに論文に認められる方法論の再現性が疑わしいことがあり、本研究での成果は今だ実験系の確立に至るまでの部分が多くを占めるが、これから実験を行う研究者における学術的意義は高いと考えられる。またその検討は始められたばかりと言わざるを得ないが、低酸素培養による間葉系幹細胞培養は、心筋梗塞の縮小効果を示す可能性があり、その研究を継続することは社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We compared the therapeutic effects of bone marrow-derived MSCs and adipose-derived MSCs on rat myocardial infarction models. We judged it appropriate to evaluate cardiac function in rat anterior descending artery ligation model using echocardiography and PV loop. Some modifications were required due to the extremely low survival rate of the model. For respiratory management, we devised a method to make mask ventilation airtight with high-viscosity gel, which reduced the mortality rate by half. A comparative study was conducted on the ligation model in 4 groups including bone marrow/fat-derived MSC administration. Adipose-derived MSCs had a high mortality rate of 80%. Another problem was the stability of the model. Even with the same LAD ligation procedure, there were variations in the amount of myocardial infarction, and it was considered necessary to re-verify the study up to the previous year.

研究分野：心不全治療

キーワード：心筋梗塞 間葉系幹細胞 低酸素培養 無血清培地

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞後の心機能低下は予後を規定する因子の一つであり、これを抑制する試みが続けられている。心機能が低下する一因として、心筋の線維化がある。線維化は心室の瘤化を防いでいると考えられると同時に、機能低下と瘤化のプロセスにも関わっている。我々は、以前より間葉系幹細胞：Mesenchymal Stem Cells (MSC) を用いて腎機能低下を線維化抑制と抗炎症作用の点から研究を続けている。研究分担者らも明らかにしているように、腎障害モデルに対する MSC の投与は、グルコースおよびアンジオテンシン II によって誘導される TGF- $\beta$  1 を抑制し、TGF- $\beta$  1 によって誘導されるリン酸化 Smad2 を抑制する。また、マクロファージのフェノタイプを炎症促進系 (M1) から免疫抑制系 (M2) に誘導して、炎症細胞浸潤の継続を抑制し、制御性 T cell を誘導することから、障害組織への炎症細胞浸潤を抑制することにより、腎臓への炎症細胞浸潤を抑制し、腎線維化を抑制する。心筋梗塞モデルに対する MSC の投与実験は多数行われているものの、抗炎症作用と線維化抑制の観点からの報告はない。また、MSC の効果はその投与経路による生着数の違いが影響することが知られている。

### 2. 研究の目的

本研究では、心筋梗塞モデルに対して MSC を投与することにより、MSC の心臓への生着数・生着期間が MSC の治療効果にどの程度関連するか、また、心筋梗塞に対する MSC の抗炎症作用と線維化抑制によって、心機能がどのように変化するかを明らかにするとともにそのメカニズムを解明する。

### 2. 研究の方法

- I. マウス心筋梗塞モデルに対する骨髄由来 MSC・脂肪由来 MSC の治療効果を比較する。  
10%胎児ウシ血清含有培地および無血清培地で培養した骨髄由来 MSC・脂肪由来 MSC を投与して、マウス心筋梗塞モデルにおける治療効果の比較を行う。  
10 週齢雄 SD マウスの冠動脈前下行枝を結紮し、その後、前下行枝領域に MSC ( $1 \times 10^6$  cells) を投与する。骨髄由来 MSC 投与群、脂肪由来 MSC 投与群、PBS 投与群となる。対象として、前下行枝を結紮しないモデルを用意する。3 日後に採取した心臓でアポトーシス (Bax, Bcl-2, Caspase-3) と程度を、1 週間後に採取した心臓で炎症細胞浸潤 (CD3, CD68, CD163) の程度を、ウエスタンブロットおよび免疫染色法を用いて評価し、それぞれのグループで比較する。3 日目、7 日目、2 週間目での心機能評価を心エコーにより行う。同様に、心臓のサイズの評価を術前と 7 日目、2 週目にマイクロ CT を用いて行う。運動能力評価を小動物用トレッドミルを用いて、3 日目、7 日目、2 週間目に行う。
- II. 骨髄由来 MSC・脂肪由来 MSC のアポトーシス抑制作用・抗炎症、抗線維化作用を比較する。  
10%胎児ウシ血清含有培地および無血清培地で培養した骨髄由来 MSC・脂肪由来 MSC と株化ミクログリア細胞を NO および薬剤によりアポトーシスを誘導したものとを共培養し、それぞれの Bax, Bcl-2, Caspase-3 発現をウエスタンブロット法および Real-time PCR 法を用いて評価し比較する。
- III. 骨髄由来 MSC・脂肪由来 MSC の表面抗原を比較する。  
骨髄由来 MSC・脂肪由来 MSC の表面抗原を BD Lyoplate Screening Panels Human Cell Surface Markers (BD Biosciences 社) を用いて網羅的に検索する。5 および 10 継代、10%胎児ウシ血清含有培地および無血清培地で培養した骨髄由来 MSC・脂肪由来 MSC を用いて検討する。表面抗原と、治療効果、抗線維化作用、抗炎症作用の強さとの関連を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### モデル作成に関して

マウス心筋梗塞モデルに対する骨髄由来 MSC・脂肪由来 MSC の治療効果の比較に関して、予備実験として、マウス心筋梗塞モデルの作成と心機能評価を行った。マウス心筋梗塞モデルは作成が難しいため(成功率 10-20%)。動物種をラットに変更して実験を継続した(40%~)。またモデルの生存率を上げる必要性があり、実験系における死亡原因は肺の膨張不良および酸素化不良にあると判断した。気管内挿管による換気では気道分泌が増加し、自発呼吸再開後に痰による軌道閉塞と考えられる死亡を経験するため、マスク換気を基本とした方法に変更した。マスク換気では気道内圧が低下するため、マスクの固定法の変更が必要であった。マスク換気を高粘度ゲルを用

いて気密とする方法を考案したところ、気道内圧が 300pa から 800p に上昇し、成績が改善した (死亡率 60% 30%)。この方法では気道分泌は増加しないため、有効な方法であると考えられた。

#### 心筋梗塞モデルの評価

ラット前下行枝結紮モデルでの心機能の低下の評価が心エコーおよび、PV ループを用いた評価を行った。ラット前下行枝が良好に結紮できたモデルにおいて、PV ループは著明に変化し EF が低下していることが確認可能であり再現性がある。

#### I マウス心筋梗塞モデルに対する骨髄由来 MSC・脂肪由来 MSC の治療効果

ラット心臓前下行枝モデルを用いて、前下行枝領域に MSC ( $1 \times 10^6$  cells) を投与した。骨髄由来 MSC 投与群、脂肪由来 MSC 投与群、PBS 投与群および sham の 4 群にて比較検討を行った。脂肪由来 MSC が想定外に死亡率が高く (死亡率 80%)、効果が低い印象があった。当院先行研究との比較検討から考えると、脂肪由来 MSC の使用に係る血栓症の可能性はある。

#### II 骨髄由来 MSC・脂肪由来 MSC のアポトーシス抑制作用・抗炎症、抗線維化作用の比較

骨髄由来の MSC に関して、抗炎症および抗線維化作用の検討を行った。無血性培地を用いて培養を行った。無血性培地を用いることにより、通常培養および低酸素培養にて TSG-6 の mRNA 発現が著明に増加することが示された。また、HGF の分泌は、無血性培地では十分とは言えなかったが、低酸素を併用することにより増加することが判明した。

#### 解決されていない問題

モデルに発生した心筋梗塞量は、同一手技においても個体および組織切片によって非常にばらつきが大きい。モデルに発生した心筋梗塞量に関して、van Gieson 染色による心筋梗塞部位の面積は同様の LAD 結紮手技においても違いが大きく心筋梗塞量の定量が必要であると考えられた。心筋梗塞量が決定してから MSC を投与するモデルに現在変更して、昨年までの検討が適切であったかどうかを再検証していく必要があると考えられた。このため、抗線維化作用を有する間葉系幹細胞による心筋梗塞後心機能低下の抑制が十分かどうかの検討は、低酸素培養にて結果が出る可能性があるものの、継続していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyamoto S, Soh Z, Okahara S, Furui A, Takasaki T, Katayama K, Takahashi S, Tsuji T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Neural network-based modeling of the number of microbubbles generated with four circulation factors in cardiopulmonary bypass	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 549
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80810-3	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 -

1. 著者名 Ishiuchi N, Nakashima A, Doi S, Kanai R, Maeda S, Takahashi S, Nagao M, Masaki T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Serum-free medium and hypoxic preconditioning synergistically enhance the therapeutic effects of mesenchymal stem cells on experimental renal fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Res Ther	6. 最初と最後の頁 472
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-021-02548-7	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 -

1. 著者名 Takao S, Nakashima T, Masuda T, Namba M, Sakamoto S, Yamaguchi K, Horimasu Y, Miyamoto S, Iwamoto H, Fujitaka K, Hamada H, Takahashi S, Nakashima A, Hattori N.	4. 巻 12
2. 論文標題 Human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells cultured in serum-free media demonstrate enhanced antifibrotic abilities via prolonged survival and robust regulatory T cell induction in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Res Ther	6. 最初と最後の頁 506
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-021-02574-5	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒瀬智之, 高橋信也, 大塚貴志, 中川 慧, 河原裕美, 弓削 類
2. 発表標題 損傷脊髄における模擬微小重力培養間葉系幹細胞の毛細血管への影響.
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022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
研究 分 担 者	中島 歩  (Nakashima Ayumu)  (40448262)	広島大学・医系科学研究科(医)・共同研究講座教授    (15401)	

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
---------	---------