

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790754

研究課題名(和文) 細胞シートを用いた心筋前駆細胞移植による梗塞後心筋修復の分子機序の解明

研究課題名(英文) The explore of the underlying molecular mechanisms of cardiac repair in cell sheet transplantation-mediated improvement of cardiac function

研究代表者

松浦 勝久 (MATSUURA KATSUHISA)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：70433993

研究成果の概要(和文)：成体マウス心臓より単離した Sca-1 陽性心筋前駆細胞を用いて細胞シートを作成し、心筋梗塞マウス心臓へ移植したところ、心臓機能の経時的な回復が観察された。Sca-1 陽性細胞は可溶性 VCAM-1 を発現し、可溶性 VCAM-1 はその受容体である VLA-4 を介して血管新生、心筋保護、Sca-1 陽性自身の遊走・生着を促進し、細胞シート移植による心臓機能回復を調節していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：When cardiac Sca-1 positive cells were isolated from the adult murine heart and were transplanted to infarcted heart as cell sheet, significant improvement of cardiac function was observed. Soluble form of VCAM-1 secreted from Sca-1 positive cells enhanced angiogenesis, cardioprotection, and migration of Sca-1 positive cells, which contributed to the improvement of cardiac function after cell sheet transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：再生医学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：細胞シート 心筋前駆細胞 パラクライン効果

1. 研究開始当初の背景

近年再生医療は次世代の治療法として世界中で研究が進められている。循環器領域においても虚血性心疾患を中心し、動物実験からヒト臨床試験に至るまで幅広く検討がなされている。従来移植された幹細胞の心臓局所における心筋細胞を含めた分化による細胞の補填が、細胞移植による心臓機能回復の主たる機序と考えられてきたが、近年移植細胞

由来の分泌蛋白を介したホスト臓器との相互作用によるパラクライン効果の重要性が報告されている。

一方、心臓への細胞移植に際して、細胞のデリバリーの方法も多岐にわたる。従来単一細胞浮遊液を経冠動脈的ないしは心筋への直接注入などが試みられているが、移植細胞の生着率の低さが大きな問題である。我々の施設では、以前より温度応答性高分子である

poly(N-isopropylacrylamide) (PIPAAm) を用いた温度応答性培養皿を基盤技術として細胞のシート化を可能にしている。これまでの種々の検討から細胞をシート化したのちに移植することにより、単一細胞浮遊液として移植するよりもより効率的に移植細胞が生着することが明らかとなっており、細胞シート技術を用いることで、長期にわたる細胞移植による心臓機能回復効果およびその機序の検証が可能となっている。

2. 研究の目的

近年我々のグループを含め複数の施設より成体心臓内に、心筋細胞に分化しうる心筋幹/前駆細胞の存在が報告され、心筋再生医療における細胞ソースとして大変注目されている。一方で移植細胞のソースとして使用した際の効果、およびその機序については不明である。これまでの検討により温度応答性培養皿を用いて心筋前駆細胞シートを作成し、移植することにより、心臓機能回復効果が確認されていることから、今回その分子機序を明らかにすることを目的として、下記の研究を行った。

3. 研究の方法

- (1) 成体マウス心臓よりマグネットビーズを用いて Sca-1 陽性細胞を単離し、限外希釈法にてクローナルな Sca-1 陽性細胞株を樹立する。
- (2) 心筋選択的遺伝子発現および分化誘導後の心筋蛋白の発現を確認する。
- (3) 温度応答性培養皿への播種により細胞シート回収する。
- (4) 心筋梗塞マウスを作製後、細胞シートを移植し経時的な心機能を心エコー検査および心臓カテーテル検査を用いて評価する。
- (5) 移植細胞の生着を免疫組織学的に評価する。
- (6) 同数の心筋前駆細胞、脂肪間葉系細胞を無血清培地で培養後、培養上清を回収し、サイトカイン抗体アレイにより分泌蛋白の差異を明らかにし、心筋前駆細胞により多く発現する蛋白を同定する。
- (7) 心筋前駆細胞培養上清による血管新生促進効果を、血管内皮細胞の遊走、管腔構造促進能の評価により検討する。
- (8) 心筋前駆細胞培養上清による心筋細胞保護効果を、過酸化水素添加後の新生仔ラット心筋細胞を用いて MTT assay により評価する。また培養上清による心筋細胞内シグナル伝達機構を明らかにする。
- (9) 心筋前駆細胞培養上清による心筋前駆細胞自身の遊走促進効果について評価する。
- (10) 心筋前駆細胞シート移植後に、心筋前駆細胞特異的分泌蛋白に対する抗体を投

与し、細胞移植による心臓への効果と分泌蛋白との関連を明らかにする。

4. 研究成果

近年、成体の心臓にも心筋細胞に分化しうる未分化な細胞が存在することが報告されている、我々も、成体マウス心臓より単離した Sca-1 陽性細胞が *in vitro* で心筋細胞に分化することを報告している。しかし、成体マウス Sca-1 陽性細胞は、心筋選択的転写因子である Nkx2.5 および GATA4 を発現するものの、造血系細胞や血管内皮細胞なども混入した細胞集団であるため、心筋前駆細胞としての Sca-1 陽性細胞の数は非常に少ない。したがって、心筋前駆細胞としての Sca-1 陽性細胞を細胞移植のソースとして使用するに際しては、体外で増幅する必要がある。そこで、*in vitro* にて Sca-1 陽性細胞の増幅・クローニングを試みた結果、豊富な増殖能を有し、かつ Nkx2.5 及び GATA4 を恒常的に発現する Sca-1 陽性の心筋前駆細胞株 (CPC) の樹立に成功した。この細胞は、梗塞心への直接移植により心筋細胞への分化が確認されたことから、移植細胞として有用と考えられる。しかし心筋への直接移植では、移植 1 週間後には、すでに 9 割の細胞が消失するから、心臓機能への効果発現には、より移植効率の高い移植法が必要と考えられた。そこで我々は細胞工学的手法を用いて、心筋前駆細胞シートを作成することとした。CPC を 3.5cm の温度応答性培養皿に播種し、37 度で 5 日間培養後、コンフルエントとなったことを確認した後、20 度でさらに 2 時間培養を継続することで、単層の細胞シートを回収することができた。そこで、心筋前駆細胞による梗塞心の再生能を検討するために、非移植群、CPC シート群、また、すでに心臓機能改善効果が報告されている脂肪間葉系細胞 (ATMC) シート群の 3 群に分けて検討を行った。野生型マウスの左前下行枝を結紮することにより心筋梗塞を作成し、この梗塞部を覆うように単層の細胞シートを各々移植した。

CPC シート群では、移植 3 週目以降に、他の 2 群に比して有意に左室拡張末期径、左室収縮末期径の拡大抑制及び左室短縮率の改善効果を示した。一方、ATMC シート移植群では、移植 1 週目には他の 2 群に比して有意に左室径の拡大抑制、左室短縮率の低下抑制効果を認めしたが、その効果は一時的で、その後徐々に径の拡大、左室短縮率低下を示し、移植 4 週目には、非移植群と同等に至った。したがって、移植細胞の相違により心臓機能への効果出現時期にも相違が生じることが明らかとなった。次に、細胞シート移植による血管新生効果について検討した。CPC シート移植群では、移植 4 週目において、非移植群、

脂肪間葉系細胞シート移植群に比して有意に血管数の増加が認められた。

次に、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、CPC と ATMC の梗塞心への生着を評価した。移植 4 週目では、多くの RFP 陽性の CPC が障害部において確認されたが、ATMC では、健常部、障害いずれにも生着は確認されなかった。Western blot にて、移植後の細胞の生着率を定量化すると、CPC シート移植群では、移植 4 週目の段階で、移植時の約 2 割の細胞が生着していたのに対して、ATMC では、わずか 0.8% の細胞が生着しているに過ぎなかった。また、生着した CPC の約 3 割が、明瞭なサルコメア構造を呈し、かつ sarcomeric α -actinin を発現しており、一方、他の 3 割の細胞は、管腔構造を呈しており、血管への分化も確認された。移植細胞の生着率及び生着した細胞の心筋分化の効率より、CPC の移植により、マウス心臓中の心筋細胞の約 5% を新たに創生したものと推察される。

細胞移植に伴うパラクリン効果

近年、細胞移植による梗塞心の心機能改善効果の一機序として、移植細胞の分泌する増殖因子の関与が報告されている。CPC も、ATMC に比して、移植後の生着率が高いことより、CPC が分泌する因子を介して、血管新生、心筋保護はもちろんのこと、CPC 自身の生着率を向上させることで、その因子の発現は維持され、結果生着した CPC からの心筋細胞や血管への創生に寄与していると考えられる。そこで、CPC 及び ATMC の培養上清を用いて、サイトカイン抗体アレイを行い、CPC において発現の多い因子の同定を行った。その結果、CPC においては可溶性 VCAM-1 の発現が ATMC に比して多いことが確認された。

CPC の培養上清を添加することにより、血管内皮細胞の遊走及び管腔形成能が促進された。可溶性 VCAM-1 は、すでに血管内皮細胞の遊走を促進することが報告されている。そこで VCAM-1 特異的 miRNA ベクターを作成後、CPC に遺伝子導入し、再度培養上清を回収し、血管内皮細胞に添加したところ、CPC 培養上清による血管内皮細胞の遊走、管腔形成能促進効果が抑制されたことから、CPC は自身の分泌する可溶性 VCAM-1 により血管新生促進効果を示すことが明らかとなった。一方、CPC 培養上清は、過酸化水素添加に伴う心筋細胞死を抑制し、また CPC 自身の遊走も促進することが明らかとなっている。

可溶性 VCAM-1 は、VLA-4 ($\alpha 4 \beta 1$ インテグリン) のリガンドであり、VLA-4 の下流には、細胞生存、増殖、遊走に関連する蛋白である Akt、ERK、p38MAPK が存在する。新生仔ラット心筋細胞に可溶性 VCAM-1 を添加すると Akt、ERK、p38MAPK のリン酸化が亢進した。また CPC の培養上清を添加すると、可溶性 VCAM-1

添加時と同様に Akt、ERK、p38MAPK のリン酸化亢進が確認され、この効果は VLA-4 の中和抗体添加によって抑制された。CPC 培養上清添加に伴う心筋細胞死抑制効果は、Akt 阻害剤、ERK 阻害剤、p38MAPK 阻害剤いずれの添加においても消失したことから CPC 移植に伴うパラクリン効果として、CPC の分泌する可溶性 VCAM-1/ VLA-4 シグナルを介する心筋細胞死抑制効果の関与が示唆された。CPC の p38MAPK は、通常の培養状態においても、リン酸化状態であることが確認されたが、このリン酸化は可溶性 VCAM-1 の添加により更に亢進し、一方 VLA-4 の中和抗体のみの添加により顕著に p38MAPK のリン酸化は抑制される。さらに CPC の遊走は、可溶性 VCAM-1 添加により促進されるが、p38MAPK 阻害剤の添加によって有意に抑制されることから、CPC は、自身の分泌する可溶性 VCAM-1 によりオートクリン的に VLA-4 を介して p38MAPK を活性化し自身の遊走能を促進している可能性が示唆された。

CPC シート移植後に、VLA-4 の中和抗体の投与を行うと、移植細胞の生着が著しく減少し、血管新生の抑制と相まって、細胞シート移植に伴う心機能改善効果が消失することが明らかとなっている。以上より CPC をシート移植することにより、心筋細胞、血管への分化も認められる一方、可溶性 VCAM-1/ VLA-4 を介した血管新生、心筋細胞死抑制効果、CPC 自身の遊走、生存促進効果により梗塞後心筋の修復が得られるものと考えられる。

以上より、Sca-1 陽性心筋前駆細胞はその分泌する VCAM-1 を介して血管新生、心筋保護効果を示して心臓の修復を図るとともに、自身の遊走・生着率の向上を促進し、更なる VCAM-1 を介した作用の増強、そして生着率が改善することによる心筋細胞や血管内皮細胞への分化も相まって、統合的に心筋梗塞後の心筋修復に寄与するものと考えられた。

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 3 件)

① Katsuhisa Matsuura, Nobuhisa Hagiwara, The pleiotropic affects of ARB in vascular endothelial progenitor cells. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 9, 153-157, 2011 査読あり

② 松浦勝久、岡野光夫 細胞シート工学からみた再生医療, 再生医療, 10 巻, 12-24, 2011 査読無し

③ Katsuhisa Matsuura et al. (他 10 名、1 番目), Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice, *The journal of Clinical*

Investigation, 119, 2204-2217, 2009 査読あり

〔学会発表〕(計13件)

①松浦勝久, Vascular network formation in cell sheet transplantation and bioengineered three-dimensional tissues, 第18回日本血管生物医学会, 2010.12.3, 大阪

②Katsuhisa Matsuura, The importance of VCAM-1/VLA-4 signaling pathway on the paracrine effects of cardiac Sca-1 positive cell sheet transplantation of the infarcted heart. AHA scientific Session 2010, 2010.11.15, Chicago, USA

③松浦勝久, The novel regulatory mechanisms of cellular function in cell therapy for heart failure, 第14回日本心不全学会, 2010.10.8, 東京

④松浦勝久, The novel paracrine mechanisms in cardiac progenitor cells and bone marrow mononuclear cell transplantation to heart failure, 第74回日本循環器学会学術集会, 2010.3.6, 京都
〔図書〕(計1件)

松浦勝久, 中外医学社, Annual Review 循環器 2011(細胞治療によるパラクライン効果), 2011, p27

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 勝久 (MATSUURA KATSUHISA)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号：70433993