

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12681

研究課題名(和文) ヒト皮下脂肪間質細胞を用いた拍動心筋細胞の心不全治療応用へ向けた研究

研究課題名(英文) Development of therapeutic application of beating cardiomyocytes derived from human adipose tissue for treating heart failure

研究代表者

高島 伸一郎 (Takashima, Shinichiro)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：60547165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：待機外科手術患者を対象に、手術時に生じた余剰皮下脂肪を採取。コラゲナーゼ処理ならびに遠心分離によりヒトSVFを得た。培養ディッシュにSVFを播種後、第7日目にレンチウイルスベクターを用いて、“心筋誘導遺伝子”MEF2Cを導入し28日後に解析を行った。ヒトSVFへのMEF2c単独の導入は、拍動心筋細胞への分化誘導効果を認めなかった。マウスとヒトのSVFの違いとして、1)ドナーの皮下脂肪の質の違い、2)種の違いによるkey遺伝子の違いが考えられた。ラット慢性虚血性心不全モデルにおける“心筋分化誘導遺伝子導入”SVF投与の心機能改善効果を明らかにする計画は現在も継続中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は、マウスのSVFを自律拍動心筋細胞(Beating SVF)に再現性をもって分化させる実験系の確立に成功し、Mef2cが心筋分化を制御することを明らかにした。本研究は、安全で汎用性が高い生体材料(SVF)に、遺伝子導入を行うことにより新しい治療的付加価値が与えられることを示すことで、慢性重症心不全をターゲットとした新規心筋再生治療開発へ繋がる研究と位置づけられる。

研究成果の概要(英文)：Subcutaneous fat tissue was collected from patients undergoing elective surgery. Fat tissue was digested using collagenase and centrifuged to isolate human SVF. After seeding SVF on a culture dish, the "myocardial induction gene" MEF2C was transduced using a lentiviral vector on day 7 and analyzed on day 28. Transduction of MEF2c alone into human SVF did not induce differentiation into beating cardiomyocytes. The different findings in transdifferentiation of SVF between mice and humans were attributed to 1) reduced quality of the subcutaneous fat of the donor due to aging and metabolic diseases and 2) interspecies differences in key genes. Plans are ongoing to clarify the cardiac function-improving effect of "myocardial differentiation-inducing gene transfer" SVF administration in a rat model of chronic ischemic heart failure.

研究分野：循環器内科学

キーワード：皮下脂肪間質細胞 心筋分化 再生治療

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮下脂肪組織の間質に存在する幹細胞群(皮下脂肪間質細胞: SVF)は、血管、軟骨、乳房などの臓器再生治療に応用され臨床研究で安全性および有効性が示されてきている。SVFを心筋梗塞急性期に冠動脈内に投与すると、SVFから放出される抗炎症性サイトカインの作用により梗塞巣が縮小し左室機能の低下を抑制する効果を示す(Takashima, Heart 2013; 99(23):1772-1784)。一方、慢性期重症心不全においては心筋細胞量が減少しているため、細胞治療による心機能改善効果を引き出すためには、心筋を新たに生み出す戦略が必要である。しかし、これまでに報告された内外の多くの研究の結果、皮下脂肪をはじめとする体性幹細胞を「自律拍動する心筋細胞集塊」へ分化させることは困難であると考えられてきた。申請者は、様々な培養条件を試した結果、マウスのSVFを非誘導下に自律拍動心筋細胞(Beating SVF)に再現性をもって分化させる実験系の確立に成功した。このBeating SVFは、心筋に特異的に発現するTroponin T、受容体を発現し、同期収縮特性を有する。Beating SVFは胎児心筋細胞(生理的心筋)と高い相同性を示す。Beating SVFの網羅的遺伝子発現解析の結果から、マウスのSVFをBeating SVFに分化誘導させるkey geneとして転写因子Mef2cを抽出した。レンチウイルスベクターを用いてSVFにMef2cを過剰発現させると拍動細胞数(Beating SVF)、心筋サルコメア遺伝子(Cardiac troponin T)の発現が増加し、Mef2cの発現抑制により増幅効果が完全にキャンセルされることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、心筋への分化誘導を促進させるMef2c遺伝子導入SVFが、重症慢性心不全に対する新しい細胞治療ソースとなる可能性を明らかにするため、以下の基礎研究と臨床サンプルを用いた研究を計画した。基礎研究では、慢性心不全モデル動物でMef2c遺伝子導入SVFの心機能改善治療効果を明らかにすること、また臨床サンプルを用いた研究では、ヒトSVFにMEF2C遺伝子を導入し拍動心筋へ分化することを確認し、分化効率を左右する背景因子について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1. ラット慢性虚血性心不全モデルにおける“心筋分化誘導遺伝子導入”SVF投与の心機能改善効果の検討

心筋の分化を見るためにMHC-GFPマウスを用い、皮下脂肪からSVFを採取し、*in-vitro*でPBS, SVF, SVF+Mef2cの3群に分け、細胞播種後第5日目にそれぞれの「心筋分化誘導遺伝子」をレンチウイルスベクターを用いて導入する。24時間後、通常培地に置換しday 10に回収、PBSにて洗浄しgenetically-primed SVFを得る。野生型ラットに全身麻酔下で左前下行枝近位部の30分結紮虚血再灌流モデルを作成し、4週後にgenetically-primed SVF(10,000個/300g)を心筋虚血リスク領域の心筋内に直接投与する。細胞投与4週、8週後に心機能評価(心エコー)組織評価(梗塞範囲、投与細胞の心筋分化(GFP陽性率:蛍光免疫染色)を行い、心筋分化誘導遺伝子導入SVFの心機能改善効果、ホストにおける移植後*in-vivo*心筋分化効率を評価する。

2. ヒト臨床皮下脂肪サンプルを用いて、ヒトSVFを拍動心筋細胞に分化誘導させる方法の確立

待機外科手術患者を対象に、インフォームド・コンセントを取得し、手術時に生じた余剰皮下脂肪7g(2cm³)を採取。コラゲナーゼ処理ならびに遠心分離によりヒトSVFを得る。培養ディッシュにSVFを播種後、第5~7日目にレンチウイルスベクターを用いて、マウスにおける検討で明らかにした“心筋誘導遺伝子”MEF2Cを導入。28日後に分化誘導を確認する。

3. 拍動心筋様細胞分化の経時的遺伝子発現変化についての解析(当初の計画にはなかった検討)

8週齢マウスの鼠径部からSVFを採取し、拍動心筋様細胞が出現する条件で培養し、初代培養のday 0(播種前) day 3, day 7, day 14, day 21, day 28および継代培養(1継代)のday 28においてRNAを抽出し、初代培養における経時的な遺伝子発現変化および継代による遺伝子発現の変化をRNA-sequencingによる網羅的発現解析を用いて調べる。

4. 研究成果

1. MHC-GFPマウスの繁殖が当初の予定通り進まなかった。予備検討にてSVF由来の拍動心筋細胞のMHC発現が弱いことが判明した。よって使用マウスをcardiac troponin T(cTnT)依存性-tdTomato発現マウスに変更した。新たなマウスの購入、繁殖が必要となったため、本検討は研究期間内に終了しなかったが継続していく予定である。当初の計画を変更し、拍動心筋細胞の拍動心筋分化メカニズムを明らかにする検討を行うこととした(上述:方法3)。

2. 外科手術患者から供与された皮下脂肪組織より SVF を抽出し初代培養を行い、第 5~7 日目にレンチウイルスベクターを用いて MEF2C を導入した。マウスと同じプロトコルでは拍動心筋細胞は誘導されなかった。この原因として 1) ヒトとマウスでは拍動心筋誘導のための至適培養条件が異なる可能性、2) ヒトの SVF ドナーは高齢の心血管疾患患者であったことから、SVF の分化能が低下していた可能性、3) ヒトとマウスでは拍動心筋分化誘導に必要な遺伝子が異なる可能性が考えられた。

3. マウス SVF の初代培養において、拍動心筋様細胞が出現する day 7 と day 14 の間で SVF の遺伝子発現パターンが著しく変化した。心筋トロポニン T は day 3 から徐々に増加した。初代培養 day 28 と継代培養 (1 継代) の day 28 で心筋トロポニン T の発現に変化はなかったが、心室筋関連遺伝子の発現は継代培養で減少した。経時的網羅的遺伝子発現の群比較解析およびパスウェイ解析の結果、SVF の拍動心筋分化に関与する可能性のある遺伝子候補をピックアップした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高島 伸一郎
2. 発表標題 臨床医の視点から取り組む基礎研究
3. 学会等名 日本循環器学会 第160回当東海・第145回北陸合同地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高島伸一郎、薄井莊一郎、高村雅之
2. 発表標題 遺伝子導入脂肪組織幹細胞による新しい心筋再生治療の開発
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 1新庄祐介、高島伸一郎、薄井莊一郎、高村雅之
2. 発表標題 皮下脂肪由来間質細胞の拍動心筋様細胞への分化における経時的遺伝子発現変化の解析
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年～2024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	薄井 莊一郎 (Usui Soichiro) (50507043)	金沢大学・医薬保健研究域医学系・准教授 (13301)	

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