

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390156

研究課題名(和文) 心筋前駆細胞/ナノファイバー複合体移植による心筋再生機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of cardiac regeneration after transplantation of a complex of cardiac progenitor cells and nanofiber

研究代表者

永井 敏雄 (NAGAI, TOSHIO)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00334194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：心血管再生治療、なかでも細胞移植治療は新しい心不全治療法として脚光を浴びているが、その効果の詳細な機序は不明である。我々は、自己組織化ナノペプチドPuraMatrix™を用いたマウス心筋前駆細胞移植モデルを用いて、抗炎症作用を有する心筋前駆細胞分泌因子soluble junctional adhesion molecule-A (JAM-A)が、心筋梗塞後のリモデリング抑制効果の一部を担うことを解明した。また、新生心筋を評価するための遺伝子改変マウスを用いて、leukemia inhibitory factorおよび心筋前駆細胞移植のそれぞれが心筋再生効果を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cardiac cell therapy has been proposed as one of the new strategies against heart failure; however, the mechanisms of the beneficial effects are largely unknown. We found that soluble junctional adhesion molecule-A (JAM-A), which is secreted from transplanted cardiac progenitor cells, prevent cardiac remodeling and reduce fibrosis area after myocardial infarction. In addition, by using a genetic fate-mapping model, we found that both leukemia inhibitory factor and transplantation of cardiac progenitor cells stimulate endogenous cardiomyocyte renewal after myocardial infarction.

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：分子心臓学 心臓前駆細胞 内在性心筋幹細胞 細胞移植 パラクライン因子

1. 研究開始当初の背景

生活習慣の欧米化にともない、我が国では高血圧、心筋梗塞などの動脈硬化性疾患が増加し、心疾患は日本人の死亡原因の第2位を占めている。しかし、薬物治療、外科治療、循環補助装置の進歩にもかかわらず、重症心不全の生存率は3年で約30%とその予後は極めて不良であり、心血管再生治療は新しい治療法として脚光を浴びている。

心血管再生治療、なかでも細胞移植治療は早期から研究され、自家移植可能な骨格筋芽細胞や骨髄細胞を使用した細胞移植治療の臨床試験が欧米で行われた。急性心筋梗塞患者の冠状動脈から自家骨髄単核球細胞を注入した臨床試験では、心機能改善効果は報告間で一致を見ず (N Engl J Med. 355; 1274-7: 2006)、また、重症虚血性心不全患者に対する自家骨格筋芽細胞移植の臨床試験では左室拡大予防効果と、駆出率で3%程度の左室機能改善を認めたと過ぎなかった (Circulation. 117:1189-200 2008.)。実際、移植細胞の生着率は低く、また、移植細胞中の未分化幹細胞が心筋細胞に分化して心筋を直接再生するという従来の考えは疑問視されている (Prog Cardiovasc Dis 49; 396-41: 2007)。また、移植細胞から放出されるパラクリン因子の重要性が示唆されているが、その詳細は不明である。我々は、これまでに、心筋細胞の分化機序を解明するために心筋に内在する幹/前駆細胞に着目し、心臓の Stem cell antigen-1 (Sca-1) 陽性細胞、および心筋幹細胞分画である side population (SP) 細胞を心臓から単離培養し、オキシトシンやトリコスタチン A により自律拍動する心筋細胞に分化させることに成功した (J Biol Chem 279; 11384-91: 2004, J Cell Biol 176; 329-41: 2007)。また、我々は、心筋 Sca-1 陽性細胞から、Sca-1、NKX2.5、GATA4 を恒常的に発現する心筋前駆細胞株を確立し、この心筋前駆細胞は可溶性 VCAM-1 をパラクリン因子として分泌して梗塞後のリモデリングの抑制に寄与していることを明らかにした (J Clin Invest 119; 2204-2217: 2009)。自己組織化ナノペプチド PuraMatrix™ は 5nm のオリゴペプチドで、生分解性、非免疫源性に優れ、実質臓器の3次元組織再生に有用な細胞移植床である (Proc Natl Acad Sci U S A. 103; 5054-9: 2006, Cell Transplant. 15; 903-10: 2006)。我々は、3次元移植床を形成する PuraMatrix™ の特性を心筋組織再生へ応用するために、マウス心筋梗塞モデルの心筋傷害部位へ PuraMatrix™ と細胞の複合体を移植した。その結果、心筋前駆細胞は、骨髄単核球細胞、骨格筋芽細胞および脂肪間葉系細胞に比較して梗塞範囲を有意に縮小した。したがって、PuraMatrix™ と心筋前駆細胞移植モデルは細胞移植方法の効率を改善するのみならず心筋組織再生の機序を解明するため有用であると考えられた。

細胞移植治療により、虚血または非虚血性の重症心不全患者の心機能を長期にわたり保つためには、有用な移植細胞ソースの選択と多数の細胞を長期間生着させる細胞移植方法が必要である。PuraMatrix™ を用いた心筋前駆細胞移植方法は、細胞移植治療の有効性の機序の解明を突破口として、新たな創薬、組織工学技術等へ昇華させる手段の一つになり得ると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 心筋前駆細胞移植効果の機序の解明

心筋前駆細胞上清からの心筋保護活性蛋白の液体クロマトグラフィーによる分離と同定

心筋前駆細胞、脂肪間葉系細胞、骨格筋芽細胞、骨髄単核球細胞の培養上清および、移植心筋組織の蛋白発現解析比較による cSca-1 細胞特異的分泌因子の解明とその効果の解析

心筋前駆細胞移植によるホスト心筋幹細胞の増殖・分化促進効果と心筋細胞再生効果の in vivo における解析

(2) ペプチド修飾 PuraMatrix™ による細胞移植効果向上と PuraMatrix™ による drug delivery system の構築

3. 研究の方法

(1) 心筋前駆細胞 CM 中の細胞保護蛋白の同定

心筋前駆細胞 CM は subconfluent となった心筋前駆細胞を無血清状態で 24 時間培養して得た。次に、新生仔ラット心筋細胞を単離培養して 24 時間後に無血清とし、各分画の凍結乾燥成分を加えた培養液で培養した後、0.1mM の H₂O₂ を 24 時間作用させ、細胞保護効果を MTT assay にて行った。心筋細胞保護が認められた分画は液体クロマトグラフィーにより再分画化し、同様に細胞保護活性の検定を行った。上記を 4 回繰り返して精製した分画に対して質量分析を行った。

(2) 心筋前駆細胞特異的パラクリン因子の同定

心筋前駆細胞、初代培養の骨格筋芽細胞、脂肪間葉系細胞、骨髄単核球細胞より無血清 CM を採取し、分泌されたサイトカインを Mouse Cytokine Antibody Array (RayBiotech Inc) により測定した。分泌サイトカインの量は Gene Pix 4000B (Molecular Devices, Inc) により定量した。

(3) 細胞移植モデル

10-12 週令の C57/BL/6J マウスに 50mg/kg の sodium pentobarbital を腹腔内注射して人工呼吸器下に左前下行枝を結紮し急性心筋梗塞モデルを作成した。1) 心筋梗塞作成直後に心筋前駆細胞と PuraMatrix™ 複合体を心筋内に注入、および、心筋表面に塗布して

ゲル化させた。2) PuraMatrix™ 内で心筋前駆細胞を約 4 週間 3 次元培養して作成した心筋前駆細胞移植床をマウス心外膜腔に移植した。

(4) 遺伝子改変マウス

ミオシン重鎖プロモータータモキシフェン誘導 Cre リコンビナーゼ発現マウス (Circ Res 89; 20-25: 2001) と CAG-CAT-LacZ マウス (Biochem Biophys Res Commun 237; 318-324: 1997) を交配して -MHC MerCreMer/CAG-CAT-LacZ マウスを作成した。戻し交配によりマウスの遺伝子背景は C57/BL/6J とした。

(5) leukemia inhibitory factor cDNA 遺伝子導入方法

心筋梗塞作成直後に体重 20g あたり 100 μ L の PBS に溶解した 100 μ g の leukemia inhibitory factor (LIF) cDNA プラスミド (Circulation 108; 748-753: 2003) をマウス大腿部の骨格筋に注射した。対照として同量の PBS を同腹のマウスに注射した。

(6) 核酸類似体による細胞標識方法

BrdU または EdU (50mg/kg, i.p.) を胎生期の細胞標識を目的として、妊娠 16-18 日のマウスに腹腔内注射した。また、心筋梗塞後の分裂細胞を標識するために、同量の BrdU または EdU を梗塞作成後 9 日目まで腹腔内注射した。

(7) SP 細胞単離および免疫染色

マウス心臓 SP 細胞は既報の方法で単離した (Methods Mol Biol. 1036; 63-74: 2013) SP 細胞の免疫染色は、CytoSpin Cytocentrifuge (Thermo Scientific) を用いてスライドグラスに接着後、4% パラフォルムアルデヒド内で 10 分間固定し、2% ロバ血清、2% 牛血清アルブミン、0.2% Nonidet P-40 (nacalai tesque) を含む PBS 内で 30 分間ブロッキング処理後に行った。

(8) 免疫組織染色

新鮮凍結切片は 4% パラフォルムアルデヒド内で 10 分間固定し、2% ロバ血清、2% 牛血清アルブミン、0.2% Nonidet P-40 (nacalai tesque) を含む PBS 内でブロッキング処理を 30 分間行った後に免疫染色を行った。ガラクトシダーゼの発現は免疫染色後の切片を、Xgal 染色液 (Takara), 5mmol/L $K_3Fe(CN)_6$ 、5mmol/L $K_4Fe(CN)_6$ 、2mmol/L $MgCl_2$ 、0.01% sodium deoxycholate、0.01% NP40、20mmol/L Tris-HCl (pH7.3) を含む PBS 内で 20 時間 37 °C の条件下で発色させた。

(9) 好中球遊走試験

健常人血液サンプルから密度勾配遠心法により好中球を単離し、10 μ g/ml の JAM-A 蛋白、心筋前駆細胞 CM、または心筋前駆細胞

CM+JAM-A 中和抗体と 30 分間前処置した後に HUVEC を培養した transwell の上段に添加した。下段には走化性因子として 40ng/ml の TNF- α または低酸素下で培養した新生仔ラット心筋細胞の CM を加えた。3 時間培養した後に下段に遊走した好中球数を算定した。好中球遊走時のアクチン繊維は分布については、マウス骨髄より好中球を EASYSEP (BD Pharmingen) を用いて単離し、10 μ g/ml の JAM-A 蛋白、心筋前駆細胞 CM、または心筋前駆細胞 CM+JAM-A 中和抗体と 30 分間前処置した後にフィブロネクチンでコートされたカバーガラス上で 5nM WKYMVm (Merck Millipore) による刺激を 20 分間加えた。アクチン繊維は細胞固定後ローダミンファロイジンにより染色し、好中球の uropod の長さを定量化した。

(10) JAM-A 遺伝子ノックダウン

マウス JAM-A に対する Stealth siRNA および陰性対照 siRNA は Life Technologies より購入した。siRNA は Lipofectamine RNAiMax (Life Technologies) を用いて心筋前駆細胞へ導入した。JAM-A 遺伝子の ノックダウンは quantitative real-time PCR および ELISA (R&D Systems) により確認した。

4. 研究成果

(1) 心筋前駆細胞移植効果の機序の解明

マウス急性心筋梗塞モデルを使用し、心筋前駆細胞と PuraMatrix™ 複合体を心筋内に注入、および、心筋表面に塗布してゲル化させることにより、移植細胞の生着を促し、心筋梗塞巣の範囲の縮小、および、心機能低下の予防効果を認めた。この移植効果の機序は、心筋細胞の細胞死抑制、血管新生、および、移植細胞の血管および心筋細胞への分化によることが明らかになった。そこで、心筋前駆細胞のパラクライン効果に注目し、心筋前駆細胞の培養上清から、心筋保護活性を有する蛋白の液体クロマトグラフィーによる分離を行なった。液体クロマトグラフィーにより得られた分画を用いて質量分析解析を行ない vascorin を同定したが、Vascorin 発現細胞の CM を新生仔ラット心筋細胞に作用させて H_2O_2 に対する心筋細胞保護作用について MTT assay を用いて検討したが心筋細胞保護効果は認められなかった。次に、心筋前駆細胞、骨髄細胞、骨格筋芽細胞、脂肪間葉系細胞の培養上清を用いて抗体アレイによる比較解析を行ない、心筋前駆細胞に多く分泌される蛋白として、VCAM-1、GCSF、JAM-A を同定した。VCAM-1、GCSF に関しては、我々のグループが心筋梗塞後の心筋細胞保護、血管新生効果について報告している (Nat Med 11; 305-311: 2005, J Clin Invest 119; 2204-2217: 2009)。そこで、我々は、JAM-A について検討した。

JAM-A は immunoglobulin-like domain を有する膜貫通型の蛋白で、血管内皮細胞、白

血球、リンパ球、マクロファージに発現する。血管内皮細胞の JAM-A は白血球のインテグリンと結合して内皮への接着を促進し、白血球が内皮細胞の junction 部分を通過する際の pore 形成に重要である。また、白血球の JAM-A はインテグリンと会合して、自身の遊走に必要なインテグリンの recycle に必要である。近年 JAM-A は ADAM10 と 17 により shedding され、可溶性 JAM-A 蛋白は、leukocyte の LFA-1 に結合することにより、leukocyte の内皮の JAM-A との接着を阻害して炎症を抑制するとの報告がされており、抗炎症作用と移植効果との関連が示唆された。

心筋前駆細胞 CM および、可溶性 JAMA 蛋白は TNF- α または低酸素下で培養した新生仔ラット心筋細胞の CM により惹起される好中球の内皮細胞間隙の通過を阻止し、この作用は JAM-A の中和抗体により阻止された。また、心筋前駆細胞 CM および、可溶性 JAMA 蛋白は WKYMVM により活性化された好中球の uropod retraction を抑制することにより遊走を直接的に抑制することが明らかになった。

心筋前駆細胞と PuraMatrix™ の複合体を移植する事により、心筋梗塞組織の好中球浸潤および好中球マーカー蛋白の発現が抑制され、梗塞範囲も非移植群に比較して縮小した。また、JAM-A をノックダウンした心筋前駆細胞を同様の方法で移植すると、心筋梗塞組織の好中球浸潤および好中球マーカー蛋白の発現抑制効果および梗塞縮小効果は消失した。さらに、心筋前駆細胞と PuraMatrix™ の複合体移植により、梗塞心筋の ROS の産生、炎症性サイトカインの遺伝子発現は抑制されていたことから、本研究は、心臓における、抗炎症性パラクライン因子による心筋保護という新たな治療法の基礎となると考えられる。また、可溶性 JAM-A 蛋白と PuraMatrix™ の複合体を移植しても好中球の浸潤を抑制して梗塞範囲を縮小させることから、PuraMatrix™ は抗炎症性蛋白をはじめとする治療薬の心筋局所への投与手段としても有用である事が示唆された。

(2) 心筋前駆細胞移植によるホスト心筋幹細胞の増殖・分化促進効果と心筋細胞再生効果の in vivo における解析

心筋前駆細胞移植が心筋梗塞後の内在性心筋幹細胞の増殖・分化に作用しているか確認するために、新生心筋を評価するための遺伝子改変マウス (-MHC MerCreMer/CAG-CAT-LacZ マウス) を作成し、内在性心筋細胞由来の新生心筋の評価方法を確立した。本マウスは、タモキシフェンを投与することにより、心筋特異的に ミオシン重鎖プロモーターを介して MerCreMer 融合蛋白を発現し、Cre リコンビナーゼ活性により LacZ 遺伝子が発現するため、ベータガラクトシダーゼ活性により、Xgal 染色を行うと全ての心筋細胞が青く発色する。そこで、タモキシフェンを投与して既存の心筋細胞

にベータガラクトシダーゼを発現させてから心筋梗塞を作成し、Xgal 染色陰性、収縮蛋白陽性かつ横紋構造明瞭な心筋細胞を新生心筋と定義して定量評価した。その結果、成体マウスでは心筋梗塞後、梗塞境界領域に心筋再生が確認された。

LIF は心筋梗塞縮小効果が報告されている (Circulation 108; 748-753 2003)。そこで、LIF の心筋再生効果について検討した結果、LIF 遺伝子導入マウスでは心筋梗塞後の Xgal 染色陰性の新生心筋の数を増加していることが明らかになった。核酸類似体を用いて胎児期の MerCreMer/CAG-CAT-LacZ マウスの細胞を標識すると、再生心筋の一部は核酸類似体による細胞標識が保持されており、細胞周期の遅い内在性心臓幹/前駆細胞由来であることが明らかになった。また、新生心筋の一部は心筋梗塞後に投与した核酸類似体を核内に取り込んでいた。

次に、心筋梗塞後に核酸類似体を投与したマウスの心臓より心臓の幹細胞分画のひとつである心臓 SP 細胞を単離し、核酸類似体の取り込みについて免疫染色法を用いて検討した。その結果、LIF 遺伝子導入マウスでは核酸類似体陽性心臓 SP 細胞の頻度が対照マウスに比較して有意に高かった。また、LIF 遺伝子導入マウスおよび対照マウスより心臓 SP 細胞を心筋梗塞後に単離し、抗 H2AX 抗体で免疫染色して H2AX foci の数を定量すると、LIF 遺伝子導入マウスにおいて H2AX foci が少なかった。以上の結果から、成体マウス心筋細胞の一部は心臓組織幹細胞を起源として再生しており、LIF の作用機序のひとつとして、心筋梗塞後の心臓組織幹細胞の DNA 傷害を軽減し、細胞周期への移行を促進することにより、心筋再生に寄与していることが示唆された。

次に、自己組織化ナノファイバー内で心筋前駆細胞を 3 次元培養して作成した移植床を、-MHC MerCreMer/CAG-CAT-LacZ マウスの心筋梗塞モデルに移植し、Xgal 染色陰性の新生心筋の数を非移植マウスと比較した。その結果、心筋前駆細胞移植マウスは対照マウスに比較して、梗塞領域、境界領域、また、一部健全心筋においても新生心筋が多かった。この新生心筋がホストの心筋幹/前駆細胞由来か、移植した心筋前駆細胞由来かは今後の検討課題であるが、残存している移植床内には Xgal 染色陰性心筋細胞は認められない事、Xgal 染色陰性心筋細胞は心筋組織の広範囲に分布している事から、心筋前駆細胞移植床からの分泌因子が間接、または直接作用して心筋幹/前駆細胞の増殖あるいは分化を促進していると考えられた。近年、成体の心臓にも内在性の心筋再生能力が少ないながらも存在する事が知られているが、このような再生能を増幅する因子については不明である。本研究の成果をもとに、心筋前駆細胞移植床からの分泌因子について、心筋再生の観点からさらに解析していく予定である。

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6件)

Nagai T, Komuro I. Gene and cytokine therapy for heart failure: molecular mechanisms in the improvement of cardiac function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 査読有 303、2012、H501-512. DOI: 10.1152/ajpheart.00130

Naito AT, Sumida T, Nomura S, Liu ML, Higo T, Nakagawa A, Okada K, Sakai T, Hashimoto A, Hara Y, Shimizu I, Zhu W, Toko H, Katada A, Akazawa H, Oka T, Lee JK, Minamino T, Nagai T, Walsh K, Kikuchi A, Matsumoto M, Botto M, Shiojima I, Komuro I. Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell* 査読有 149、2012、1298-1313. DOI:10.1016/j.cell.2012.03.047

Gong H, Ma H, Liu M, Zhou B, Zhang G, Chen Z, Jiang G, Yan Y, Yang C, Kanda M, Wu J, Yuan J, Li L, Nagai T, Komuro I, Ge J, Zou Y. Urotensin II inhibits the proliferation but not the differentiation of cardiac side population cells. *Peptides*. 査読有 32、2011、1035-1041. DOI:10.1016/j.peptides.2011.01.024

Fukushima N1, Matsuura K, Akazawa H, Honda A, Nagai T, Takahashi T, Seki A, Murasaki KM, Shimizu T, Okano T, Hagiwara N, Komuro I. A crucial role of activin A-mediated growth hormone suppression in mouse and human heart failure. *PLoS One*. 査読有 6、2011、e2790110. DOI:1371/journal.pone.0027901

Naito AT, Okada S, Minamino T, Iwanaga K, Liu ML, Sumida T, Nomura S, Sahara N, Mizoroki T, Takashima A, Akazawa H, Nagai T, Shiojima I, Komuro I. Promotion of CHIP-mediated p53 degradation protects the heart from ischemic injury. *Circ Res* 査読有 106、2010、1692-702. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.109.214346

Tokunaga M, Liu ML, Nagai T, Iwanaga K, Matsuura K, Takahashi T, Kanda M, Kondo N, Wang P, Naito AT, Komuro I. Implantation of cardiac progenitor cells using self-assembling peptide improves cardiac function after myocardial infarction. *JMol Cell Cardiol*. 査読有 49、2010、972-983. DOI:10.1016/j.yjmcc.2010.09.015

[学会発表](計11件)

小室一成 心臓の再生治療の可能性 第12回日本再生医療学会 2013年3月21日 横浜

Liu ML, Anti-inflammatory Peptides S

ecreted from Cardiac Progenitor Cells A meliorates Cardiac Dysfunction after Myocardial Infarction. American Heart Association 2012 Scientific Session, 2012年11月3-7日, Los Angeles USA

Kanda M, A Genetic Fate-Mapping Study Shows That Leukemia Inhibitory Factor Stimulates Cardiac Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Renewal After Myocardial Infarction. Basic Cardiovascular Science 2012 Scientific Sessions, 2012年7月22-26日, New Orleans, USA

Takahashi T, Brown adipose tissue derived-cells differentiate into cardiac conduction and pace-maker cells in vitro and improve complete AV block in vivo. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting, 2012年6月13-16日, Yokohama, Japan

Kanda M, The Effects of Leukemia Inhibitory Factor on Cardiac Stem Cell-derived Cardiomyocyte Renewal after Myocardial Infarction: A Genetic Fate-mapping Study 第96回日本循環器学会 2012年3月18日 福岡

永井敏雄 内在性心筋幹/前駆細胞による心筋再生 日本心臓血管作動物質学会シンポジウム 2012年2月10日 秋田

Kanda M, A Genetic Fate-Mapping Study Showing That Leukemia Inhibitory Factor Stimulates Cardiac Stem Cell-derived Cardiomyocyte Renewal After Myocardial Infarction. Scientific Sessions 2011 American Heart Association, 2011年11月14日, Orlando, FL, USA

永井敏雄 内在性心筋幹細胞による心筋再生 第15回日本心不全学会学術集会 2011年10月14日 鹿児島

Takahashi T, Brown adipose tissue derived-cells differentiate into cardiac conduction and pace-maker cells in vitro and improve complete AV block in vivo. 第95回日本循環器学会 2011年8月3日 東京

永井敏雄 体性幹細胞移植による心筋再生の機序、第13回小児心血管分子医学研究会 2010年7月8日 東京

永井敏雄 体性組織幹細胞～心筋幹細胞と脂肪組織幹細胞による心筋再生 2010 Tokyo Heart Dev Club 2010年4月9日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 敏雄 (MAGAI, Toshio)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 00334194

(2) 研究分担者

小室 一成 (Komuro, Issei)

東京大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号： 30260483