

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月13日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790373

研究課題名（和文） 不整脈予防と心収縮力の著明な改善を同時に実現した、
筋芽細胞移植法の開発研究課題名（英文） Development of a novel technique for myoblast transplantation that
is capable of preventing life-threatening arrhythmias and of dramatically restoring
cardiac contractility

研究代表者

熊谷 啓之（KUMAGAI HIROYUKI）

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20321945

研究成果の概要（和文）：

我々はきわめて有効でかつ安全性の高い、新しい心筋再生治療法のモデル開発に成功した。筋芽細胞移植は従来、最も有望な方法の一つであったが、術後の重篤な不整脈と、不十分な心収縮力回復効果が難点であった。我々は、あらかじめ筋芽細胞に、ある蛋白 X を発現させておいてから移植すれば、双方の問題が同時に解決されることを強く示唆する結果を得た。これにより、画期的な心筋再生治療の実現化が一段と近づいたと言えよう。

研究成果の概要（英文）：

We have succeeded in developing a novel technique for cardiac regeneration that excels other methods both in efficacy and in safety. Conventional myoblast transplantation, one of the most promising myocardial reconstructive approaches ever, was plagued by life-threatening arrhythmias and inadequate contractile restoration. Our studies suggest that these problems are simultaneously conquered by transducing myoblasts with protein X prior to implantation. This holds promise for yet earlier realization of a revolutionary heart regenerative therapy with much better prognosis than ever before.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・実験病理学

キーワード： 再生医学、心筋

1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症、梗塞後心不全に代表される重症心不全は、先進国において入院・死亡に至る最大の原因であり、その対策は焦眉の急となっている。現存する治療のなかでは、心移植が唯一、根治療法と呼べるものであるが、社会的・医学的な制約が大きく、実施できる症例もほんの一握りに過ぎない。この状況の打開を図るべく、さまざまな心筋再生治療法が考案され、なかでも骨格筋芽細胞移植は最も有望なものの一つであった。ところが、欧州でいざ臨床治験が為されてみると、(1) 重篤な心室性不整脈を惹起する危険性が大きいこと、及び(2) 心収縮力回復効果が充分とは言い難いこと、が判明し、一大ブレイクスルーが切望されている現状であった。

2. 研究の目的

そこで申請者は、従来の筋芽細胞移植法に抜本的改良を加えることにより、これらの2大問題の同時解決を目指した。具体的には、体外で培養・増殖させた筋芽細胞に、ある蛋白Xを発現させてから移植すれば、

(1) 移植細胞が周囲の心筋細胞と同調収縮するようになるのか、また、

(2) 筋芽細胞の形質が、持続性に富むタイプに転換されるのか、

について調査することにした。

3. 研究の方法

動物個体への細胞移植手術は、手技的、時間的、費用的制約がきわめて大きいため、まずは蛋白Xを発現させた筋芽細胞を心筋細胞と共培養する系を用いて基礎データを得ることにした。具体的手順は次の通りである。

(1) 新生仔ラットの骨格筋より筋芽細胞を得、培養により増殖させておいた。

(2) 次の3種類の蛋白を遺伝子導入させるようなアデノウイルス発現ベクターを構築し、個別に(1)の筋芽細胞に感染させた。

① WT-X-mRFP：蛋白Xと単量体赤色蛍光蛋白(monomeric Red Fluorescence Protein, mRFP)との融合蛋白

② DN-X-mRFP：蛋白Xのドミナントネガティブ型変異体とmRFPとの融合蛋白

③ mRFPのみ

こうすることにより、目的の蛋白を発現した筋芽細胞が、蛍光顕微鏡下で容易に確認できるようにした。

(3) (2)の筋芽細胞を、別途採取した新生仔ラット心筋細胞と混合し、共培養した。その際、多様な心不全状態を模すべく、筋芽細胞と心筋細胞の割合をさまざまに変化させたものを用意した。その理論的根拠は次の通りである。

① 心筋細胞の割合が高い共培養系：重症拡張型心筋症例のごとく、心筋細胞死が「まだら状」に起こっている状態では、筋芽細胞は移植先で、容易に隣接心筋細胞を見つけることができる。

② 心筋細胞の割合が低い共培養系：梗塞後心不全の症例では、心筋細胞の欠損部が広範囲に渡る。そのような状況下では、移植筋芽細胞のうち、心筋細胞欠損部の辺縁に位置するもののみ隣接心筋細胞に恵まれ、残りのものは筋芽細胞どうしの接触に依存することになる。

(4) 数日後、抗心筋ミオシン抗体で免疫蛍光染色(緑色)を行い、筋芽細胞のうち遅筋化(心筋化)したものの割合、及びその分布を調べた。

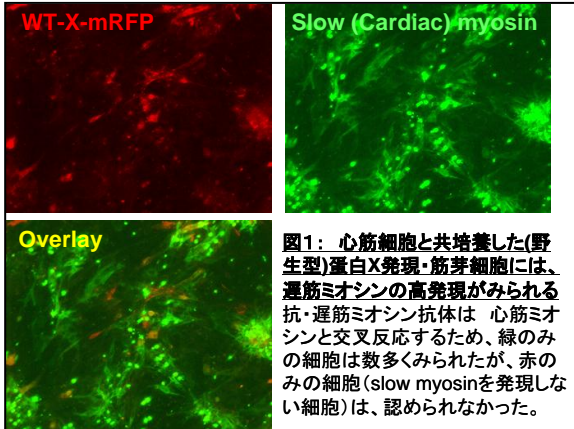
なお、当手法では実地において、レンチウイルスベクターなどの持続発現性ウイルスベクターを適用することを前提としている。ところが、そのようなスキーム自体が我が国での臨床治験を著しく困難にするであろうことは言を俟たない。そこで、ウイルスベクター不使用で同等の治療効果が得られる手法の開発に着手すべく、蛋白Xの発現により筋芽細胞が遅筋化するまでのシグナル伝達経路の特定を一部、試みた。具体的には、シグナル経路特異的阻害薬の培地への添加、並びに筋芽細胞におけるドミナントネガティブ型シグナル分子の同時強制発現により、たとえWT-X-mRFPを発現させても筋芽細胞が遅筋化を遂げなくなるような経路の探索を行った。

さらには、蛋白Xの発現が致死的不整脈を予防する効果を検証するため、各々の場合に筋芽細胞が心筋細胞と同調収縮するか否かを調査した。

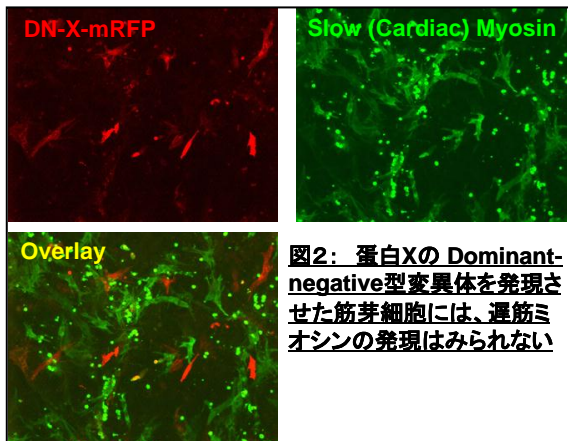
4. 研究成果

(1) 筋芽細胞に蛋白 X を発現させてから心筋細胞と共培養すると、遅筋化が起こる：

図 1 に示すように、アデノウイルスベクターで野生型蛋白 X を発現させたうえで共培養した筋芽細胞のほぼすべてが、遅筋ミオシン (β 心筋ミオシン) 重鎖を発現するようになった。



なお、この現象は、DN-X-mRFP (図 2) や mRFP を発現させた場合には観察されなかった。



これらの結果から、蛋白 X のはたらきにより、筋芽細胞の遅筋化が起こることが明らかとなった。

従来法では移植細胞のほとんどが速筋型に分化することが知られている。速筋は心筋に比して持久性に乏しく、また電気的性質も著しく異なり、これが、それぞれ不十分な心収縮力回復効果、重篤な不整脈の原因とされている。それゆえ、本手法による遅筋化は、両問題の同時解決につながる事が大いに期待できる。

(2) 蛋白 X 発現筋芽細胞のクラスター内部でも、遅筋化は起こる：

心筋細胞の割合を低くした共培養、即ち、ほとんどの筋芽細胞が心筋細胞と直接、接触できないような状況下でも、筋芽細胞クラスター内のほぼすべての細胞が遅筋化を遂げることがわかった。この結果は、蛋白 X を発現させると筋芽細胞を介しても遅筋化が進むことを示している。

これは当手法が、拡張型心筋症の末期のように「まばら」に心筋細胞死が起こっている症例のみならず、心筋梗塞のように広範な細胞欠損が生じている症例にも有効であることを強く示唆している。

(3) 蛋白 X による遅筋化は、ある有名な Y シグナル伝達経路を介して起こる：

あるシグナル伝達分子 Y の特異的阻害剤を培地に添加して共培養を行うと、たとえ蛋白 X を発現させても筋芽細胞は遅筋化しなくなった。しかしながらこの実験では、心筋細胞も同時に影響を受けるため、遅筋化抑制が、筋芽細胞内の Y シグナル経路の阻害によることを厳密には証明できていない。そこで、共培養前の筋芽細胞に、蛋白 X と同時に蛋白 Y のドミナントネガティブ型変異体も発現させた上で共培養実験を行うことを近日、予定している。

将来的な臨床知見を見据え、ウイルスベクター不使用で筋芽細胞を遅筋化させるためには、まず蛋白 X 発現時における遅筋化へのシグナル伝達経路を詳らかにした上で、さらに細胞外からの物理的・化学的刺激により、その経路を模する試みが有効と考えられる。本研究で明らかとなった Y シグナル経路は、細胞外から活性化することが比較的容易であり、さらなる研究で遅筋化経路の他の分枝も具に調べて行けば、ウイルスベクター不使用での遅筋化が実現することが十分に期待できる。

(4) 蛋白 X を発現させた筋芽細胞は、心筋細胞と同調収縮する：

筋芽細胞と心筋細胞をいずれの個数比で共培養しても、心筋細胞は筋芽細胞と同期して収縮することを目視により確認し得た。厳密なる証明は動画の解析を待たなくてはならないが、これは、本手法が臨床適用された場合にも、不整脈の副作用を根絶できることを強く示唆する結果であるといえる。

なお、本手法の動物個体実験が試みられつつあり、不整脈予防効果、収縮力回復効果の双方において、従来法の筋芽細胞移植を遥かに凌ぐ成果が上がりつつある。

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)

[学会発表] (計 1 件)

熊谷啓之、高松哲郎、戴平、「不整脈予防と心収縮力の著明な改善を同時に実現した、新しい筋芽細胞移植法」、第 33 回心筋生検研究会、2011 年 11 月 25 日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 啓之 (KUMAGAI HIROYUKI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20321945