

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24年5月18日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791750

研究課題名（和文） 幹細胞ケモカインによる重症左室不全の治療法の開発

研究課題名（英文） The Development of New Therapy for Severe Left Ventricular Failure by Stem-cell Derived Chemokines

研究代表者

日浅 謙一 (HIASA KENICHI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00380452

研究成果の概要（和文）：

全身細胞で β -galactosidase(LacZ)を常時発現している ROSA26 マウスの骨髄を野生型マウスへ移植した。さらに、ROSA26 マウスに mesenchymal stem cell を投与し、心筋細胞、骨髄細胞、投与幹細胞における関与を明らかにした。重症左室不全 ROSA26 マウスへ SDF-1 α 遺伝子導入を行い、SDF-1 α によって、1)MSC が心筋組織へ動員されること、2)心筋への分化が行われること、3)心機能が改善することなどを、免疫、生化学的手法により明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To determine the role of mesenchymal stem cell(MSC), bone marrow-transferred wild-type mice with ubiquitous expression of β -galactosidase (LacZ) in the bone marrow(BMT^{LacZ→Wild}) were used.

Intravascular injection of mesenchymal stem cell revealed MSCs can mobilize, proliferate and differentiate to cardiac tissue. Injections of the expression plasmid containing SDF-1 α promoted 1) mobilization of MSC to cardiac tissue, 2) proliferation and differentiation to cardiomyocyte and 3)improvement of LV systolic function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：救急医学

キーワード：救急医学、集中治療医学

1. 研究開始当初の背景

救命救急分野における重症左心不全症例の占める割合は毎年一定の割合を占め、患者の病状も非常に重篤な病態を呈する。また、その治療には、IABP、PCPS や植え込み型左室補助装置などの **mechanical support** や、心移植などを必要とする症例が少なからず存在する。しかし、これらの治療でも患者の救命率は極めて低いこと、さらには非常に高額な医療費を要することなど、種々の問題を有している。仮に救命できたとしてもそれまでの間に脳卒中や感染症などを併発することにより、以後も重篤な後遺症を残すことが少なくない。移植は長期的には悪性腫瘍発生頻度も多くなり、結果として患者の予後改善のための最善の治療法とは言いがたいのが現状である。

しかし、自己幹細胞移植による臓器再生は、これら侵襲的な治療、およびそれに付随するさまざまな合併症併発の可能性を減ずることが期待され、併せて医療費削減という側面からも有益と思われる分野である。MSC は最近心筋のみならず、神経細胞、膵、腎、皮膚への分化による再生医療への応用が期待されていることから、本研究にて MSC の動員制御を行うことができるようになった際の臨床への応用は非常に期待できるところである。

2. 研究の目的

自身の脂肪織由来の **mesenchymal stem cell(MSC)** を採取し、これを心筋へ動員させることにより、心機能改善を認めるか検討を行う。

我々はすでに静脈投与した骨髄細胞が心筋梗塞巣へ動員されることを報告している。また動員された細胞は、組織内で VEGF をはじめとするサイトカイン、ケモカイン分泌を介して心筋壊死、アポトーシスを抑制することも併せて報告している。(Hiasa K, et al. **Basic Research in Cardiology** 2004)

また、我々は下肢虚血モデルで、ケモカインの一つである SDF-1 α を過剰発現させると、骨髄由来細胞が動員され血管新生が促され、結果として虚血肢への血流増加が促されることを発見した。これにより、血管内皮前駆細胞の動員においては、SDF-1 α が重要な役割を担っていることを報告している。(Hiasa K, et al. **Circulation** 2004)

このような現状に加え、採取が比較的容易、かつ培養法も確立しつつある MSC を含む幹細胞には SDF-1 α の受容体 (CXCR4) が存在していることが分かってきている。このため、SDF-1 α は MSC の動員効率を高めることが予想される(Stem Cell Dev. 2006)。MSC の静脈内投与に、心筋への SDF-1 α の過剰発

現状態を作成することにより、幹細胞の心筋への効率的な動員が促され、結果として梗塞心筋の壊死予防および心筋再生が期待できるのではないかと推察している。これは、現在臨床でも行われている幹細胞移植治療の効率を促す可能性を秘めており、さらには他の組織への動員効率改善に大しても期待できる。これは、これまで救命困難であった種々の臓器障害患者の臓器再生のための治療法として有効な可能性があると思われる。

3. 研究の方法

脂肪組織由来の Mesenchymal stem cell (以下 MSC) を重症左室不全モデルの心筋へ動員することで、心機能の改善を得ることができるとかを検討するものである。心筋への動員を促進するために、MSC の投与のみではなく、ケモカインを用いて動員効率を高めることができるかも併せて検討する。我々はすでに虚血部位での SDF-1 α 発現が血管内皮前駆細胞の動員に重要な役割を果たすことを報告しており、このケモカインを用いて以下の通り検討する。

(1) SDF-1 α 遺伝子の作成: pcDNA3 プラスミドにヒト SDF-1 α 遺伝子を組み込んだものを用いる。ヒト SDF-1 α がマウスでも有効に作用することはすでに確認済みである。(Hiasa K, et al. **Circulation** 2004)

(2) SDF-1 α の心筋への投与: SDF-1 α 遺伝子プラスミドあるいはルシフェラーゼ遺伝子プラスミド (対照プラスミド) 200-300 μ g/kg を実験動物の心筋へ筋注し、実験を行う。下肢筋肉への遺伝子導入時にはエレクトロポレーションを併用し、導入効率の向上を図ったが、心筋へのエレクトロポレーションは不整脈を含む重篤な合併症発現の可能性があり、行えないと考えている。そのため、新たにプラスミド投与時の組織での SDF-1 α 発現濃度を測定し、プラスミドの至適投与量を決定する必要がある。

(3) 実験モデル: 全身細胞で β -galactosidase(LacZ) を常時発現している ROSA26 マウスの骨髄を野生型マウスへ移植する。これにより骨髄細胞のみで LacZ を発現するマウスモデルが作成できる。このマウスに別の標識を行った mesenchymal stem cell を投与すれば、心筋細胞、骨髄細胞、投与幹細胞はそれぞれ別々に標識されることとなり、各要素の関与が評価できる。(Hiasa K, et al. **Circulation** 2004, Saiura A, et al. **ATVB**)

(4) 重症左室不全モデルの作成: 上記マウスの左前下行枝近位部を結紮し、急性心筋梗塞を作成し、慢性心不全状態となったマウスを用いて実験を行う。静投でも心筋内へ動員することはすでに確認している(Hiasa K, et

al. Basic Research in Cardiology 2004)。MSCの動員の評価:SDF-1 α によるMSC動員を確認すべく、SDF-1 α 蛋白を含有させたmatrigelをマウス皮下へ植え込み、その後MSCを静注し、静注細胞のマトリジェルへの遊走を確認する。また、マトリジェル内のSDF-1 α 濃度の至適量を検討し、遺伝子の至適導入量の決定を行う。

(5)重症左室不全モデルの解析:上述の通りに作成した重症左室不全マウスへSDF-1 α 遺伝子導入を行い、SDF-1 α によって、1)心筋組織へ動員されるか(X-gal染色)、2)心筋への分化が行われるか(免疫染色)、3)心機能が改善するか、を明らかにする。

(6)分子機序の解析:SDF-1 α による細胞動員、分化促進の分子機序を生体レベルで解析する。我々はすでにSDF-1 α の下流シグナルにはVEGF, eNOS, aktなどが存在することを報告しており、eNOS欠損マウス、VEGF受容体キナーゼ欠損マウスなどを用い、細胞動員のメカニズムについて検討を行う。

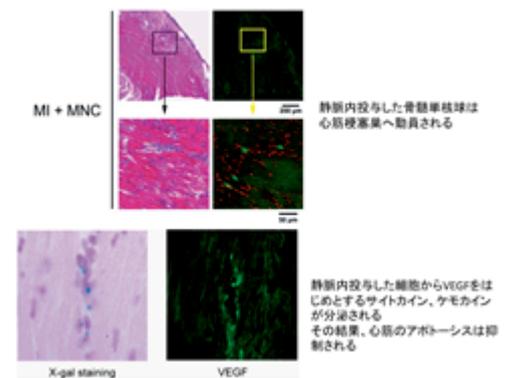
4. 研究成果

本研究の目的は、次世代の新規心筋再生療法の候補として、「間質幹細胞を重症不全心筋へ動員するケモカインSDF-1 α により、重症左室不全症例の心筋収縮力回復が可能かどうかを明らかにする」ことである。SDF-1 α 遺伝子の作製:pcDNA3プラスミドにヒトSDF-1 α 遺伝子を組み込んだものを用いた。ヒトSDF-1 α がマウスでも有効に作用することはすでに確認済みである。

SDF-1 α の心筋への投与:SDF-1 α 遺伝子プラスミドあるいはルシフェラーゼ遺伝子プラスミド(対照プラスミド)200-300 μ g/kgを実験動物の心筋へ筋注し、実験を行った。下肢筋肉への遺伝子導入時にはエレクトロポレーションを併用し、導入効率の向上を図ったが、心筋へのエレクトロポレーションは不整脈を含む重篤な合併症発現の可能性があり、行えないと考えた。そのため、新たにプラスミド投与時の組織でのSDF-1 α 発現濃度を測定し、プラスミドの至適投与量を決定した。

実験モデル:全身細胞で β -galactosidase(LacZ)を常時発現しているROSA26マウスの骨髄を野生型マウスへ移植した。これにより骨髄細胞のみでLacZを発現するマウスモデルの作製に成功した。このマウスに別の標識を行ったmesenchymal stem cellを投与する事によって、心筋細胞、骨髄細胞、投与幹細胞はそれぞれ別々に標識されることとなり、各要素の関与を明らかにした。重症左室不全モデルの作製:上記マウスの左前下行枝近位部を結紮し、急性心筋梗塞を作

製し、慢性心不全状態となったマウスを用いて実験を行った。安定した心不全モデルの作製に成功した。



SDF-1 α によるMSC動員を確認すべく、SDF-1 α 蛋白を含有させたmatrigelを皮下へ植え込み、MSCを静注し、matrigelへのMSC遊走を確認した。また、免疫染色にて動員された細胞にSDF-1 α 受容体であるCXCR4が存在していることも併せて確認している。

matrigel内のSDF-1 α 濃度の至適量を検討したのち、遺伝子の至適導入量の決定を行った。重症左室不全モデルの解析:心筋梗塞により作成した重症左室不全マウスへSDF-1 α 遺伝子導入を行い、遺伝子導入によるSDF-1 α 血中濃度測定を行い、血中、心筋組織での濃度を測定し、至適と思われる濃度となるべく遺伝子導入を行った。

そしてこの手法で決定した遺伝子導入をおこなったのち、末梢血での骨髄由来幹細胞および投与MSCの挙動を確認したところ、MSCの組織への動員が促進されていることを確認できた。

この個体では骨髄由来と思われる細胞の浸潤も認めており、免疫染色をはじめとする手法にてそれぞれの細胞の関与の割合や、細胞内シグナルの検討を行い、機能的評価をおこなった。

結果、SDF-1 α によって、1)心筋組織へ動員が強化されること、2)心筋への分化が促進されること、3)心機能が改善すること、などを免疫、生化学的手法、エコーにより明らかにすることができた。しかし、骨髄由来自己細胞と投与されたMSCのそれぞれの病態への関与の割合などについては、まだ十分なデータが得られていないため、発表には至っていない。

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)
未発表

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/cardiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日浅 謙一 (HIASA KENICHI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：00380452

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：