

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592036

研究課題名(和文) エクスプラント心由来の自己幹細胞移植による新たな心臓移植後の拒絶緩和療法の開発

研究課題名(英文) Development of Novel Immuno-tolerance Treatment of Cardiac Transplantation by Cardiac Progenitor Cells from Explanted Heart

研究代表者

新井 禎彦 (Arai, Sadahiko)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：50345617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：先天性心疾患心組織より心臓内幹細胞の精製分離し、またその細胞よりiPS細胞を樹立した。これらの細胞をもちい、ラット脱細胞細胞外マトリックスに心臓内幹細胞およびiPS細胞を経冠動脈的循環移植を行った。これにより冠動脈還流域を中心に心血管細胞の生着をえ、将来バイオ人工心臓または移植心への再生医療の可能性がしめされた。また左心低形成症候群よりの疾患特異的iPS細胞を樹立し、その遺伝子解析を行った。特定の基本転写因子群に著名な発現抑制を認め、異なる遺伝子は発現が著名に増加していた。これらが疾患の疾患発症規定因子群や新規転写因子群である可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We purified cardiac progenitor cell from congenital heart disease patients and established iPS cells. We transplanted these cells into rat decellularized extracellular matrix by transcatheter injection. We observed neo genesis of cardiovascular tissue in peri-coronary area. This result showed possible application of regeneration therapy to bio artificial heart or transplantation. We examined gene expression of iPS cells from hypoplastic left heart syndrome patients. We observed suppression of specific basic transcription factors and increased expression of other gene group. Those gene are potentially considered to be related to expression of congenital anomaly.

研究分野：心臓血管外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：冠動脈外科

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

心臓内幹細胞は再生医療において有用であると考えられた。当初、その臨床治験などは冠動脈投与などが行われたが、心臓移植後などに広範囲の心臓の代替えとなりうる臓器構造の再生が可能となるかの検討が重要であると考えた。当初、移植心モデルによる拒絶反応による心機能低下に対する治療としての検討を行おうとしたが、移植モデルへの生着が困難であった。このためまず移植手術を伴わない脱細胞外マトリックスを骨格とした心臓の再構築を目指す研究を行った。また既に確立された細胞培養手法により左心低形成症候群よりの心筋細胞をもちいた疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。これを用いることにより、現時点で未知である先天性心疾患発症における遺伝子の関与に対する知見をえることが疾患の診断、治療、発症の予防に極めて有用であると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 昨今、心不全患者の心筋への直接注射または経冠動脈的心筋幹細胞移植および、心筋細胞シートによる治療の成果が報告されている。しかし、心不全は依然として大きな死亡原因であり続けている。末期の重症心不全に対しては、心移植が唯一の確立された治療法であるが、ドナー不足は慢性化しており、待機患者は年々増加している現状がある。さらに、心移植が受けられたとしても、生涯にわたる免疫抑制剤の投与が不可欠であり、感染症の高いリスクを背負わねばならない。また、高血圧、糖尿病、腎不全等に起因する移植後心不全の発生も深刻な問題となっている。

そこで、立体的構造に細胞を播種増殖することにより、心機能を全体的に改善させるという試みは、非常に重要な意味を持っている。我々は、脱細胞化し免疫反応が起きない状態の 3D 細胞外マトリックスに、ヒト由来の幹細胞の移植を試みた。まず、ヒト cardiosphere 由来の幹細胞(CDC)をヒト臍静脈由来の血管上皮細胞(HUVEC)とともに移植し、生着率の改善を試みた。さらに、ヒト iPS 細胞由来の血管上皮細胞および心筋細胞の移植を試みた。

(2) 左心低形成症候群(HLHS)等の重篤な複雑心奇形に対する心臓発生学に基づく病態解明に、先天性心疾患患者から樹立した人工多能性幹(iPS)細胞は有用で、その遺伝子解析を行い、疾患への遺伝子関与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ラングENDORF 回路をモディファイ<

図 1>して、クリーンベンチ内に設置した。8 週齢オスの Sprague-Dawley ラットを用い、もとの心臓由来の細胞を以下の方法で脱細胞化した。脱細胞化には、0.02%トリプシン、1% SDS、3% Triton-X および 4%デオキシコール酸を用い、最後に蒸留水、PBS で洗浄した。従来はこの過程に 2 日間を要していたが、上記の方法で約 5 時間に短縮された。

脱細胞化した細胞外マトリックスは、心室や弁、さらに血管などの構造を保っているといわれている。我々は、走査型電子顕微鏡で微細構造を確認、撮影し、さらにバルサルバ洞からインドシアニンググリーン色素を注入しながら動画を撮影した。また、アクリル樹脂を冠動脈に注入し、冠動脈の鋳型を作成した。また、細胞外マトリックスに含まれているといわれている、ラミニン、ファイブロネクチン、コラーゲンを免疫染色した。

細胞外マトリックスを補強し細胞の生着を促すため、0.1%ゼラチン液を還流した。その後、CDC と HUVEC をアオルタ根部から移植し、5%CO₂ 環境下で培養した。移植は 3 日置きに施行し、3 週間培養を続けた。ヘマトキシリン・エオジン染色、マッソン・トリクローム染色を施行し、病理学的に評価した。また、レンチウイルスを用い、CDC に GFP タンパクを導入し、HUVEC に m-Cherry タンパクを導入して、蛍光免疫染色を施行した。

また、ヒト血中リンパ球から iPS 細胞を樹立し、血管上皮細胞への分化誘導を試みた。

(2) 計 18 例の先天性心疾患患者の術中余剰心臓組織から心臓内幹細胞(CPCs)を精製分離し、初期化 4 因子導入後疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。各種染色、DNA メチル化解析、網羅的遺伝子解析を行い、NOD/SCID マウスに移植し奇形腫を形成した。さらに樹立した iPS 細胞に心筋分化誘導を行いカルシウム動態と各種転写因子群の網羅的発現推移を解析した。

4. 研究成果

(1) 従来よりも時間をかけない方法にもかかわらず、ラットの心臓は肉眼的には良好に脱細胞化された<図 2>。走査型電子顕微鏡画像では、弁構造、冠動脈構造が保たれていた。バルサルバ洞からインドシアニンググリーン色素を注入すると、冠動脈から冠静脈をとり、冠静脈洞から右房に流入するのが確認できた。また、アクリル樹脂による冠動脈の鋳型<図 3>も問題なく作成でき、血管構造の破綻は認められなかった。細胞外構造に含まれているラミニン、ファイブロネクチン、コラーゲンは、良好に染色された。

そこに CDC-GFP 細胞を移植すると、レーザー光での励起により GFP 蛍光を発した。同じ露出時間で脱細胞化した心臓を撮影すると、蛍光は認められなかったことから、細胞が良好

に生着したことが示唆された。HE 染色、マッソン・トリクローム染色でも良好な細胞の生着を認めている。拡大像でも GFP の蛍光を認めた。また、HUVEC-m Cherry と CDC-GFP を移植し、それぞれの蛍光タンパクを免疫染色すると、両方の細胞の生着が認められた。HUVEC は冠動脈周囲に多い傾向が認められた。また、血液中から得たヒトリンパ球を賦活化し、センダイウイルスを用いて山中 4 因子を導入し iPS 細胞を樹立した。多能性マーカーである OCT4、SSEA-4、Tra 1-81 が免疫染色され、その妥当性を確認した。現在、血管上皮細胞への分化誘導を行っている。さらに、心筋細胞も iPS からの分化誘導成功例が多数報告されていることから、我々も同様の方法で分化誘導を行い、最終的にはこれらの細胞を移植し、心臓として拍動させることを目指す。ペーシングによらず拍動が得られれば、ヒトリンパ球由来の iPS 細胞を用いた実験としては現時点で世界初のこととなる。

図 3



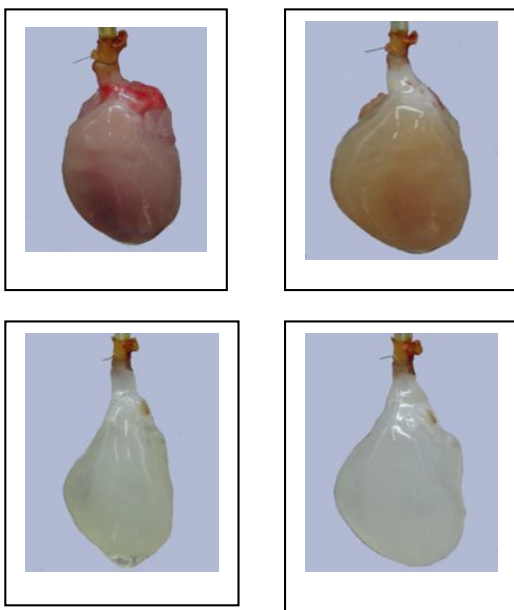
図 1



(2)単心室由来 CPCs は分裂複製能が高く、これに伴い CPCs の初期化に伴う胚性幹細胞様コロニー形成率は二心室より単心室由来の方が有意に高率だった (77% vs 20%, $p < 0.05$)。樹立した iPS 細胞は各種未分化転写因子群を発現し、ALP 染色陽性だった。網羅的遺伝子解析では HLHS 由来 CPCs は二心室より、心臓の初期発生に重要な *Nkx2.5*、*Tbx5*、*Isl1*、*Hand1/2* の発現が著明に低下し、一方、心臓の二次領域形成に關与する *Notch1*、*Foxh1*、*Sema4D*、*Mesp1* の発現が有意に増加した。また樹立した疾患特異的 iPS 細胞からの分化誘導の検討では、HLHS 由来 iPS 細胞は二心室に比しカルシウム動態に障害を認め、心筋細胞の成熟化に伴う *cTnT*、*MLC2a*、*Nkx2.5*、*Tbx5*、*Isl1*、*Hand2* の発現上昇が有意に抑制された。

各種先天性心疾患患者の CPCs から疾患特異的 iPS 細胞の樹立に成功した。HLHS 由来 iPS 細胞は心筋分化誘導過程で *cTnT*、*MLC2a* 等の心筋構造蛋白や *Nkx2.5*、*Tbx5*、*Isl1*、*Hand2* 等の心臓発生に重要な基本転写因子群に著明な発現抑制を認め、疾患発症規定因子群であることが示唆された。HLHS 由来の CPCs では心臓の二次領域形成に關与する *Notch1*、*Foxh1*、*Sema4D*、*Mesp1* の発現が著明に増加しており、これらがヒトでの心筋細胞へ直接系統誘導する新規転写因子群である可能性がある。

図 2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

3D 細胞外マトリックスを利用したヒト幹細胞再播種によるバイオ人工心臓の作成

奥山倫弘, 逢坂大樹, 石神修大, 小林純子, 笠原真悟, 新井禎彦, 佐野俊二, 王英正

第 13 回日本再生医療学会総会

発表日 2014/3/4 (一般口演)

京都

小林純子, 樽井 俊, 平田昌敬, 川畑拓也, 黒子洋介, 立石篤史, 吉積 功, 新井禎彦, 笠原真悟, 佐野俊二, 王 英正
疾患特異的 iPS 細胞を用いた左心低形成症候群における心臓発生異常の解明第 113 回日本外科学会定期学術集会

発表日 2013/4/12 (優秀演題 口演)

福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 禎彦 (ARAI SADAHIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 50345617

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: