

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23618002

研究課題名(和文) DNA修復機構APE-1の心筋幹細胞に対する細胞機能再生及び虚血耐性に対する効果

研究課題名(英文) APE1/ref1 gene provides anti-oxidative fate to Sca-1 positive cardiac progenitor cells and promotes cardiac repair via macrophage transition in ischemic environment

研究代表者

竹原 有史 (Takehara, Naofumi)

旭川医科大学・医学部・その他

研究者番号：90374793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：虚血耐性・DNA修復機構を有するApe1遺伝子は虚血時に発生する細胞内ROSを消去することでSca-1陽性心筋幹細胞の虚血耐性を向上させ細胞死を抑制した。そしてApe1遺伝子導入細胞の虚血心筋への移植治療においてホスト心筋内での移植細胞の生着率向上、血管新生、移植細胞の心筋分化と組織心筋再生、梗塞組織での抗炎症効果により梗塞巣縮小、心機能改善効果が達成された。

研究成果の概要(英文)：The ROS production and apoptosis stimulated by H2O2 were significantly reduced in Ape1-CPCs compared with DsRed-CPCs. At 4 weeks, the absolute change in the LVEF was significantly greater in Ape1-CPCs injected mouse, but not DsRed-CPCs, than in the placebo group, that was associated with reduced infarcted size. Ape1-CPCs injected mouse were significantly enhanced the engraft cells compared with DsRed-CPCs injected mouse. In infarct myocardium of Ape1-CPCs injected mouse, M1 macrophages, but not M2 macrophages, were significantly reduced compared with that of DsRed-CPCs injected mouse. APE1/ref1 gene enhances the survival of engraft Sca1-CPC accompanied with the redox effect against oxidative stress in ischemic myocardium. Great survived Sca1-CPCs repaired the loss of LV function, which were associated with reduced infarcted myocardium and inflammation via macrophage transition. These results may provide an APE1/ref1 gene as a novel target to innovate the cardiac cell-therapy.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：再生医学・医療

キーワード：Ape1 心筋再生 抗炎症

1. 研究開始当初の背景

再生医療が心臓病に対する新規の治療手段として開発が始まり既に十年が経過しているが、標準治療として定着した治療法が未だ確立されていない。

2002年にマウス、2006年にヒトから本申請者らの発見した心筋幹細胞(CSC)は心筋再生に用いる自家体性幹細胞においては最も心筋分化能が高い細胞である。そして患者由来の心筋前駆・幹細胞を用いた臨床試験は米国、本邦にて既に実施されており、一部の症例に有効性が示唆されているが標準治療とはなり得ていない。その理由として、治療対象が重症虚血性心不全患者であるため、障害心筋環境下における移植細胞(CSC)の生着率低下、障害組織由来細胞(CSC)の細胞機能低下、という課題があげられる。事実、虚血心筋に移植した細胞の生着率は移植4週後では15%以下まで低下することが報告されており、また成人特に虚血心由来のCSCは小児由来に比し倍加時間の延長、増殖期間の短縮が確認されている。従って、虚血状態にある移植環境(ニッチ)で移植細胞が生存・生着するには、移植細胞(CSC)の虚血ストレスへの耐性獲得並びに移植細胞の機能再生が不可欠である。

AP endonuclease1(Ape1/ref-1)は、レドックス機序を介して各種転写因子への結合活性増幅や、アポトーシス促進に参与する塩基除去修復機構(BER機構)の主要酵素である。本申請者らは既にマウスワイヤー傷害血管モデルの解析において非障害血管に比し、ワイヤー傷害血管局所においてApe1遺伝子の著明な発現亢進を確認しており、Ape1は酸化ストレスに対する生体防御機構として種々の臓器で重要な働きを示すと考えられるが、CSCにおけるその働きは不明である。

本研究では、虚血耐性・DNA修復機構を有するApe1遺伝子のCSCにおける役割、そしてその過剰発現系における細胞移植治療への効果およびその機序を明らかにすることである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心筋分化能の最も高いCSCにおいて遺伝子Ape1を用いて虚血状態にある移植組織内での移植細胞死を克服し、その機能を最大限発揮させることである。この目的を達成するため本研究では、Ape1遺伝子の過剰発現系を用いて、CSCにおけるApe1を介した抗酸化・DNA修復機序の解明、

Ape1遺伝子導入CSCによる細胞移植効果の検証及びその機序解明、を目的として研究を計画した。

3. 研究の方法

CSCにおけるApe1を介した抗酸化・DNA

修復機構の機序解明

Ape1による幹細胞能維持・改善機構を明らかにするために以下の実験計画を立てた。ヒト由来CSCは細胞検体の安定供給が困難であるため、invitroにおける基礎的検討はマウス心筋由来CSCにて行った。マウス心筋由来CSCは、8-10週齢のC57BL/6マウス心筋組織からコラゲナーゼ酵素分解によって得られた単一細胞群よりCSC特異的抗原Sca1の陽性細胞をMagnet-Sorting(MACS)を用いて単離し、培養して得られた細胞群をSca1陽性CSCとした。

1) マウス由来CSCのApe1遺伝子過剰発現(Ape1-Tg)系の構築

樹立したSca1陽性CSCクローンを用いてApe1遺伝子過剰発現系を構築した。IRESによりヒト白血球からクローニングしたApe1遺伝子及び標識タンパク遺伝子DsRedを共発現するレトロベクターを用い、Sca1-陽性CSCに対しApe1遺伝子導入を行った。20~30%のApe1遺伝子が導入された細胞群からFACS AREAを用いて標識蛍光タンパクDsRed陽性細胞をSortingし、Ape1陽性細胞CSC(Ape1-CSC)をクローン化した。Control細胞として遺伝子導入のないSca1-CSC(CSC)及びApe1配列を含まないDsRed遺伝子単独導入細胞(DsRed-CSC)を用いた。

2) Ape1遺伝子導入によるCSCの虚血耐性機構の解明

CSCのApe1による虚血耐性機構を解明するためにCSC、DsRed-CSC、Ape1-CSCに対し、H2O2投与による虚血負荷を行い、細胞死(Apoptosis)に対する影響をTUNEL法を用いて検討した。H2O2負荷はH2O2を最終500 μ Mの濃度で細胞培養上清に加え、48時間の負荷を行った。また、Ape1による細胞内活性酸素種(ROS)の消去を検討するために、CDCFHを用いて細胞内ROS産生を定量評価した。

Ape1遺伝子導入CSCによる細胞移植効果の検証及びその機序解明

8-12週齢のマウスを全身麻酔下に開胸、心臓を露出し左冠動脈前下行枝を45分間結紮して心筋虚血を作成、その後結紮解除することで実験的虚血再還流モデルを構築した。このモデルに対し、sham-ope及びCSC、DsRed-CSC、Ape1-CSCの 1×10^6 個を心筋移植した。4群は前向きランダム化法で群分けし、その治療効果及び機序を検討した。

1) 細胞移植による心機能評価

4群は治療前、移植翌日、移植28日後において、心エコー図法により左室拡張末期径(LVDd)、左室駆出率(LVEF)を評価した。梗塞領域は、移植28日目の心臓を薄切しMasson-Trichrome染色による心筋線維化面

積により評価した。

2) Ape1 遺伝子導入による細胞移植効果の機序解明

1. 移植細胞の組織生着率評価

移植細胞の虚血組織生着に与える Ape1 遺伝子導入の影響を評価するために、標識蛋白 DsRed を指標にして、DsRed-CSC 及び Ape1-CSC の 2 群において移植 28 日目の心筋組織中の DsRed 陽性細胞数を組織学的に評価した。

2. 移植後組織における血管新生

細胞移植による血管新生を評価するために、DsRed-CSC 及び Ape1-CSC 移植 28 日目の心筋組織中の梗塞巣、梗塞周囲部及びその両方において CD31 陽性 capillary 数を免疫組織学的に評価した。

3. 移植後組織における心筋再生

移植細胞による再生心筋細胞を評価するために、DsRed-CSC 及び Ape1-CSC 移植 28 日目の心筋組織中の梗塞巣、梗塞周囲部及びその両方において DsRed 及び心筋蛋白 - sarcomeric actinin の陽性細胞及びその数を蛍光免疫組織学的に評価した。

4. 移植後組織における抗炎症効果

細胞移植により炎症細胞浸潤が惹起される。Ape1-CSC 移植による炎症細胞浸潤の影響を評価するために、移植 28 日目の虚血心筋組織において CD68 (炎症性マクロファージ)、CD206 (抗炎症性マクロファージ) 陽性細胞数を免疫組織学的に評価した。

統計解析

統計解析において、連続変数は平均値 ± 標準誤差で表記した。異なる 2 群の検定量の有意差は student-t test を用いて解析を実施した。細胞移植における Sham、placebo-medium、DsRed-CSC、Ape1-CSC 投与の個体は乱数表を用いて治療翌日、治療 28 日目の心機能測定の前に検者盲検の上ランダム化した。4 群における各々の検定量は一元配置による ANOVA 法で解析を実施した。治療前後による検定量の差の検定は student-t test を実施した。統計学的有意差は $p < 0.05$ をもって有意差有りとした。

4. 研究成果

1) Sca1 陽性 CSC の樹立

8-10 週齢雄の C57BL/6 マウス 2 匹の心臓 (平均重量 180mg) から単離された単一細胞を 60mm 細胞皿で初代培養した。増殖した細胞をトリプシン処理にて再び単一細胞とし、Sca1-Mg 抗体を用いて MACS にて sorting を行った。90%以上の純度で精製された Sca1 陽性 CSC の表面抗原解析の結果を図 1 に示す。結

果、この細胞群は CD29、CD44、CD105、CD106 陽性で CD45、c-kit 陰性でありマウス心筋幹細胞として矛盾無いことが示された。

2) Sca1-CSC の Ape1-Tg 系の樹立

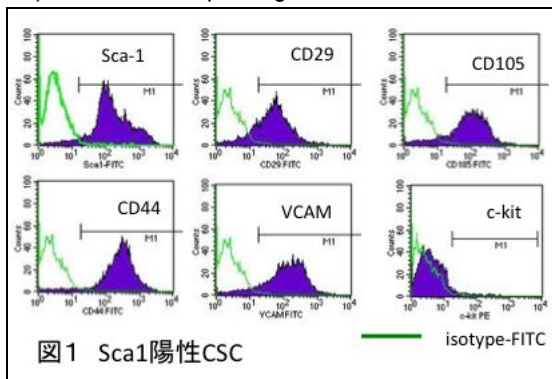


図1 Sca1陽性CSC

クローニングされた Sca1-CSC において Ape1-Tg 系を構築した。IRES により標識蛋白 遺伝子 DsRed を共発現するレトロウイルスベクターを用い、DsRed-Ape1 共発現系 (Ape1-CSC) と control として DsRed のみを発現する DsRed-CSC 系を構築した。遺伝子導入された細胞を DsRed を指標に FACS-AREA で sorting し、クローン化した。クローン化した細胞は全て赤色蛍光を提示することが確認され (図 2A)、RT-PCR 法では Ape1-CSC 系において human-Ape1 遺伝子及び内在性マウス Ape1 遺伝子の発現が確認された。DsRed-CSC では内在性マウス Ape1 の発現のみが確認された (図 2B)。

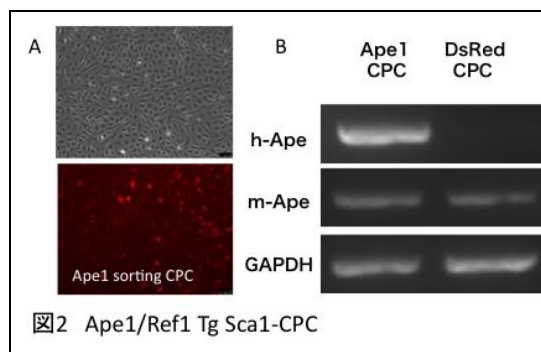


図2 Ape1/Ref1 Tg Sca1-CPC

3) Ape1 遺伝子導入による CSC の虚血耐性獲得

CSC、DsRed-CSC、Ape1-CSC の 3 群において培養上清に H2O2 を加え最終 500 μ M の濃度で 3 時間負荷を行った。最初に H2O2 負荷による細胞内 ROS の産生を CDCFH を用いた蛍光強度解析により評価した。H2O2 負荷により CSC、DsRed-CSC では ROS の産生が亢進したが、Ape1-CSC では細胞内 ROS 産生が有意に抑制されていた (図 3A)。次に、負荷 48 時間後の細胞死を apoptosis を指標に TUNEL 法で評価したところ、CSC、DsRed-CSC において H2O2 負荷により誘導される Apoptosis は Ape1-CSC では著明に抑制されていた (図 3B, C)。

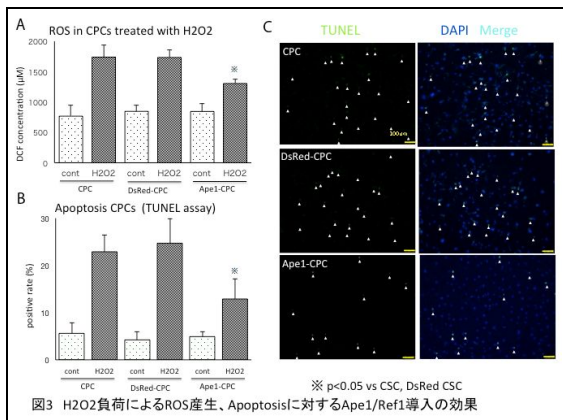


図3 H2O2負荷によるROS産生、Apoptosisに対するApe1/Ref1導入の効果

4) Ape1-CSC 移植による虚血心の心機能改善

実験的虚血再還流モデルにおいて、placebo-medium 並びに DsRed-CSC、Ape1-CSC の 1×10^6 個を再還流後の虚血心筋に投与した。虚血作成、細胞移植翌日では sham op を除く 3 群で LVEF が各々、 32.2 ± 7.2 、 31.5 ± 6.9 、 $29.2 \pm 8.2\%$ と低下した (図 4A, B)。移植 28 日目で placebo 群は $3.1 \pm 2.5\%$ の心機能低下を認めたが、Ape1-CSC 群では $8.0 \pm 3.8\%$ の有意な心機能改善効果をも認めた ($n=7$, $p<0.05$)。DsRed-CSC 群においても $3.9 \pm 3.5\%$ の心機能改善を認めたが統計学的有意差は認めなかった (図 4C)。

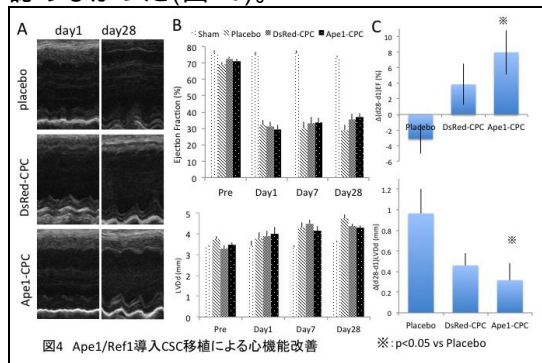


図4 Ape1/Ref1導入CSC移植による心機能改善

5) Ape1-CSC 移植による梗塞心筋巣の縮小

細胞移植後 28 日目の虚血心において梗塞領域の評価を行った。Placebo 群では左室全体に対し $16.2 \pm 8.2\%$ の線維化領域を認めたが、Ape1-CSC では $9.4 \pm 1.8\%$ と 6.8% の梗塞巣の有意な縮小を認めた ($n=7$, $p<0.05$)。DsRed-CSC 群では $11.0 \pm 1.7\%$ と有意差は認めなかった (図 5)。

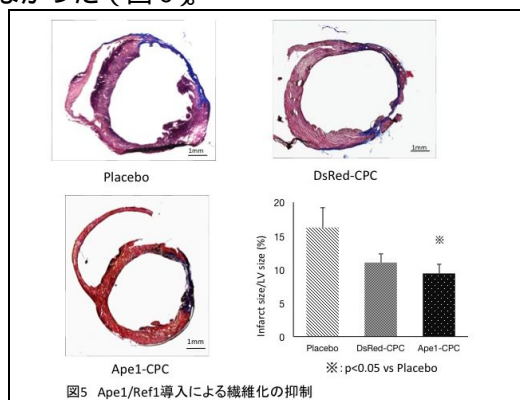


図5 Ape1/Ref1導入による繊維化の抑制

6) Ape1 遺伝子導入による移植細胞の組織生着改善

細胞導入療法においては移植 7 日目までに半数が、28 日目には 8 割以上が生着できず失われる。Ape1 遺伝子導入による CSC の虚血組織内生着に与える影響を評価するため、前述の虚血再還流モデルへの細胞移植後、7 日目の組織切片で共発現する標識蛋白 DsRed を指標に DsRed-CSC、Ape1-CSC の梗塞領域における細胞生着を評価した。その結果、梗塞部及びその周辺部のいずれの領域でも DsRed-CSC 移植群に比し Ape1-CSC 移植群では心筋組織内の DsRed 陽性細胞数がより多く (DsRed-CSC vs Ape1-CSC = 26.5 ± 18.3 vs 57.0 ± 26.2 個/mm² (梗塞部, $p<0.05$), 42.0 ± 37.0 vs 88.6 ± 41.1 個/mm² (周辺部, $p<0.05$)), Ape1 遺伝子導入 CSC の梗塞組織における生着が有意に高かった (図 6)。

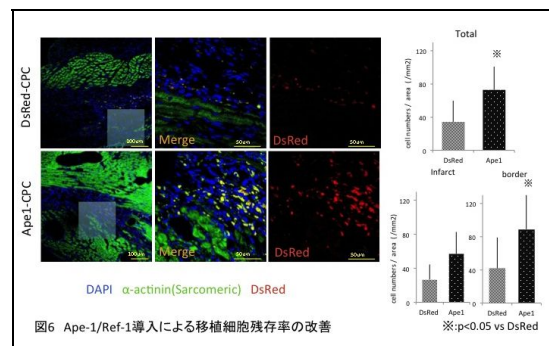


図6 Ape1/Ref1導入による移植細胞残存率の改善

7) Ape1 遺伝子導入 CSC 移植による血管新生

CSC は心筋細胞に分化する能力の高い細胞であるが、一部は血管内皮細胞への分化も報告されており、また移植細胞より放出される種々のサイトカインは虚血組織の血管新生を促進することが知られている。この細胞移植による血管新生に対する遺伝子 Ape1 の役割を細胞移植後の虚血組織における CD31 陽性の新生血管数として評価した。その結果、DsRed-CSC、Ape1-CSC の細胞移植 7 日後において DsRed-CSC では虚血部全体で 5.8 ± 2.0 個/mm² の CD31 陽性血管数であったのに対し、Ape1-CSC では 13.5 ± 3.7 個/mm² の CD31 陽性血管を認め、Ape1 遺伝子の導入により CSC 移植において約 3 倍の有意に血管新生が亢進していた (図 7)。

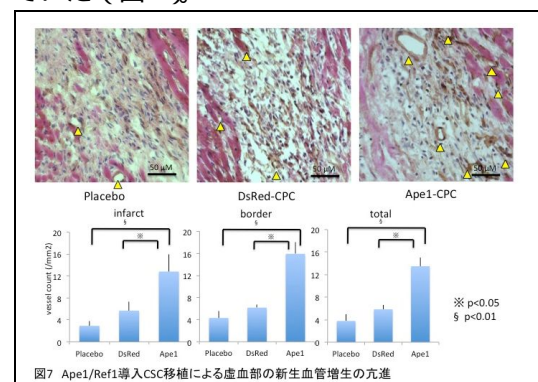
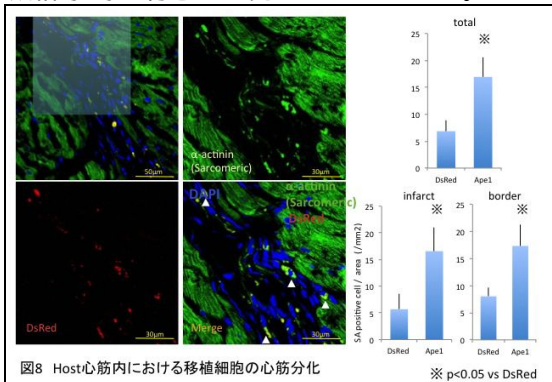


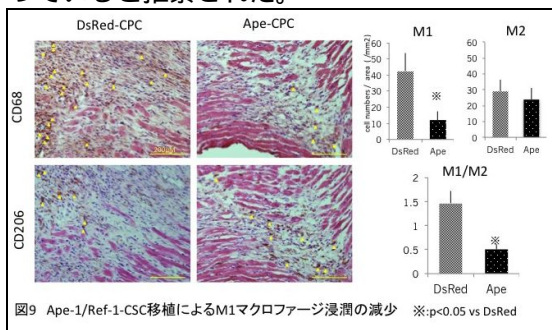
図7 Ape1/Ref1導入CSC移植による虚血部の新生血管増生の亢進

8) Ape1 遺伝子導入 CSC 移植による心筋再生
 移植した CSC の心筋分化および再生心筋分化効率に与える遺伝子 Ape1 の影響を評価した。移植 CSC の分化した心筋細胞は宿主心筋内において DsRed 陽性かつ心筋蛋白-sarcomeric actinin が共陽性の細胞として評価される。結果、DsRed-CSC 移植群に比し、Ape1-CSC 移植群では細胞移植 28 日後において虚血部、周辺部ともに分化心筋細胞である DsRed- α -sarcomeric actinin 陽性細胞が有意に多く観察された(DsRed-CSC vs Ape1-CSC = 5.7 ± 7.1 vs 16.6 ± 10.7 個/mm² (梗塞部, $p < 0.05$), 8.0 ± 3.9 vs 17.3 ± 9.5 個/mm² (周辺部, $p < 0.05$)). 再生心筋分化効率を全ての DsRed 陽性細胞(α -sarcomeric actinin 陰性細胞を含む)に対する α -sarcomeric actinin 共陽性細胞比で評価したところ Ape1-CSC 移植群で $25.7 \pm 16.5\%$ 、DsRed 群で 14.6 ± 8.0 と Ape1 群で分化効率の高い傾向を認めたと統計学的な有意差は見いだせなかった。



9) 虚血組織における Ape1-CSC 移植の
 抗炎症効果

虚血後組織における炎症細胞浸潤に及ぼす細胞移植の影響及び遺伝子 Ape1 の影響を評価するために、移植 28 日目の虚血心筋組織において CD68、CD206 陽性細胞を免疫組織学的に評価した。CD68 陽性細胞は炎症性(M1)マクロファージ、CD206 は非炎症性(M2)マクロファージを反映するといわれているが、DsRed-CSC 群では CD68、CD206 陽性細胞ともに梗塞部に多く浸潤しているのが確認されたが、Ape1-CSC 群では CD206 陽性細胞は変わらないものの CD68 陽性細胞数は有意に減少していた。M1/M2 比においても Ape1-CSC 移植群で有意な低下を認め、Ape1-CSC 移植では相対的に抗炎症性マクロファージが優位になっていると推察された。



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 0 件)

[学会発表](予定 計 1 件)

ESC congress 2014 (2014.8.30)

Apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1 gene provides anti-oxidative state to sca-1 positive cardiac progenitor cells and promotes cardiac repair in ischemic environment. Tatsuya Aonuma*, Naofumi Takehara†, Maki Kabara*, Kouki Matsuki*, Atsushi Yamauchi*, Jun-ichi Kawabe† and Naoyuki Hasebe*

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
 出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]
 ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹原 有史 (Takehara Naofumi)
 旭川医科大学 医学部 客員講師
 研究者番号 : 90374793

(2)研究分担者

川辺 淳一 (Kawabe Jun-ichi)
 旭川医科大学 医学部 特任准教授
 研究者番号 : 10400087

研究分担者

長谷部 直幸 (Hasebe Naoyuki)
 旭川医科大学 医学部 教授
 研究者番号 : 30192272

(3)連携研究者

松原 弘明 (Hiroaki Matsubara)
 研究者番号 : 10239072