

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700485

研究課題名新素材のハイドロゲルを用いた心筋梗塞に対する心筋幹細胞治療

研究課題名（英文） Cardiac stem cells therapy for myocardial infarction using novel hydrogel

## 研究代表者

松下 訓（MATSUSHITA SATOSHI）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20407315

研究成果の概要（和文）： GFP 陽性ラット由来の心筋幹細胞をラット心筋梗塞周囲巣に投与した。投与の際に細胞を温度感受性ハイドロゲル（Hg）を用いて細胞の流出を少なくする工夫をしたところ、細胞投与後 4 週間後の心機能では細胞のみ投与した群に比べて心機能がより改善した。組織切片および分子生物学的解析からは、Hg 群で細胞の残存率が高く、また心筋や血管の再生がより進んでいた。これらのことから、徐放性ハイドロゲルの使用は、長期において心機能の改善に有用であると考えられた。

研究成果の概要（英文）： Cardiac stem cells derived from GFP-positive rat heart were conjugated into thermo sensitive novel hydrogel (Hg), then injected into the rat hearts with myocardial infarction. Greater improvement of heart function was seen in the rat with hydrogel administration compared to the rat with cells alone at four weeks. Histological analysis demonstrated that the injected cells were more retained in the hydrogel group, with increasing expression of cardiac marker and vascular marker proteins in the heart.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：心筋機能不全・再生

## 1. 研究開始当初の背景

次世代の心臓疾患治療の一戦略として再生医療の可能性が探られており、特に最近では心筋幹細胞が新たな細胞治療のソースとして注目されている。心筋幹細胞の分離方法は c-Kit 陽性細胞を選択的にソートしたものや、Cardiosphere もしくは Cardiosphere 由来細胞

：CDCs を用いた方法などが報告され、その効果は、研究代表者も含めマウス、ラットなどの小動物で有効性が示され、さらには研究代表者らはブタの心筋梗塞モデルにおける心筋内直接投与においても心臓のリモデリング抑制と心機能の有意な改善効果を認め、かつその安全性を報告した。2009 年から

は臨床治験も開始されており、その早期臨床応用に向けて研究が進んでいる。しかしながらその治療効果は重症症例に対しては不十分であると考えられており、細胞の分化効率や残存率の改善など、実際の臨床応用にむけてこれらの問題の克服が大きな課題となっている。

#### 細胞治療の問題点

##### ①投与細胞の物理的流失

細胞治療共通の問題点の一つに投与した細胞の残存率の低さが挙げられる。例えば骨髄幹細胞を使用した臨床治験では冠動脈内投与した細胞は数時間以内に90%以上が失われることが報告されているし、研究代表者らが行ったCDCsのブタ心筋内直接投与モデルにおいても24時間で91%の細胞が失われた。流失の詳細をラットの心筋内直接投与モデルで検証したところ、投与直後に約20%の細胞が針穴からの逆流で流失し、24時間以内にさらに70%が流失することが確認された。すなわちこれらのことはいかに“有用な細胞”を投与しても、分化・生着の過程を経る前にほとんどの細胞が物理的に失われていくということを示している。

##### ②長期の細胞生着率、分化効率の低さ

細胞治療においては、物理的流失による短期の低残存率のみでなく、長期の生着率もそれほど高くないことが知られている。例えばラット心臓においてGFPでタグをつけて投与した心筋幹細胞は24時間では約10%の細胞が検出されたが、3週間後には1%しか検出されなかった。これは細胞を傷害心筋に投与するため、細胞の生存環境自体が良くなく、低酸素や酸化酵素の影響などによるアポトーシスで失われていくこと、さらには心筋幹細胞の心臓細胞への分化効率が低いことなどが考えられている。これに対して、成長促進因子などの併用がアポトーシスを抑制し分化効率を上昇させるという報告はいくつかあるもの、いまだ実践的な応用にはいたっていない。また最近では細胞治療効果の主なる要因は、細胞自体が直接心筋細胞や血管内皮細胞などに分化することからではなく、サイトカインなど細胞分化促進因子が分泌されることによるものが大きいのではないかと考え方が主流になってきている。しかしながら、もし細胞の分化効率を向上させて多くの有効な心筋組織を生着させることが可能となれば、間接的効果(パラクライン)に比してより有利な心機能改善効果が得られるはずである。

#### 2. 研究の目的

今回我々は投与した細胞をいかに効率よく生着させられるかに焦点を当てた。投与した細胞が流失せずに心筋内にとどまるために

は、細胞をつなぎとめて置くなんらかのscaffoldが必要である。そこで我々は近年報告されたハイドロゲルに注目した。このゲルは低温(4℃)では液状であるが22℃を越えると固化をはじめ、37℃では7秒でゲル状になる。また生体内で徐々に分解され、約7-10日で腎臓より完全に排泄されることが確認されている。我々はこのゲルに細胞を封入して心筋内に投与する計画である。つまりこのゲルを使用することによる心筋内に投与した細胞の多くは流失することなく心臓内にとどまり、心筋内に徐放されていくことになる。またゲルにカタラーゼを加えることにより、細胞に酸素供給を行うことが出来、実際の細胞でも有効であるという結果を得ている。

前述のように、近年では心筋幹細胞治療による心機能改善効果は、投与した細胞が心筋に分化するという直接的な効果よりも、サイトカインの放出などによるパラクライン効果の方が主要ではないかと考えられている。もしそうであれば心筋細胞のバイアビリティが保たれているケースでは有効な治療法であると考えられるが、重度の心筋梗塞などで多くの心筋細胞が失われているような症例では、間接的な効果だけではその心臓の救命には不十分であると考えられる。重症例の治療の場合はやはり投与した細胞自体が直接心筋へ分化し、新たな心筋細胞のソースとなる必要があると考えられる。細胞治療の効果を向上させるためこれまでもシートやゲルなどの物理的な方法や、サイトカインやGrowth Factorの投与などさまざまな方法が試されてきたが、未だ確立した手法にはいたっていない。

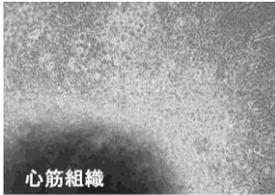
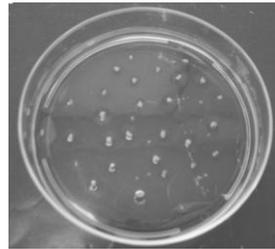
本研究の目的は、細胞の物理的な流失を抑制するとともに長期的な細胞死を抑制し、さらに心筋への分化効率を上昇させることにより細胞治療の効率を飛躍的に向上させようとするものである。この研究で用いるゲルは温度感受性があると同時に、その硬度が19-76kPaと拡張期の心筋硬度とほぼ同程度であり、心臓および投与した細胞にとってもより生理的状态に近いscaffoldである。

#### 3. 研究の方法

##### 1) 培養細胞

GFP陽性の雄性Sprague-Dawleyラットを麻酔。腹大動脈よりヘパリン加PBSで灌流し、血液を洗い流す。心臓を摘出し、即座に心筋保護液中に浸したのち左心室を0.5mm角に刻む。この組織をゼラチンコートした10cm培養ディッシュに約1cm間隔においていく(右図上)。組織が浮遊しないよう培養液を2mlのみくわえ、4時間後にさらに5ml加える。その後は3日おきに交換する。すると心筋組織から徐々に細胞が増殖してくる(右図下)。

細胞がコンフルエントになったら（約 7-14 日後）、0.05%トリプシンを用いて細胞を剥離、フィブロネクチンコートされたディッシュに移し、さらに 2 回継代する。slet1（ISL1+ハイドロゲル群）を導入した遺伝子組み換えアデノウイルスを用いて細胞に Islet1 を導入する（ISL1 群）。比較群として遺伝子導入されていないアデノウイルスを用いて感染させた群を作成する（ハイドロゲル単独投与群、細胞単独投与群）。



培養5日目の心筋試料

## 2) ハイドロゲルへの細胞封入

ハイドロゲルのパウダーを PBS で溶解し、さらに酸素を細胞に供給するためカタラーゼを混入し、氷上でよく攪拌する。次に細胞をトリプシンで剥離し細胞数を数え、遠心分離機をかけ上清を取り除く。その細胞のペレットをハイドロゲル溶液で懸濁する（200 $\mu$ l あたり  $1 \times 10^6$  個）。ハイドロゲル非投与群では濃度が同じになるよう（200 $\mu$ l あたり  $1 \times 10^6$  個）PBS で懸濁する。

## 3) ラット心筋梗塞モデル

週齢 20 の Wister 雄性ラットを麻酔下に挿管する。左開胸にて心臓を露出し冠動脈左前下行枝を 7-0 結紮糸で結紮し心筋梗塞を作成、次いで以下のように細胞もしくはコントロールとして同容量の PBS を心筋梗塞周囲巣に投与する。投与グループは次の通りとする。

(a) コントロール：心筋梗塞を作成後、同量の PBS を投与。細胞治療を行わない。

(b) 細胞のみ：同数の細胞を PBS に懸濁しに投与

(c) ハイドロゲル：細胞をハイドロゲルに懸濁して投与

各グループとも心筋梗塞周囲巣にハイドロゲル（もしくは PBS）を各 10 $\mu$ l ずつ 7 箇所、計 70 $\mu$ l 投与し開胸する。

## 4) 心機能の評価

投与直後、1 週間後、4 週間後にそれぞれ麻酔下にて造影剤を投与してマイクロ CT を用いて心臓超音波を行い、各群における心機能の変化を検証する。

## 5) 細胞残存率の定量 (retention rate)

それぞれの時点で、心臓を 4%のパラフォルムアルデヒドで固定し凍結切片とする。蛍光

顕微鏡を用いて、梗塞部位、梗塞周囲部、遠隔部のそれぞれに GFP 陽性細胞がどのくらいの割合で存在するかを検証し平均を定量化する。

## 6) 心筋幹細胞の分化効率の検証

投与した心筋幹細胞において細胞分化がさかんに行われているか、どのくらいの割合で心臓細胞に分化したかを定量するため以下のように免疫染色を行う。

DNA 合成マーカー：Ki67

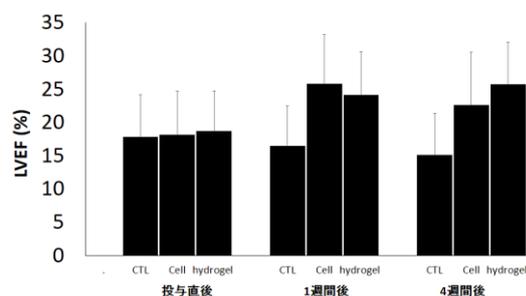
心筋マーカー：トロポニン T、ミオシン重鎖  
血管マーカー：VEGF レセプター 2、PECAM1  
心臓切片をそれぞれのマーカーで染色した後、蛍光顕微鏡で観察し GFP 陽性細胞と各マーカーが両方とも陽性な細胞の数をカウントし、生着した細胞のうちどのくらいが心臓細胞に分化したかどうかを検討する。

## 7) 細胞接着マーカーの発現の有無

心筋に分化した細胞が、元の心筋細胞と物理的・電気的結合があるかどうかを検討するためギャップ結合タンパクであるコネキシン 43 が GFP 陽性細胞と元の心筋細胞間に発現しているかを免疫染色法にて確認する。

## 4. 研究成果

投与直後の心機能はコントロール、細胞のみ、ハイドロゲル、それぞれ  $16.0 \pm 4.6$ ,  $20.8 \pm 6.0$ ,  $19.5 \pm 4.2$  と有意差はなかった。投与後 1 週間では細胞投与群で心機能が有意に改善したが、ハイドロゲル使用群と細胞投与群に心機能に有意差は見られなかった。（コントロール vs 細胞のみ vs ハイドロゲル =  $14.5 \pm 2.9$  vs  $25.9 \pm 7.3$  vs  $24.1 \pm 6.5$ ）が、術後 4 週間においてはハイドロゲル使用群で 4 週間の心機能が有意に改善した。（コントロール vs 細胞のみ vs ハイドロゲル =  $15.2 \pm 6.2$  vs  $22.6 \pm 7.9$  vs  $25.7 \pm 6.3$ ）。



組織切片および分子生物学的解析からは、ハイドロゲル使用群で細胞の残存率が高く、また心筋マーカーおよび血管マーカーが多く発現していたことから、徐放性ハイドロゲルの使用は、長期において心機能の改善およびリモデリングの抑制に有用であると考えられた。加えて、本研究期間内において、腫瘍

形成は見られなかったことから、心筋幹細胞の使用は安全であることが示唆された。

#### 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)

[学会発表] (計1件)

Matsushita Satoshi, Naito Mayuko, Amano Atsushi: Measurement of heart function for myocardial infarction model of rat by micro-CT. FASEB J. 2013;27:1126.4

[図書] (計0件)

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 訓 (Matsushita Satoshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20407315