

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700569

研究課題名(和文)多成長因子分泌型卵膜由来間葉系幹細胞シートの開発

研究課題名(英文)Development of multi-growth factor secreted fetal membrane-derived mesenchymal stem cell sheets

研究代表者

石兼 真(Ishikane, Shin)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・客員研究員

研究者番号：40470190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：慢性心不全に対する有効な治療法の開発を目的に研究を行った。心筋梗塞モデルラットにおいて、卵膜由来MSCシートの他家移植は、骨髄由来MSCシートの自己移植と同等の心機能改善効果を示した。しかし、ミニブタ心筋梗塞モデルにおいて、他家卵膜由来MSCシート移植による心機能改善効果は得られなかった。卵膜由来MSCの栄養因子分泌能を改善するために、siRNA-int6を導入しHIF2の分解抑制作用による血管新生因子の分泌促進に関する検討を行ったが、HIF2、HIF1、VEGFの発現上昇は確認されなかった。一方、心筋内に直接siRNA-int6を投与することにより、毛細血管様の血管新生作用が確認された。

研究成果の概要(英文)：To develop effective treatments for chronic heart failure, we used fetal membrane (FM) derived mesenchymal stem cell (MSC) sheets. In a rat chronic myocardial infarction (MI) model, the allogeneic FM-MSC sheets transplantation had significantly reversed wall thinning in the scar area and had improved cardiac function as well as the autologous bone marrow derived MSC sheets transplantation. However, the allogeneic FM-MSC sheets transplantation did not improve cardiac function in a mini-pig MI model. To improve secretion of angiogenic factors from the FM-MSC sheets, we transfected siRNA-int6 to the FM-MSC. The siRNA-int6 transfection reduced the int6 expression in the FM-MSC, however did not increase the HIF2 α , HIF1 and VEGF expressions. In a mini-pig acute MI model, angiogenic effect was observed by intra myocardial injection of the siRNA-int6 plasmid-GenomeONE mixture.

研究分野：人間医工学

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：卵膜 間葉系幹細胞 細胞シート パラクライン 心筋梗塞 血管新生効果

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、多能性細胞を用いた再生医療が注目され、国内外で研究が盛んに行われている。間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells; MSC) を用いた優れた治療効果が報告される一方、現在臨床で多く使用されている骨髄から自己移植に必要な細胞を採取する場合には身体への侵襲を伴うことや、高齢者や様々な疾患を持った患者から細胞採取することも多いため、質の良い細胞を大量に得ることは困難であることなど、問題点も挙げられるようになってきた。

(2) 申請者らは、現在の細胞ソースが有する問題点を克服すべく、新たな移植細胞ソースとして、分娩後に廃棄されている胎児付属物である卵膜に着目し研究を行ってきた。これまでに、ラット疾患モデルを用いた検討において、卵膜由来 MSC は他家移植に伴う拒絶反応を回避し、骨髄由来 MSC の自己移植と同等の血管新生効果、免疫抑制効果を示すことを明らかにした (Ishikane S. et al. StemCells 2008、Ishikane S. et al. J Mol Cell Cardiol 2010)。

(3) 現在、心筋梗塞治療において様々なアプローチがなされているが、重度の心筋梗塞の場合は人工心臓か心臓移植に頼らざるをえない。脳死ドナーからの臓器提供が緩和されたとはいえ、すべての患者に移植を行うことは現実的に困難である。梗塞が進行した患者自身の心臓機能を回復させることができれば、大いに QOL を改善することができる。しかし、現在の再生療法は移植細胞の生着性の低さや、十分な治療効果が得られないといった問題に直面している。単離細胞を心筋内に移植するだけでは washout され、多くの細胞 (90%以上) は心臓外へと流れてしまうと報告されており (Dow J. et al. Cardiovascular Research 2005.)、わずかに

残った細胞で十分な効果を期待するのは困難である。申請者らが着目した細胞シートは、細胞マトリックスを保持した状態での移植が可能になるので、生着性、治療効果の改善が大きく期待できる。

2. 研究の目的

(1) 慢性心筋梗塞に対する新たな治療の開発を目的として、卵膜由来 MSC シートの他家移植療法による心機能改善効果や血管新生効果を明らかにする。

(2) 卵膜由来 MSC の慢性心筋梗塞に対する治療効果を高めるため、siRNA-int6 導入による MSC シートの growth factor 分泌能改善作用、虚血心筋での血管新生効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ラット心筋梗塞モデルを用いた卵膜由来 MSC シートの他家移植による心機能改善効果の評価

温度応答性培養皿 (UpCell, 3.5cm dish) に 3×10^6 個の密度で SD ラット卵膜由来 MSC を播種し、24 時間培養した。温度処理後に単層細胞シートを作製し、さらに 2 層に積層化したものを移植シートとした。

Lewis ラットを麻酔下で開胸し、左前下行枝本幹部 (Left anterior descending; LAD) の完全結紮により心筋梗塞モデルを作製した。モデル作製 4 週間後に再開胸し、梗塞部位に積層化した卵膜由来 MSC シートを 1 枚移植した。移植 4 週間後にエコー、カテーテル検査により心機能の改善効果を評価した。マッソン・トリクローム染色による線維化抑制作用を評価した。

(2) ミニブタ心筋梗塞モデルを用いた卵膜由来 MSC シートの他家移植による心機能改善効果の評価

近交系のミニブタであるクラウン系ミニブタ（妊娠 3.5 ヶ月）から卵膜を摘出し、培養皿接着性の細胞を分離・培養した。温度応答性培養皿（UpCell、10cm dish）に 2×10^7 個の密度で卵膜由来 MSC を播種し、24 時間培養した。温度処理後に単層細胞シートを作製し、さらに 3 層に積層化したものを移植シートとした。

ミニブタを麻酔下で開胸し、Second Diagonal branch の完全結紮、ならびに LAD に Ameroid constrictor を装着することにより慢性心筋梗塞モデルを作製した。モデル作製 1 ヶ月後に再開胸し、梗塞部位に積層化した卵膜由来 MSC シートを 3 枚移植した。移植 3 ヶ月後にエコー、カテーテル検査により心機能の改善効果を評価した。マッソン・トリクローム染色による線維化抑制作用を評価した。

(3) siRNA-int6 による Growth factor 分泌型卵膜由来 MSC シートの作製、ならびに心筋梗塞に対する心機能改善効果、血管新生効果の評価

Lipofectamine を用いて、MSC に siRNA-int6 を導入した。24、48 時間後に RNA を抽出し、リアルタイム PCR にて int6 や血管新生関連因子の変化を評価した。

siRNA-int6 を導入した MSC を用いて細胞シートを作製し、2 層に積層化したものを移植シートとした。Lewis ラットを麻酔下で開胸し、LAD の完全結紮により心筋梗塞モデルを作製した。モデル作製直後に、梗塞部位に積層化した卵膜由来 MSC シートを 1 枚移植した。移植 4 週間後にエコー、カテーテル検査により心機能の改善効果を評価した。

ミニブタを麻酔下で開胸し、Second Diagonal branch の完全結紮ならびに LAD の First Diagonal branch (D1) 直下を結紮することにより急性心筋梗塞モデルを作製した。モデル作製直後に、結紮した LAD 周

辺部位へ siRNA-int6 を Genome-ONE を用いて直接筋肉内投与した。移植 2、4 週間後にカテーテル検査により血管新生効果を評価した。

4. 研究成果

(1) ラット心筋梗塞モデルを用いた卵膜由来 MSC シートの他家移植による心機能改善効果

他家移植した卵膜由来 MSC シートは、移植 2 週間後にシート状に心筋表面に生着しており、4 週間後にはわずかであるが梗塞部位での生着が確認された。移植 4 週間後の左心エコー、カテーテル評価において、コントロール群と比較して他家卵膜由来 MSC シート移植群で有意な心機能改善効果 (ejection fraction [EF]; 55.4 ± 2.6 vs. $44.0 \pm 3.2\%$, $P < 0.05$) や血管新生効果が確認された。また、他家卵膜由来 MSC シート移植による心機能改善効果は、骨髓由来 MSC シートの自己移植 (EF; $56.3 \pm 2.4\%$) と同等だった (図 1)。心筋梗塞による前壁菲薄化が、卵膜由来 MSC シート移植により改善された (1.0 ± 0.1 vs. 0.7 ± 0.1 mm, $P < 0.05$)。

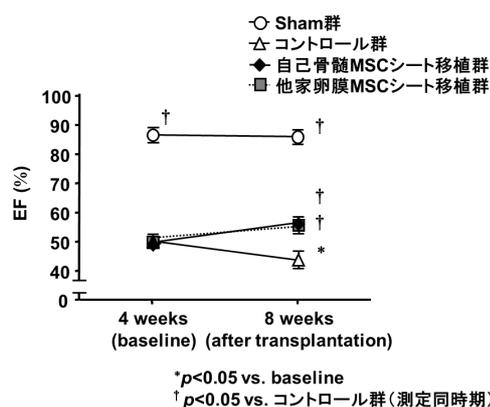


図 1 ラット心筋梗塞モデルにおける卵膜由来 MSC シートの他家移植による心機能改善効果

マッソン・トリクローム染色による評価において、卵膜由来 MSC シートの他家移植は

コントロールと比較して有意な線維化抑制効果を示した (61.9 ± 5.4 vs. $30.9 \pm 3.1\%$, $P < 0.05$)。

ラット心筋梗塞モデルを用いた検討において、卵膜由来 MSC シートの他家移植は、骨髄由来 MSC シートと同等の治療効果を示したことから、大動物での有効性検討を開始した。

(2) ミニブタ心筋梗塞モデルを用いた卵膜由来 MSC シートの他家移植による心機能改善効果

妊娠クラウン系ミニブタから卵膜を摘出し、培養皿接着性の細胞を分離・培養することに成功した。得られた細胞は、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞への分化能を有しており、表面抗原の解析から MSC としての定義を満たしていた。得られたミニブタ卵膜由来 MSC を用いて直径約 5cm の細胞シートを作製し、心筋梗塞作製 4 週間後に移植した。移植 3 ヶ月後に、心エコー評価を行ったが、コントロール群と比較して卵膜 MSC シート移植群で有意な心機能改善効果 (EF; 44.1 ± 5.9 vs. $43.0 \pm 9.3\%$)、前壁菲薄化改善効果 (8.3 ± 0.5 vs. $9.0 \pm 1.2\text{mm}$) は確認されなかった (図 2)。また、心筋の線維化をマッソン・トリクローム染色により評価したが、シート移植群で梗塞領域の減少は確認されなかった。

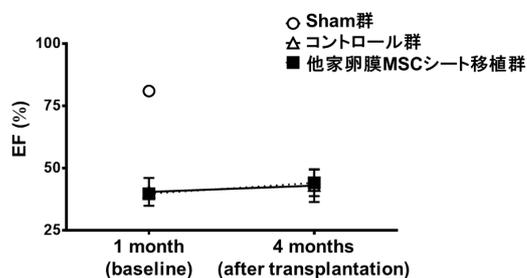


図 2 ミニブタ心筋梗塞モデルにおける卵膜由来 MSC シートの他家移植による心機能改善効果

ミニブタ心筋梗塞モデルを用いた検討において、卵膜由来 MSC シート移植は心機能改善効果、線維化抑制効果を示さなかったことから、治療効果を高めるために Growth factor 分泌型卵膜由来 MSC シートの作製を開始した。

(3) siRNA-int6 による Growth factor 分泌型卵膜由来 MSC シートの作製、ならびに心筋梗塞に対する心機能改善効果、血管新生効果の評価

MSC に siRNA-int6 を導入することにより、24、48 時間後にネガティブコントロール導入 MSC と比較して int6 の発現が約 90% 低下していた。しかし、HIF2 α 、HIF1、VEGF の発現上昇は確認されなかった。

siRNA-int6 導入 MSC シートを急性心筋梗塞ラットに対して移植を行い、移植 4 週間後に心エコー評価を行ったが、ネガティブコントロールを導入した MSC シート移植群と比較して有意な心機能改善効果は得られなかった (EF; 58.4 ± 6.7 vs. $64.5 \pm 13.0\%$)。ミニブタ心筋梗塞作製直後に、結紮した LAD 周辺に Genome-one を用いて siRNA-int6 を 6 か所筋注投与した。siRNA-int6 投与 4 週間後に、カテーテルにより冠動脈造影を評価した。ネガティブコントロール投与群では結紮 LAD 下流に血流造影は確認されなかったが、siRNA-int6 投与群では毛細血管様の血流が確認された (図 3、点線部位)。

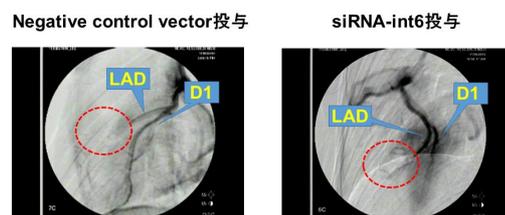


図 3 ミニブタ心筋梗塞モデルにおける siRNA-int6 の筋肉内投与による血管新生効果

卵膜由来 MSC に siRNA-int6 を導入し、HIF2 α の分解抑制効果による栄養因子分泌能の増加に関する検討を行ったが、int6 のノックダウン効果は確認されたものの、栄養因子分泌能の増加作用は確認されなかった。一方、虚血心筋内に直接投与を行うことにより、毛細血管様の血管新生を確認することができた。

本研究により、心筋梗塞に対する細胞移植療法において、細胞のシート化により生着率の改善が確認され、小動物を用いた検討において、卵膜由来 MSC シートの他家移植は骨髄由来 MSC シートの自己移植と同等の心機能改善効果や血管新生効果を示すことが明らかになった。しかし、大動物を用いた検討においては、卵膜由来 MSC シートの他家移植による有意な心機能改善効果は確認されなかったことから、今後臨床応用に発展させるためには、さらなる治療効果の改善が必要であることが明らかになった。また、siRNA-int6の導入による MSC の栄養因子分泌能の増加作用は得られなかったが、虚血心筋への siRNA-int6 の直接投与により毛細血管様の新生血管が確認された。今後は、siRNA-int6 による血管新生機序を明らかにするとともに、MSC 移植療法と siRNA-int6 投与の併用による心筋梗塞や虚血性疾患に対する新規治療法の開発へと研究を進展させる。

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)

[雑誌論文](計 6 件)

Shin Ishikane, Hiroshi Hosoda, Kenichi Yamahara, Yoshiharu Akitake, Jung Kyoungsook, Kenichi Mishima,

Katsunori Iwasaki, Michihiro Fujiwara, Mikiya Miyazato, Kenji Kangawa, Tomoaki Ikeda. Allogeneic transplantation of fetal membrane-derived mesenchymal stem cell sheets increases neovascularization and improves cardiac function after myocardial infarction in rats. *Transplantation*. 2013; 96: 697-706. 査読有

DOI: 10.1097/TP.0b013e31829f753d.

石兼 真, 池田 智明. 卵膜由来の間葉系幹細胞を用いた再生医療の将来. *Biophilia*. 2011;第 7 巻 第 3 号: 38-43. 査読無

<http://biophilia.jp/journal/biophilia-27.html>

石兼 真. 卵膜由来間葉系幹細胞の再生医療応用を目的とした治療効果ならびに安全性に関する研究. 福岡大学薬学集報. 2011; 第 11 巻 35 号: 17-25. 査読無

<http://www.adm.fukuoka-u.ac.jp/fu844/home2/Ronso/Yakugaku/P11-1/P11-1mokuji.htm>

[学会発表](計 3 件)

早川英毅, 小野富男, 石兼真, 秋武義治, 細田洋司, 風間智彦, 松本太郎, 池田智明, 芝崎太. Int6 抑制による血管新生の機序解明と臨床応用. Conference for Biosignal Medicine 2012, 2012年8月31日-9月2日(三重)

石兼真, Jung Kyoungsook, 上田恵子, 桂木真司, 根木玲子, 山中薫, 池田智明. 慢性心筋梗塞に対する卵膜由来間葉系幹細胞シートの他家移植による心機能改善効果、生着性に関する検討. 第63回日本産科婦人科学会学術講演会, 2011年8月29-31日(大阪)

石兼真, 細田洋司, Jung Kyongsook, 秋武善治, 三島健一, 岩崎克典, 藤原道弘, 早川英毅, 芝崎太, 池田智明. 卵膜由来間葉系幹細胞を用いた再生医療における他家細胞移植療法の確立. Conference for Biosignal Medicine 2011, 2011年6月24-26日(長野)

〔図書〕(計 1 件)

Shin Ishikane, Hiroshi Hosoda, Tomoaki Ikeda. Therapeutic application of allogeneic fetal membrane-derived mesenchymal stem cell transplantation in regenerative medicine. Intech. *Tissue Regeneration*. 2012; 221-236.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石兼 真 (ISHIKANE, Shin)

独立行政法人国立循環器病研究センター

ー・研究所・客員研究員

研究者番号：40470190