

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 6 月 10 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790755

研究課題名（和文）多能性ヒトMesoangioblastの末梢循環への動員機序の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of mobilization of human multipotent mesoangioblast.

研究代表者

岩崎 真佳（IWASAKI MASAYOSHI）

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：30548706

研究成果の概要（和文）：われわれがごく最近報告した多能性ヒトMesoangioblasts (MAB)は開心術中の患者末梢血中に存在し、骨髄細胞よりも高い増殖能、分化能を有していると考えられる。以前の我々の検討で、hepatocyte growth factor (HGF)がMABの末梢血中への動員に強く関与していることが示唆されており、術前に用いられるヘパリンが静脈内投与後、速やかに血漿中HGF濃度を上昇させることが報告されている。今回、我々は、心臓カテーテル検査中の患者群において、ヘパリンが容量依存性に血漿中HGF濃度を上昇させ、獲得できるcMABのコロニー数も増加させることなどがわかった。

研究成果の概要（英文）：We previously identified circulating mesoangioblasts (cMABs), a subset of mesenchymal stem cells that co-express KDR and Nkx2.5, from the patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. cMABs are capable of differentiating into endothelial cells, smooth muscle cells and cardiomyocytes. More recently, we demonstrated that hepatocyte growth factor (HGF) induces cMAB mobilization in animal model. We hypothesized that heparin induces cMAB mobilization in humans because it is well known that heparin can very rapidly up-regulate the serum levels of HGF. We found that heparin dose-dependently increased serum HGF levels and the number of cMAB colonies in patients with cardiac catheterization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科一般（含心身医学）

キーワード：再生医療、トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

心不全患者の予後はβ遮断剤の投与によりある程度改善されたものの、いまだ極めて

不良であり、新しい治療法の開発は急務である。心機能障害を持つ患者に対し、幹細胞・前駆細胞療法はひとつの有望な治療方法で

あると考えられ、現在、主に臨床応用されているのは自己骨髄細胞である。その有用性は欧米諸国の臨床試験で証明されているが、その効果自体は決して満足のいくものではない。一方で最近の Topic である inducible pluripotent stem cell (iPSC) はそのポテンシャルの高さは疑うべくもないが、その臨床応用となると、誘導率の低さ、遺伝子導入された細胞の危険性、さらにその細胞の分化のコントロール（腫瘍形成を含めた）など越えていかなければならないハードルはいまだ非常に高いと言わざるを得ない。以上の背景から新たなポテンシャルが高く、かつ腫瘍形成能を有さない細胞、そして臨床応用がより容易である細胞の発見は重要な課題の一つである。

2. 研究の目的

心機能障害を持つ患者に対し、幹細胞・前駆細胞療法は有望な治療方法である。現在主に臨床応用されているのは自己骨髄細胞であるが、われわれがごく最近 Circulation Research に報告した human multipotent circulating mesoangioblast (Koyanagi M*, Iwasaki M* (*: equally contributed) et al. Circ Res 106: 1290-302, 2010.) は末梢血中に存在し、骨髄細胞よりも高い増殖能、分化能を有していると考えられる。今回の研究の目的はこの細胞が末梢循環血中に動員されるメカニズムを解析することで、末梢循環血中に動員されるきっかけとなりうる因子を同定し、この大きな可能性を秘めた細胞の臨床応用を少しでも容易なものにすることである。

3. 研究の方法

(1) ヘパリンによる cMAB の末梢血中への動員の可能性に関する検討：これまでのの

我々の検討で、hepatocyte growth factor (HGF) が MAB の末梢血中への動員に強く 関与していることが示唆されており、術前に用いられるヘパリンが静脈内投与後、速やかに血漿中 HGF 濃度を上昇させることが報告されているため、ヘパリンの可能性に注目し研究を行った。

ヘパリンは日常臨床で頻用されている薬剤なので、ヘパリンが投与されている患者の末梢血を用いて、ヘパリンの至適投与量及び投与タイミングを、また、cMAB が出現するタイミング（投与後何時間後～何日目）などをヒトからの採血サンプルで細かに検討を行った。HGF との関連に関してはヒトでの条件が確立出来次第、ラット、マウスを用いて開始した。

(2) cMABs の出所に関する検討：採血で獲得できるサンプル量の問題で、まずはラットの使用予定していた。細かな検討に関しては無論マウスを用いたほうが行いやすいので、その後順次、マウスへ移行していく予定を立てた。また、ヒトにおいても部位別の末梢血サンプリングを行うことで検討を行うこととした。

4. 研究成果

(1) ヘパリンによる cMAB の末梢血中への動員の可能性に関する検討に関して：まずは従来通り、開心術中の患者から検討を始めた。実際、開心術中の HGF 濃度上昇に関してはこれまでの報告からヘパリンと人工心肺の関与が考えられた。従って、開心術中の血液サンプリングを従来通りのプロタミンの投与直前に行うだけでなく、（ヘパリン投与後で）人工心肺が稼働する直前にも行い、血漿中の HGF 濃度、ならびに獲得できた MAB のコロニー数を比較検討した。結果、ヘパリン投与後で、人工心肺使用前のタイミングでも cMAB を獲得できることが判明し、cMAB の末梢血中

への動員に關与する因子として「ヘパリン→血漿中 HGF 濃度↑」が強く疑われた。従ってこの2年間はヘパリンの効果を確認すべく、心臓カテーテル検査中の患者末梢血の検索を開始した。まずは、心臓カテーテルを行う際に投与するヘパリンの量を 100U/kg, 200U/kg, 300U/kg に設定し検討を行った。結果、ヘパリンは容量依存性(100U/kg, 200U/kg, 300U/kg)に血漿中 HGF 濃度を上昇させるだけでなく、獲得できる cMAB のコロニー数をも増加させることがわかった(100U/kg ではほとんど獲得できなかつた)。また、血漿 HGF 濃度と cMAB のコロニー数との経時変化を心臓カテーテル検査前、心臓カテーテル検査中、そして検査翌日の朝の3ポイントで確認したところ、cMAB のコロニー獲得効率は血漿 HGF 濃度がピークを示す心臓カテーテル検査中のタイミングと一致していた。以上のことからヒトにおいて、ヘパリンは恐らく血漿 HGF 濃度の上昇を介して cMAB の末梢血中への動員を誘導していると考えられた。

そこで「ヘパリン→血漿中の HGF 濃度上昇→MAB の動員」の仮説を証明すべく、ヘパリンを投与した動物の血中において HGF の blocking experiment を行うことを考えた。そのためにはヘパリン投与によって安定した再現性で動物において MAB を獲得する必要がある。ラット、マウスに様々な容量のヘパリンを投与し、様々なタイミングで採血を行った。しかし、結果は、ある容量のあるタイミングで大量の cMAB 様の細胞を獲得することはあつたものの、再現性は非常に乏しく、最終的に動物モデルの樹立は断念した。

平行してヒトにおいてはその後、ヘパリンの MAB 動員効率の改善の可能性を検討した。300U/kg のヘパリン投与は決して安全とはい切れないためである(通常的心臓カテーテル検査では <100U/kg が用いられる)。血漿

中の HGF 濃度が重要と考えられたため、開心術中と心臓カテーテル中の血漿 HGF を比較検討してみたところ、100U/kg のヘパリン投与による血漿中 HGF 濃度の上昇は、開心術中のものと同等であつた。これは 100U/kg のヘパリンでも十分 MAB を動員できる可能性を強く示唆している。そのため、開心術と心臓カテーテルのプロトコルの違いを詳細に検討し、心臓カテーテルのプロトコルに若干変更を加えた。そして 100U/kg のヘパリンを使用し、心臓カテーテル検査を行ったところ、cMAB のコロニー獲得効率は 300U/kg と同等かそれ以上に改善することを見いだした。現在も効率の更なる改善をもとめ、プロトコルの微調整を行っている。

(2) cMABs の出所に関する検討に関して：

ヒトでヘパリンを使用し cMAB の動員に成功したので、ラットやマウスで動物モデルを樹立し、出所の解析を行おうと考えたが、上述したように安定したモデルを樹立できなかった。現在、この cMAB の出所をヒトにおいて検索中である。

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)

[学会発表] (計4件)

①発表者名：秦嘉亮、岩崎真佳 他

発表標題：Heparin induces the mobilization of human multipotent circulating mesoangioblasts during cardiac catheterization.

学会名：第77回日本循環器学会学術集会

発表年月日 2013年3月15日

発表場所：パシフィコ横浜(横浜)

②発表者名：秦嘉亮、岩崎真佳 他

発表標題：Multipotent human

mesoangioblasts mobilization induced by

heparin.

学会名 : ESC Congress 2012

発表年月日 2012 年 8 月 27 日

発表場所 : Internationales Congress Center
München. (Munich, Germany)

③発表者名 : 藤高啓祐、岩崎真佳 他

発表 標 題 : ヘパリンによる多能性ヒト
Mesoangioblast の循環血中への動員

学会名 : 第 11 回日本再生医療学会総会

発表年月日 2012 年 6 月 13 日

発表場所 : パシフィコ横浜 (横浜)

④発表者名 : 藤高啓祐、岩崎真佳 他

発表 標 題 : Heparin mobilizes multipotent
human mesoangioblasts.

学会名 : AHA scientific session 2011

発表年月日 2011 年 11 月 16 日

発表場所 : the Orange County Convention
Center (Orland, Florida).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 真佳 (IWASAKI MASAYOSHI)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 30548706

