

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590482

研究課題名(和文)自己心筋線維芽細胞を利用した重症心不全治療法の開発

研究課題名(英文) Degenerative therapy for heart failure using autologous myocardial fibroblast.

研究代表者

河口 直正 (Kawaguchi, Naomasa)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70224748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、組織メタロプロテアーゼ阻害物質(TIMPs)を用いて心不全心に存在する線維芽細胞を収縮能を持つ筋肉細胞の一つである筋線維芽細胞に分化させ、心不全心に筋肉細胞を増加させることにより心機能を改善させる新しい治療法の開発を目的とした。TIMPsは線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を増強させ、さらに伸展刺激による心筋細胞の肥大を有意に抑制した。TIMPs徐放コラーゲンゲルを虚血性心筋症モデルラットの心臓に貼付し検討した結果、心機能の改善、筋線維芽細胞の増加、心筋リモデリング抑制作用が認められた。以上よりTIMPsによる治療は、重症心不全に対する移植細胞を用いない新しい治療法となることが示された。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) on cardiac fibroblasts (CFs) and cardiomyocytes (CM). In vitro, TIMP-1～-4 enhanced smooth muscle actin (SMA) expression in CFs, and TIMP-1 and TIMP-3 enhanced the expression of phosphorylated Smad-3 and phosphorylated transforming growth factor type 1 receptor in CFs. TIMP-1, -3, and -4 also inhibited the FAK, AKT, and ERK pathways that induce cardiac hypertrophy. Collagen gels containing TIMP-1 or TIMP-3 were transplanted to the left ventricular anterior wall of an ischemic cardiomyopathy (ICM) rat. Gel-released TIMP-1 and TIMP-3 significantly improved cardiac function and myocardial remodeling and enhanced SMA expression in the infarcted area in ICM rat. TIMPs may be an ideal target of cardiac regeneration therapy.

研究分野：心臓血管病理学

キーワード：再生医学

1. 研究開始当初の背景

現在では虚血性心筋症などの重症心不全に対する唯一の治療法といわれた心臓移植も本邦では、移植登録から平均約 883 日の期間の待機を余儀なくされる状態にあり、実際には長い待機期間をブリッジとして左室補助人工心臓(LVAD)を装着して待機することがほとんどである。しかし、国内の LVAD 装着下の待機においては 1 年生存率が 50%以下と成績不良である。このような現状の中、心臓移植、LVAD に代わる新たな治療法として、筋芽細胞等を心臓に移植する心筋再生療法の研究が行われている。

我々は、組織工学技術を応用した温度応答性培養皿を使った筋芽細胞シート移植を手がけ、心不全に対する筋芽細胞シート移植法は、心機能改善効果が期待できる次世代の重症心不全治療法であることを示してきた。

しかし、筋芽細胞シート移植法による心機能改善効果は長期間持続しないことが欠点である。これは、移植した筋芽細胞の生存率が低いことが原因と考えられる。筋芽細胞以外の細胞を用いた国内外の研究においても同様に移植した細胞の生存率が低いのが現状である。さらに、iPS 細胞や ES 細胞などから心筋細胞に分化させて移植する心筋再生療法においても心筋細胞への分化効率が低いことや移植された細胞の腫瘍化等の問題点がある。

このような理由から我々は、host の心不全の心筋組織中に多数存在している線維芽細胞に着目し host 心筋組織中で線維芽細胞を筋肉細胞の一つである筋線維芽細胞に分化させ心不全の左室自由壁に収縮性と弾性を与える方法を考え出した。筋線維芽細胞は、 α -アクチンを発現する強い収縮能を持つ細胞で平滑筋細胞様の形態を特徴し、最近では筋肉細胞に分類される。

2. 研究の目的

本研究は線維芽細胞を筋線維芽細胞へ分化させる組織メタロプロテアーゼ阻害物質(tissue inhibitor metalloproteinase)を重症心不全に作用させ、host 心不全の心筋組織中に存在する線維芽細胞を収縮能を持つ筋肉細胞の一つである筋線維芽細胞に分化させ、心不全に筋肉細胞を増加させることにより心機能改善効果を長期間維持する新しい治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* での検討

4 種類の組織メタロプロテアーゼ阻害物質 (TIMP; TIMP1, TIMP2, TIMP3, TIMP4) より線維芽細胞を筋線維芽細胞に分化させる効率が高く、心筋細胞のリモデリング抑制作用とアポトーシス抑制作用の高い TIMP の選択を行った。

リコンビナント TIMP の作製。

TIMP1、TIMP2、TIMP3、TIMP4 の遺伝子を含むプラスミドを COS および HEK293T 細胞に遺伝子導入し、培養上清を回収、精製しリコンビナント TIMP を作製した。

線維芽細胞を筋線維芽細胞に分化させる効率の検討。

ラット心筋梗塞モデルを作製し、梗塞部より単離し培養した心筋線維芽細胞 (CF 細胞) を用いて、4 種類の TIMP (TIMP1、TIMP2、TIMP3、TIMP4) について、線維芽細胞から筋線維芽細胞に分化させる効率について筋線維芽細胞の指標である平滑筋アクチン (smooth muscle actin; SMA) を指標としてウエスタン・ブロット法、免疫組織化学的手法を用いて検討した。

心筋細胞のリモデリング (肥大) 抑制効果の検討。

新生児ラットの心臓より単離した心筋細胞に、伸展培養装置を用いた伸展刺激を与えることで心肥大を誘導させ、4 種類の TIMP を作用させたときのシグナル伝達系の活性化 (MAPK 経路、FAK 経路、AKT 経路) をウエスタン・ブロット法で検討した。

心筋細胞に対するアポトーシス抑制効果の検討

虚血状態にした新生児ラット単離心筋細胞に 4 種類の TIMP を作用させたときのアポトーシス抑制効果について、PARP、cleaved PARP、Bcl-2、Bax のタンパク発現量の変化についてウエスタン・ブロット法を用いて検討した。

Smad シグナル、成長因子およびケモカインに対する作用の検討。

TIMP1、TIMP3 を CF 細胞に作用させてウエスタン・ブロット法で Smad 経路を検討した。成長因子およびケモカインについては、肝細胞成長因子 (HGF)、線維芽細胞成長因子 (FGF)、インシュリン様成長因子 (IGF)、血管内皮細胞成長因子 (VEGF)、ストロマ細胞由来因子 (SDF-1) の mRNA 量を定量 PCR で検討した。さらに、ELISA 法で CF 細胞の培養上清中の各成長因子とケモカインのタンパク量を定量した。

(2) *in vivo* での検討

TIMP1 および TIMP3 徐放コラーゲンゲルを虚血性心筋症モデルラット心に貼付し、TIMP1、TIMP3 の心機能改善効果、心筋リモデリング、アポトーシス抑制効果およびマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase; MMP) 阻害作用について検討した。

虚血性心筋症モデルラットの作製。
SD ラット (8 週齢、オス、200-250g) に全

身麻酔下、左開胸にて左冠状動脈前下行枝を結紮し心筋梗塞を作製し、結紮後 2 週間にて心エコーを行い、亜急性期の心筋梗塞モデルであることを確認した。その後、再度、全身麻酔下、左開胸にて TIMP 徐放コラーゲンゲルを左室前壁の梗塞領域に貼付した。実験群は TIMP1 徐放コラーゲンゲル貼付群 (TP1 群、n=20)、TIMP3 徐放コラーゲンゲル貼付群 (TP3 群、n=20)、リン酸緩衝液徐放コラーゲンゲル貼付群 (PBS 群、n=20)、左開胸のみの対照群 (C 群、n=20) の 4 群とした。

心機能評価

心エコーにてゲル貼付後 2 週、4 週、6 週、8 週に左室収縮率、左室内径短縮率、左室断面面積 (拡張末期腔面積、収縮末期腔面積) を計測した。

左室リモデリング抑制効果の検討

ゲル貼付後 2 週 (各群 n=5)、4 週 (各群 n=5)、6 週 (各群 n=5)、8 週 (各群 n=5) 後に犠牲死せしめ、心臓を摘出しヘマトキシリン・エオジン染色、マッソン染色、シリウス赤染色、PAS 染色、エラスチカ・ワンギーン染色を行い、梗塞近傍領域における心筋線維化 (シリウス赤染色)、心筋細胞横径 (PAS 染色)、左室自由壁厚および左室腔直径 (マッソン染色) を計測し、リモデリング抑制効果を検討した。また、エラスチカ・ワンギーン染色によりゲル貼付部位における弾性線維量を計測した。筋線維芽細胞のゲル移植部位での集積は、抗 SMA 抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。

アポトーシス抑制作用の検討

心筋組織を梗塞部、梗塞境界部、左室壁部に分けてそれぞれの部位での PARP、cleaved PARP の発現をウエスタン・ブロット法を用いてアポトーシス抑制作用を検討した。

MMP の阻害作用の検討

心筋組織を梗塞部、梗塞境界部、左室壁部での MMP に対する阻害作用をザイモグラフィ法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) *in vitro* での検討

線維芽細胞を筋線維芽細胞に分化させる効率

TIMP1、TIMP2、TIMP3、TIMP4 を添加した心線維芽細胞では、SMA の発現量の増加が認められ、その増加はいずれの TIMP ファミリーを添加した場合においても同程度であった。

心筋細胞のリモデリング (肥大) 抑制効果

伸展刺激により心肥大を誘導した新生児ラットの単離心筋細胞に TIMP を作用させさせたところ、対照に比較して TIMP1、TIMP3、TIMP4 で Erk、FAK、Akt のリン酸化量が低下しているが、TIMP2 を作用させ

た単離心筋細胞においてはリン酸化量に変化は認められなかった。

心筋細胞に対するアポトーシス抑制効果

虚血によりアポトーシスを誘導させた単離心筋細胞に TIMP を添加したところ TIMP1、TIMP2 で cleaved PARP、Bax の発現量が低下、Bcl-2 の発現量の増加が認められたが、TIMP-3、TIMP-4 を添加した単離心筋細胞ではこれらのタンパクの発現量に変化はなかった。

Smad シグナル、成長因子およびケモカインに対する作用

TIMP1、TIMP3 添加により CF 細胞におけるトランスフォーミング成長因子受容体 type1 (T6R1) と Smad のリン酸化および SMA 発現が増強した。そして、T6R1 の阻害剤 SB-5050124 の添加により T6R1 と Smad のリン酸化および SMA の発現が減少した。

TIMP1、TIMP3 添加により CF 細胞における IGF および CDF-1 の mRNA 量が対照に比較し有意に増加した。FGF、HGF、VEGF については TIMP3 の添加により有意に増加した。CF 細胞の培養上清中に分泌された HGF、FGF、IGF、VEGF、SDF-1 のタンパク量は TIMP1、TIMP3 添加により対照に比較して有意に増加した。

(2) *in vivo* での検討

心体重比

TP1 群および TP2 群で PBS 群、C 群に比較しゲル貼付 2、4、6、8 週目で有意な心体重比の低下が見られた。

心機能評価

TIMP1 および TIMP2 徐放コラーゲンゲルを貼付した TP1 群および TP2 群で PBS 群、C 群に比較しゲル貼付後 2 週目より左室駆出率、左室内径短縮率の有意な上昇と左室拡張末期径、左室収縮末期径の低下が認められた。そして、その効果は貼付後 8 週目まで持続していた。

左室リモデリング抑制効果

TP1 群および TP2 群で PBS、C 群に比較しゲル貼付後 2、4、6、8 週で左室腔の拡張が有意に抑制されていた。心筋線維化量、心筋細胞横径共に梗塞近傍領域において PBS 群、C 群に比較し TP1 群および TP2 群でゲル貼付後 2、4、6、8 週で有意に低値であった。梗塞領域における弾性線維の割合は TP3 において PBS、C 群に比較しゲル貼付後 4、6、8 週目で高値となった。TP1 群および TP2 群で SMA 陽性の筋線維芽細胞の集積がゲル貼付後 4 週目より梗塞領域で PBS 群、C 群に比較し有意に増加し、ゲル貼付後 6 週目および 8 週目においては 4 週目よりもさらに多数の筋線維芽細胞が観察された。

アポトーシス抑制作用

TP1 群および TP3 群で梗塞近傍領域において cleaved PARP 発現の減少が PBS 群、C 群に比較して見られ、特に TP1 群では全期間を通じて cleaved PARP 発現の減少が認められ。

MMP の阻害作用

TP1 群および TP3 群においてゲル貼付後 6 および 8 週目で梗塞領域および梗塞近傍領域の MMP-2 の活性を阻害した。

以上の結果より TIMP1 および TIMP3 は 1)線維芽細胞を SMA 陽性の筋線維芽細胞への分化作用および梗塞領域への筋線維芽細胞を集積・増加させる作用 2)心筋リモデリング抑制作用 3)心筋細胞のアポトーシス抑制作用 4)心筋線維芽細胞からの成長因子およびサイトカイン分泌作用 5)マトリックスメタロプロテナーゼ阻害作用を有することが示された。このことより組織メタロプロテナーゼ阻害物質 - 1(TIMP1)および - 3(TIMP3)は host の心不全心存在する線維芽細胞を利用して不全心筋組織中に筋肉細胞を増加させることが明らかとなった。さらに、心筋リモデリング抑制作用、アポトーシス抑制作用および成長因子分泌作用も有することが分かった。

TIMP1 および TIMP3 徐放コラーゲンゲルによる治療法は、重症心不全の対する移植細胞を用いない新しい治療法となることが示された。

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 3 件)

Uchinaka A, Kawaguchi N, Mori S, Hamada Y, Miyagawa S, Saito A, Sawa Y, Matsuura N, Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -3 improves cardiac function in an ischemic cardiomyopathy model rat. Tissue Engineering Part A 査読有 20:2073-3084, 2014 DOI: 10.1089/ten.tea.2013.0763

Uchinaka A, Kawaguchi N, Hamada Y, Mori S, Miyagawa S, Saito A, Sawa Y, Matsuura N, Transplantation of myoblast sheets that secrete the novel peptide SVVYGLR improves cardiac function in failing hearts. Cardiovascular Research 査読有 99:102-110, 2013 DOI:10.1093/cvr/cvt088

[学会発表](計 4 件)

Uchinaka A, Mori S, Hamada Y,

Matsuura N, Kawaguchi N, Tissue inhibitor of metalloproteinase improved cardiac performance in an ischemic cardiomyopathy. 第 31 回国際心臓研究学会(ISHR)日本部会、2014 年 11 月 28 日、名古屋

Uchinaka A, Kawaguchi N, Hamada Y, Mori S, Miyagawa S, Saito A, Sawa Y, Matsuura N, Transplantation of SV peptide-secreting myoblast sheets improved cardiac function in infarcted rat heart. International Society Heart Research, 2013 年 7 月 3 日, San Diego(USA)

6. 研究組織

(1)研究代表者

河口 直正 (KAWAGUCHI, Naomasa)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70224748

(2)研究分担者

森 誠司 (MORI, Seiji)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90467506

濱田 吉之輔 (HAMADA, Yoshinosuke)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：10362683

松浦 成昭 (MATSUURA, Nariaki)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70190402

(3)連携研究者

宮川 繁 (MIYAGAWA, Sigeru)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70544237