

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591093

研究課題名(和文)筋線維芽細胞自家移植による大型心筋梗塞後の左室リモデリング治療

研究課題名(英文) Reinforcement of infarct scar by targeted transplantation of myofibroblasts reverses postinfarction cardiac remodeling

研究代表者

竹村 元三 (Genzou, Takemura)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：40283311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は心筋梗塞の病変部に細胞を移植することで心不全悪化を予防することである。梗塞部に発現している分子に接着する分子を遺伝子導入にて自家筋線維芽細胞に強発現させ心筋梗塞モデルマウスに静脈内投与を行う実験を継続中である。われわれの他の類似研究(インテグリン β 1遺伝子導入内皮前駆細胞による末梢血管閉塞病変の治療)では良好な結果が出ている。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to prevent the postinfarction left ventricular remodeling and heart failure by autologous cell transplantation. We are performing the experiments in which we intravenously inject the skin-derived myofibroblasts overexpressing integrin β 1 to the mice bearing a large myocardial infarction. Although the results are not conclusive yet, we obtained an excellent results in another similar study in which the intravenously injected endothelial progenitor cells overexpressing integrin β 1 greatly improved the blood flow of ischemic legs of mice.

研究分野：循環器内科

キーワード：Cell therapy Heart failure Integrins Myocardial infarction Remodeling

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞後の心不全への進展には発症時の梗塞サイズが最重要であるが、治癒過程における炎症、間質変化、細胞肥大ないし細胞死も大きな寄与因子である。治癒過程において梗塞巣肉芽組織の非心筋細胞はアポトーシスで消失し最終的に細胞成分の乏しく薄い癒痕組織となる (*Circ Res.*1998)。このアポトーシスを人為的に阻害すると肉芽組織細胞、特に筋線維芽細胞が残存し梗塞壁厚が保たれ、梗塞後のリモデリングならびに心不全が軽減される (*Circulation.*2003; *Circ Res.*2004)。Laplace の法則により菲薄化した梗塞壁には過大な壁ストレスがかかりリモデリングを助長するため、抗アポトーシスによる肉芽細胞温存療法は、亜急性期から開始できる新しい梗塞後心不全予防法である。しかしこの方法も梗塞壁の菲薄化が完成した慢性期には施行できない。

そこで今回申請者らは梗塞巣非心筋細胞 (筋線維芽細胞) の細胞死予防から一歩進んで、同細胞の自家移植による菲薄化した梗塞壁への治療法を考えた。すなわち大型梗塞慢性期の完成した心不全において、皮膚から採取した筋線維芽細胞を自家移植し、梗塞壁厚を増加させ、リモデリングならびに心不全を軽減することを明らかにする。移植された細胞を効率よく心臓へ誘導する工夫として、不全心筋は種々のサイトカイン等を過剰発現しているため、その受容体を筋線維芽細胞に過発現させておき (分子標的化)、生体が本来有するホーミング機構のアナロジーを利用する。

2. 研究の目的

自己筋線維芽細胞をホーミング関連分子で修飾し実験動物に経静脈投与することにより梗塞部位に移植する。もって、内因性ホーミング機構のアナロジーを利用し梗塞組織を構造的に改変するという全く新しい治療コンセプトに基づく大型梗塞後心不全に

対する非侵襲的細胞治療法を開発すること。

3. 研究の方法

1) 分子標的化筋線維芽細胞の調整

(1-1) **筋線維芽細胞**: GFP-Tg マウス (C57BL6 バックグラウンド) の皮膚から筋線維芽細胞を採取・培養し、TGF- β 1 で刺激し筋線維芽細胞に分化させる。今回、筋線維芽細胞を移植細胞として選択した理由は、上述した申請者らの以前の知見 (梗塞巣における最も一般的な細胞であり温存されることで梗塞壁の壁厚維持に寄与する) に加え、筋線維芽細胞は α 平滑筋アクチン線維を発現しており収縮能を有し創傷治癒過程において創を短縮させる作用がある。実際我々の観察では梗塞巣の筋線維芽細胞は左室の冠状方向に走行しており収縮により梗塞巣を短縮させると考えられる。これはすなわち左室内腔の縮小作用も期待できることを意味している。したがって同細胞を用いることは、左室壁ストレスを緩和する目的に対し、梗塞巣の壁厚を維持しかつ梗塞長を短縮させるという一石二鳥の効果が期待できる。

(1-2) **細胞の分子標的化**: マウスの CCR2 (MCP-1 の受容体) ならびに Integrin β 1 (fibronectin への接着因子) の遺伝子をクローニングし、レンチウィルスを用いて導入する。発現は FACS、Western blot、免疫染色で確かめる。

2) 心不全モデルにおける分子標的化細胞投与の治療効果

(2-1) **モデル動物**: C57BL6 マウス (10-12 週令オス) の左冠動脈結紮により左室自由壁の大部分が梗塞巣となり 4 週間後には生存率約 6 割、生存マウスも著しい左室機能低下を呈する。この完成した心不全モデルに対し上記分子標的化細胞の投与を開始し、さらに 4 週間後に評価する。マウスにおける大型心筋梗塞による心不全モデル作成技術は当研究室ですでに確立しており多くの文献がある。

(2-2) **移植細胞**: マウスから採取しホーミング

関連分子標的化した細胞を、投与量を 5×10^6 個/マウス以下で、少なくとも3段階の細胞濃度に調節し、モデルマウスに尾静脈から経静脈的に投与する。

(2-3) **生存率と心機能評価**：心機能評価は心エコーならびに心臓カテーテル法で行う。

(2-4) **病理所見**：光学顕微鏡、蛍光顕微鏡および、細胞分化の詳細を確認するために電子顕微鏡レベルでも検討する。加えて、全身臓器の病理検索を行い副作用の有無・程度を調べる。

(2-5) **移植された細胞の追跡**：心筋組織内の移植細胞分布ならびに分化を GFP と細胞特異抗体による2重免疫染色で評価する。

(2-6) **分子シグナルの検討**：治療の有効性が確認されればその分子機序解明のため、タンパク発現、シグナル伝達をウェスタンブロッティング、免疫染色、ELISA 等で検討する。

4. 研究成果

1) 分子標的化筋線維芽細胞の調整

GFP-Tg マウス(C57BL6 バックグラウンド)の皮膚から筋線維芽細胞を採取・培養し、TGF- β 1 で刺激し筋線維芽細胞に分化させた。次にマウスの CCR2 (MCP-1 の受容体) ならびに Integrin β 1 (fibronectin への接着因子) の遺伝子をクローニングし、レンチウィルスを用いて、上記筋線維芽細胞に導入し、タンパク発現を FACS、Western blot、免疫染色で確認した。

2) 心不全モデルにおける分子標的化細胞投与の治療効果

C57BL6 マウス (10-12 週令オス) の左冠動脈結紮により左室自由壁の大部分が梗塞巣となり4週後には生存率約6割、生存マウスも著しい左室機能低下を呈する。この完成した心不全モデルに対し上記分子標的化細胞 5×10^6 個/マウスを尾静脈より経静脈的に投与を行い、さらに4週後に生存率、心エコーおよび心臓カテーテル検査による心機能評価、病理所見、移植された細胞(GFP 陽性)の追跡、分子シグナルを評価する。われわれのグループの他の類似研究において遺

伝子導入する分子としては、CCR2 より Integrin β 1 の方が望ましい結果を見出したため、Integrin β 1 に絞って in vivo 実験を進めている。実験進捗は予定より遅れまだ終了を見ていない。その原因として研究代表者の異動があったことと、実験中、特に細胞移植中ないし直後の動物の死亡率が高いことがあげられる。後者はおそらく経静脈的に移植された細胞が塊を形成し肺塞栓を起こした可能性が高い。今後移植細胞の濃度を下げる、あるいは移植細胞を効率よく分散させるなどの工夫を加え実験を継続してゆく。

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](計0件)

[図書](計0件)

発表された業績は未だ無いが、われわれの研究グループからの類似の研究では、Integrin β 1 の遺伝子導入をした内皮前駆細胞を虚血下肢モデル・マウスに経静脈投与すると有意な血流改善ならびに移植された細胞の病変部への生着が観察されている。参考までに論文の抄録(投稿中)を下記に提示する。

Intravenous administration of endothelial colony-forming cells overexpressing integrin β 1 augments angiogenesis in ischemic legs

Goto K, Takemura G, Takahashi T, Okada H, Kanamori H, Kawamura I, Watanabe T, Morishita K, Tsujimoto A, Ushikoshi H, Kawasaki M, Mikami A, Kosai K-I, Minatoguchi S.

Introduction: When injected directly into ischemic tissue in patients with peripheral artery disease, the reparative capacity of endothelial progenitor cells (EPCs) appears to be limited by their poor survival. We therefore attempted to improve survival of transplanted EPCs through intravenous injection and gene modification. It is anticipated that overexpression of integrin $\beta 1$ will enable injected EPCs to home to ischemic tissue, which abundantly express extracellular matrix proteins, the ligands for integrins.

Methods: Human endothelial colony-forming cells (ECFCs; late-outgrowth EPCs) were transduced using a lentiviral vector encoding integrin $\beta 1$ (ITGB1) or enhanced green fluorescent protein (GFP). We then intravenously injected PBS or the genetically modified ECFCs (GFP-ECFCs or ITGB1-ECFCs; 1×10^5 cells each) into NOD/Shi-scid,IL-2R γ null mice whose right femoral arteries had been occluded 24 h earlier.

Results: Upregulation of extracellular matrix proteins, including fibronectin, was apparent in the ischemic legs. Four weeks later, blood perfusion of the ischemic limb was significantly augmented only in the ITGB1-ECFC group. Scanning electron microscopy of vascular casts revealed increases in perfused blood vessels in the ischemic legs of mice in the ITGB1-ECFC group as well as significant increases in the density of both capillaries and arterioles. Transplanted ECFC-derived vessels accounted for $28 \pm 4.2\%$ of the vessels in ITGB1-ECFC group, with no cell fusion.

Conclusions: Intravenous administration of ECFCs engineered to home to ischemic tissue appears to efficiently mediate therapeutic angiogenesis in a mouse model of peripheral artery disease.

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕
該当なし。

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

竹村 元三 (TAKEMURA, Genzou)
朝日大学・歯学部・教授
研究者番号：4 0 2 8 3 3 1 1

(2) 研究分担者

金森 寛充 (KANAMORI, Hiromitsu)
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：2 0 4 5 6 5 0 2

(3) 連携研究者

高橋 知之 (TAKAHASHI, Tomoyuki)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号：2 0 3 3 2 6 8 7