

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293180

研究課題名(和文) 心筋前駆細胞移植床による新生心筋の起源と分化・分裂・増殖因子の網羅的解析

研究課題名(英文) Analysis of the origin of newly formed cardiomyocytes and their growth and mitotic factor by cardiac progenitor cell scaffold transplantation model.

研究代表者

永井 敏雄 (Nagai, Toshio)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00334194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：内在性心筋幹前駆細胞を賦活化させて心筋へ分化誘導する方法は、心筋再生の新たな試みである。我々は、マウス心筋梗塞モデルの心膜腔内へ移植した心筋前駆細胞移植床による内在性の心筋再生促進機序について検討した。その結果、心筋前駆細胞移植床は、in vivoで心臓side population細胞のDNA傷害を軽減し、心筋前駆細胞移植床は血管新生、抗アポトーシス、白血球遊走阻止効果を有する分泌因子を放出し、心臓におけるaldehyde dehydrogenase 2の発現を保持することを明らかにした。また、心臓多色蛍光発現マウスモデルを確立し、心筋傷害後の心筋細胞分裂動態を定量的に評価した。

研究成果の概要(英文)：Activation and subsequent induction into cardiomyocytes differentiation of endogenous cardiac stem or progenitor cells is a new strategy for cardiac regeneration. We examined the mechanisms of endogenous cardiac regeneration after epicardial engraftment of cardiac progenitor cell (CPC) scaffold. Transplantation of CPC scaffold reduced the DNA damage of cardiac side population cells. CPC scaffold secreted the several factors that promote angiogenesis, inhibit apoptotic cell death, or reduce emigration of neutrophils. Transplantation of CPC scaffold preserved the expression of aldehyde dehydrogenase 2 in the injured heart. We established a multi colored mouse heart model for lineage tracing. By using this model we quantified the dynamics of cardiomyocyte division after myocardial injury.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心筋前駆細胞 DNA傷害 細胞移植床 心筋再生 パラクライン効果

1. 研究開始当初の背景

(1)重症心不全の生存率は3年で約30%とその予後は極めて不良であり、心疾患は日本人の死亡原因の第2位を占めている。心筋再生治療は、国内外を問わず新しい治療法として脚光を浴びており、骨髄細胞、間葉系幹細胞、胚性幹(ES)細胞や誘導型万能(iPS)細胞などが細胞移植治療の細胞ソースとして期待されている。しかし、近年の体性組織幹細胞による細胞移植治療の臨床試験では、心機能改善効果は報告間で一致を見ず、移植細胞の quality や移植プロトコルの改善が求められている(Nat Rev Cardiol 7: 204-215, 2010)。また、ES細胞やiPS細胞は、未分化細胞の残存や遺伝子導入を必要とする点など臨床応用のためには改善点が指摘されている。また、近年、誘導型心筋細胞(iCS)が報告されたが、direct reprogrammingのためには複数の遺伝子導入を必要とするため、臨床応用にはさらなる検討が必要である。

(2)申請者は、心筋細胞の分化機序を解明するために心筋に内在する幹/前駆細胞に着目し、Stem cell antigen-1 (Sca-1)陽性細胞および心臓 Side Population (SP)細胞を単離し、オキシトシンにより自律拍動する心筋細胞に分化させることに成功した(J Biol Chem 279: 11384-91 2004, J Cell Biol 176:329-41 2007, 研究種目:基盤研究(B)期間:平成17年度~平成18年度, 研究課題名:心筋幹細胞の単離同定と細胞株の確立による心筋細胞分化の分子機序の解析)。また、申請者は、移植細胞と自己組織化ナノペプチドの複合体をマウス心筋梗塞モデルの心筋傷害部位へ注入し、in vivo で重合させる細胞移植方法を開発し、この方法で心筋前駆細胞を移植すると、他臓器の組織幹細胞を移植した場合に比較して、優れた梗塞範囲縮小効果を示すことを報告した。また、この梗塞範囲縮小効果の機序として、移植された心筋前駆細胞が心筋組織への分化することと、心筋前駆細胞から特異的に多く分泌されるパラクライン因子を介した血管新生、抗アポトーシス作用、抗炎症作用が重要であることを明らかにした(J Clin Invest 119: 2204-2217 2009, J Mol Cell Cardiol 49:972-83 2010, 研究種目:基盤研究(B)期間:平成22年度~平成24年度, 研究課題名:心筋前駆細胞/ナノファイバーによる心筋再生機序の解明)。(3)次に、申請者は内在性心筋幹/前駆細胞による心筋再生の動態を検討する必要があると考え、Hsieh等の方法(Nat Med 13 970-974 2007)を改変し、-MHC MerCreMer/CAG-CAT-LacZ マウス(-MHCCreLacZ マウス)を用いた新生心筋の評価方法を確立した。このマウスは、タモキシフェンを投与することにより、-MHCプロモーターを介して心筋特異的にMerCreMer融合蛋白が発現するため、既存の心筋細胞を任意の時点で、-galactocidase

で標識できる。そこで、タモキシフェンを投与して既存の心筋細胞に -galactocidase を発現させてから心筋梗塞を作成し、Xgal 染色陰性の心筋細胞を新生心筋と定義して定量評価した。その結果、成体マウスでは心筋梗塞境界領域に新生心筋細胞が確認され、leukemia inhibitory factor (LIF)が心筋梗塞後の新生心筋の数を増加させた。また、核酸類似体による組織幹細胞標識方法により、新生心筋の一部は内在性心筋幹細胞由来と考えられた。以上の結果は、LIFによる内在性心筋幹/前駆細胞を介した心筋再生促進機序の解明に加えて、LIF以外の心筋再生促進因子の探索の必要性を示唆する。また、-MHCCreLacZ マウスを用いた本法では、既存の心筋細胞の分裂・増殖による心筋再生は評価できず、新たな genetic fate mapping 法が必要である。

2. 研究の目的

(1)LIFによる内在性心筋幹/前駆細胞を介した心筋再生促進機序の解明

(2)ペプチド修飾自己組織化ナノペプチドを用いた心筋前駆細胞移植床による心筋再生効果における内在性心筋幹/前駆細胞の活化の機序の解明(-MHCCreLacZ マウスを用いた検討)

(3)ペプチド修飾自己組織化ナノペプチドを用いた心筋前駆細胞移植床による心筋再生効果における心筋細胞分裂誘導効果の機序の解明(rainbow マウスを用いた検討)

3. 研究の方法

(1)遺伝子改変マウス

ミオシン重鎖プロモータータモキシフェン誘導 Cre リコンビナーゼ発現マウスとCAG-CAT-LacZ マウスを交配して-MHCCreLacZ マウスを作成した。戻し交配によりマウスの遺伝子背景はC57/BL/6Jとした。rainbow:RosaCre ERT2 マウスにタモキシフェンを投与し、個々の心筋細胞に4種類の蛍光色のいずれかを発現させた。

(2)細胞移植モデル

10-12週令のC57/BL/6J マウスに50mg/kgのsodium pentobarbitalを腹腔内注射して人工呼吸器下に左前下行枝を結紮し急性心筋梗塞モデルを作成した。自己組織化ナノペプチド内で心筋前駆細胞を約4週間3次元培養して作成した心筋前駆細胞移植床をマウス心外膜腔に移植した。

(3)心臓SP細胞単離と免疫染色

マウス心臓SP細胞は既報の方法で単離した(Methods Mol Biol. 1036;63-74: 2013)SP細胞の免疫染色は、CytoSpin Cytocentrifuge (Thermo Scientific)を用いてスライドグラスに接着後、4%パラフォルムアルデヒド内

で 10 分間固定し、2%ロバ血清、2%牛血清アルブミン、0.2%Nonidet P-40 (nacalaitesque) を含む PBS 内で 30 分間ブロッキング処理後に行った。

(4) 細胞移植床のパラクリン因子解析
ゼラチン培養皿上で培養した心筋前駆細胞、および心筋線維芽細胞、自己組織化ナノペプチドハイドロゲル内で培養した心筋前駆細胞、および心筋線維芽細胞を、それぞれ 48 時間無血清培地で培養した後に培養上清を回収して Quantikine mouse ELISA kit により分泌蛋白を定量解析した。分泌蛋白量は培養上清回収時の細胞数により補正した。

(5) 蛋白発現解析
心筋梗塞を作成した -MHCCreLacZ マウスに心筋前駆細胞移植床を移植した移植群および非移植群の心筋組織をレーザーマイクロダイセクションにより採取し、ショットガン法にて蛋白の発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) LIF の心臓 side population (SP) 細胞に対する保護効果の検討
LIF 遺伝子導入 (LIF) 群と非導入 (Ct) 群の心筋梗塞後の心臓 side population (SP) 細胞について解析した。心筋梗塞後に単離した心臓 SP 細胞では、-H2AX、リン酸化 ATM、53BP1 陽性の DNA 損傷および修復部位が健常マウスから単離した心臓 SP 細胞に比較して増加していた。RAD51 については差が無かった。このことは、心臓幹 / 前駆細胞では non-homologous end joining が DNA 修復機序に主に寄与していることを示唆する。また、心筋梗塞後の LIF 群の心臓 SP 細胞では、Ct 群の SP 細胞に比較して -H2AX、リン酸化 ATM 陽性部位が少なかった。

(2) in vitro における心筋前駆細胞に対する LIF の DNA 傷害修復と細胞増殖への効果の検討

これまでの、我々の in vivo での検討では、LIF は内在性心筋幹 / 前駆細胞を細胞周期に導入し、非対称性分裂を促すことにより心筋細胞再生を促進していることが示唆された。培養心筋前駆細胞株に対して H₂O₂ を添加 1 時間後には -H2AX およびリン酸化 ATM 陽性心筋前駆細胞は増加するが、LIF 添加による DNA 傷害抑制効果は認めなかった。また、H₂O₂ 除去後の -H2AX およびリン酸化 ATM 陽性細胞の減少 (DNA 障害の修復) に関しても LIF 添加による減少促進効果は明らかではなかった。また、1%胎仔牛血清濃度下で細胞周期を停止した心筋前駆細胞に対して、1%および 10%血清刺激下での LIF 添加による BrdU 取り込み比率を比較したが、有意な差は認めなかった。In vivo と in vitro における LIF の心臓前駆細胞に対する効果の違いの機序は不明であるが、LIF の作用は心臓前駆細胞に対

する直接作用ではなく、他の細胞を介する間接的な作用である可能性がある。

(3) 心筋前駆細胞移植床の移植効果の機序の検討

①パラクリン因子：自己組織化ナノペプチドハイドロゲル心筋前駆細胞移植床は、平面で培養された心筋前駆細胞とほぼ同レベルの、また、同様の自己組織化ナノペプチドハイドロゲル内で培養した心筋線維芽細胞より多くの vascular endothelial growth factor (VEGF)、junctional adhesion molecule-A (JAM-A)、soluble vascular cell adhesion molecule (sVCAM-1) を分泌していた。従って、3次元培養環境に適応した CPC からの持続的なパラクリン効果が、本移植モデルの血管新生、細胞死抑制、梗塞部位への白血球遊走抑制効果において重要であることが示唆された。

②心筋前駆細胞移植床移植 4 週間後の心臓切片から採取した心筋組織を用いたショットガン分析により、移植群で検出された蛋白として、aldehyde dehydrogenase 2 を同定した。Western blotting 法により、ALDH2 は非移植群に比較して心筋前駆細胞移植床移植群で梗塞部に高発現していた。

③ -MHCCreLacZ マウスを用いて、心筋前駆細胞移植床により、既存の心筋細胞に対する新生心筋細胞の比率が有意に増加し、BrdU 陽性新生心筋細胞が増加する傾向にあることを定量的に確認した。次に、心筋前駆細胞移植床を移植 2 週間後に、心臓幹細胞を単離し、DNA 傷害のマーカーである H2AX foci 数を定量したところ、非移植群に比較して移植群で DNA 傷害が減少していた。

したがって、心臓腔内に移植された心筋前駆細胞移植床の急性心筋梗塞モデルマウスに対する効果のメカニズムについて、パラクリン効果と心筋再生促進効果の両者が示唆された。aldehyde dehydrogenase 2 は、活性型アルデヒド解毒作用による心筋保护作用 (J Am Coll Cardiol 54; 2187-2196: 2009)、活性型アルデヒドによる DNA 傷害の軽減作用 (Physiol Rev 94; 1-34: 2014) が報告されており、心臓を含む、ヒト臍帯血、造血組織、骨格筋、乳腺組織などの種々の組織幹細胞において aldehyde dehydrogenase 2 を含む様々なアイソザイムが高発現している。今後の検討を要する。

(4) タモキシフェン誘導型多色標識 (rainbow) マウスを用いた同一色の心筋細胞コロニー数と BrdU 陽性心筋細胞数を解析した結果、両者ともに正常マウスに比較して心筋梗塞モデルマウスで増加しており、既存の心筋細胞の分裂増殖能の定量解析が可能であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Kanda M, Nagai T, Takahashi T, Liu ML, Kondou N, Naito AT, Akazawa H, Sashida G, Iwama A, Komuro I, Kobayashi Y. Leukemia Inhibitory Factor Enhances Endogenous Cardiomyocyte Regeneration after Myocardial Infarction. PLoS One 査読有、11巻、2016、2703-2712.

DOI:10.1371/journal.pone.0156562

Takahashi T1, Nagai T, Kanda M, Liu ML, Kondo N, Naito AT, Ogura T, Nakaya H, Lee JK, Komuro I, Kobayashi Y. Regeneration of cardiac conduction system by adipose tissue derived-stem cells. Circ J 査読有、79巻、2015、2703-2712.

DOI:10.1253/circj.CJ-15-0400

Sumida T, Naito AT, Nomura S, Nakagawa A, Higo T, Hashimoto A, Okada K, Sakai T, Ito M, Yamaguchi T, Oka T, Akazawa H, Lee JK, Minamino T, Offermanns S, Noda T, Botto M, Kobayashi Y, Morita H, Manabe I, Nagai T, Shiojima I, Komuro I. Complement C1q-induced activation of β -catenin signalling causes hypertensive arterial remodelling. Nat Commun 査読有、6巻、2015、6241

DOI: 10.1038/ncomms7241

Sun A, Zou Y, Wang P, Xu D, Gong H, Wang S, Qin Y, Zhang P, Chen Y, Harada M, Isse T, Kawamoto T, Fan H, Yang P, Akazawa H, Nagai T, Takano H, Ping P, Komuro I, Ge J. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 plays protective roles in heart failure after myocardial infarction via suppression of the cytosolic JNK/p53 pathway in mice. J Am Heart Assoc 査読有、3巻、2014、e000779

DOI:10.1161/JAHA.113.000779

Liu ML, Nagai T, Tokunaga M, Iwanaga K, Matsuura K, Takahashi T, Kanda M, Kondo N, Naito AT, Komuro I, Kobayashi Y. Anti-inflammatory peptides from cardiac progenitors ameliorate dysfunction after myocardial infarction. J Am Heart Assoc 査読有、3巻、2014、e001101

DOI: 10.1161/JAHA.114.001101

Nagai T, Matsuura K, Komuro I. Cardiac side population cells and Sca-1-positive cells. Methods Mol Biol. 査読無、1036巻、2013、63-74

DOI: 10.1007/978-1-62703-511-8_5

Ozasa Y, Akazawa H, Qin Y, Tateno K, Ito K, Kudo-Sakamoto Y, Yano M, Yabumoto C, Naito AT, Oka T, Lee JK, Minamino T, Nagai T, Kobayashi Y, Komuro I. Notch activation mediates angiotensin II-induced vascular remodeling by promoting the proliferation and

migration of vascular smooth muscle cells. Hypertens Res. 査読有、36巻、2013、859-865. DOI: 10.1038/hr.2013.52

〔学会発表〕(計3件)

Kanda M, Novel Multicolor Lineage Tracing Model Can Detect Cardiomyocyte-Derived Cardiac Regeneration after Injury 第80回日本循環器学会総会・学術集会 2016年3月17日-19日 仙台国際センター, 宮城県, 仙台市

Kanda M, Leukemia Inhibitory Factor Enhances Cardiomyocyte Regeneration after Myocardial Infarction from Endogenous stem Cells and not from Circulating Bone Marrow-derived Cells. European Society of Cardiology Congress 2015 2015年9月3日 London, UK

Kanda M, A Novel Multicolor Lineage Tracing Model Can Detect Cardiomyocyte-Derived Cardiac Regeneration After Myocardial Infarction. American Heart Association Scientific Sessions 2015, 2015年11月7-11, Orlando, Florida, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 敏雄 (NAGAI, Toshio)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 00334194