

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860595

研究課題名(和文)磁性ナノ微粒子を用いた細胞シート移植による虚血性心疾患に対する治療効果の検討

研究課題名(英文) Multilayered cell sheets created by a novel magnetite tissue engineering method for myocardial infarction

研究代表者

石井 正和 (Ishii, Masakazu)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：00456683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：磁力とECMを組み合わせた新規細胞シート作成法を用いて脂肪由来幹細胞(ADRC)シートを作成し、マウス心筋梗塞モデルへ移植を行った結果、コントロール群に比べ梗塞サイズの縮小、線維化を抑制した。ADRCシート移植群においては有意な心機能改善効果が認められた。また、虚血心筋内においてVEGF、bFGF遺伝子発現の増加が認められた。以上の結果から、ADRCシート移植は虚血心筋内への血管新生を誘導することにより、心筋リモデリングを抑制することが示唆された。本研究により、ADRCシート移植は虚血性心疾患に対する新規の治療法となり得ることが示された。

研究成果の概要(英文)：Most common method of stem/progenitor cell transplantation is direct myocardium injections of cell suspensions using a syringe and needle. However, some reports showed that this needle injection method has several disadvantages, including cell loss caused by leakage of injected cells. To overcome these problems, several tissue engineering (TE) technologies are emerging for regenerative medicine.

ADRC sheets were successfully engrafted into ischemic heart. Transplantation of ADRC sheets, created by the Mag-TE system and the ECM, improved infarct wall thinning and significantly inhibited fibrosis than control group. ADRC sheets transplantation significantly improved cardiac function, and increased VEGF and bFGF mRNA expression in ischemic hearts. Implantation of ADRC sheets protects the heart against pathological cardiac remodeling through its ability to promote angiogenesis. ADRC sheets may become a novel regenerative medicine strategy for ischemic heart disease in future.

研究分野：医学

キーワード：再生医療 脂肪由来幹細胞 細胞シート 心筋梗塞 血管新生

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の蔓延と高齢化社会の到来により、虚血性心疾患・閉塞性動脈硬化症などの患者数は顕著に増加している。通常はバイパス手術やカテーテルによる血管内治療を行うが、このような治療が不可能な重症例も増加している。このような症例に対して、虚血部周辺の組織から血管再生や側副血行路の発達を促し、虚血領域とその周辺組織の血流を改善し、組織障害や壊死を軽減させる新しい治療法に「血管新生療法」がある。

心血管領域においては、幹細胞移植による血管新生療法は、その有効性が多数報告されているが、従来行われている細胞浮遊液を局所に注入する方法では移植場所の制御が困難であることや、24時間以内に大多数の細胞が流出・壊死してしまい、移植7日後には3~5%程度しか生着しておらず、その効果が十分に発揮できないという欠点があり、移植法の改善が求められている。そこで、効果的な血管新生療法を行うためには、新規の移植法の開発が重要である。

2. 研究の目的

我々はマグネタイト(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)をリポソームで包埋した磁性ナノ微粒子 (Magnetic Cationic Liposome: MCL)を作成し、磁場と磁性ナノ粒子を用いた新規の3次元細胞シート作成技術 (Mag-TE 法) を確立し、これまでに Mag-TE 法を用いて間葉系幹細胞 (MSC) シートを作成し、マウス重症下肢虚血モデルへの MSC シート移植が、従来法である局所への細胞浮遊液注入法に比べ有意に血流回復、血管新生効果を有することを報告してきた。

また、我々は細胞シート強度の増加と移植時の操作性の向上を目的とし、Mag-TE 法を改良し磁力と細胞外マトリックス (ECM) を組み合わせた新規の細胞シート作成法を開発にも成功した。

これまで虚血性心疾患に対する細胞移植方法としては、細胞浮遊液を局所へ直接注入する方法で行われていたが、この方法では移植場所の制御が困難であり、細胞の流出により十分な効果が得られないことがある。そこで、本研究では磁力と ECM を組み合わせた新規細胞シート作成法を用いて脂肪由来幹細胞 (ADRC) シートを作成し、マウス心筋梗塞モデルの梗塞部位へ移植を行い、心筋梗塞に対する治療効果を示すかについて検討を行うことを目的とした。

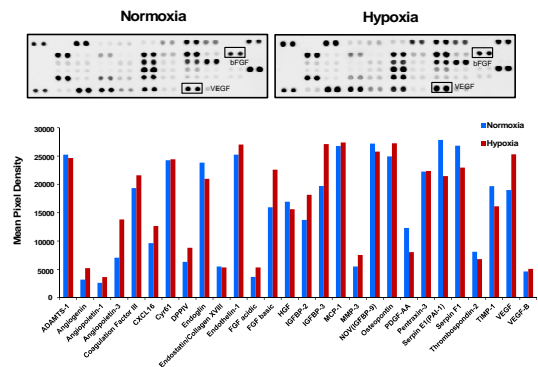
3. 研究の方法

(1) 脂肪由来幹細胞 (ADRC) から分泌される血管新生因子の特定: ADRC に磁性ナノ微粒子 (MCL) を取り込ませた際の血管新生因子発現変化について、Angiogenic Protein Array を用いて網羅的に検討する。また ADRC を通常酸素および、低酸素状態で培養を行った際の血管新生因子の発現パターン変化について Protein Array を用いて検討を行う。

(2) マウス心筋梗塞モデルに対する ADRC シート移植による治療効果の検討: WT (C57BL6/J) マウスに左前下行枝結紮によって急性心筋梗塞モデルを作成する。梗塞作成直後に、ADRC シートを梗塞部位に移植を行う。ADRC シートを移植後に、心エコーによる経時的 (1,2,4 週間後) な心機能評価を行い、シート群とコントロール群との心機能改善効果の比較を行う。H&E 染色、マッソントリクローム染色による梗塞サイズ、線維化領域の評価。梗塞領域における血管密度を CD31 抗体によって免疫組織染色を行い検討する。また、梗塞部位のアポトーシス細胞の割合を TUNEL 染色によって評価を行う。ADRC シート移植後の心筋組織を採取し、血管新生因子 (VEGF, bFGF) 発現をリアルタイム PCR によって定量を行う。また、移植した ADRC シートが直接的に血管、心筋へ分化しているかについて、CD31 および Troponin T で免疫染色によって評価を行う。

4. 研究成果

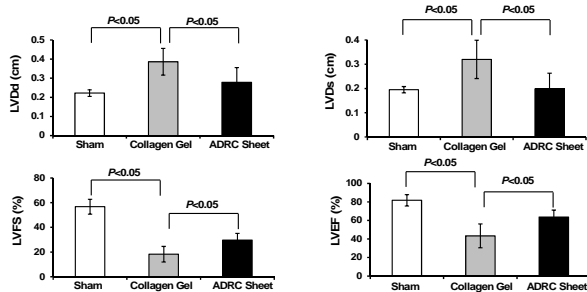
(1) 脂肪由来幹細胞 (ADRC) シートから分泌される血管新生因子の特定: ADRC から分泌される血管新生因子を Angiogenic Protein Array を用いて評価を行った結果、多数の血管新生因子が発現していることが確認された。MCL の添加の有無によって、発現パターンの有意な変化は認められなかった。一方で、低酸素培養 (5% O<sub>2</sub>) を行うことによって、bFGF, VEGF, angiopoietin-1, angiopoietin-3 等の血管新生因子の発現上昇が認められた (図 1)。



(図 1) Angiogenic Protein Array による血管新生因子発現解析

(2) マウス心筋梗塞モデルに対する ADRC シート移植による治療効果の検討: マウス急性心筋梗塞モデルを作成し、ADRC シートおよび、コントロール群としてコラーゲンゲルシートを梗塞部位へ移植を行った。ADRC シートは移植2週間後においてもホスト心筋上に生着が確認された。

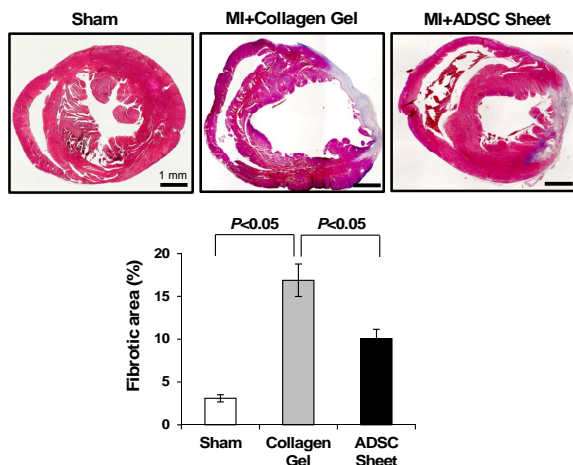
次に心エコーによる心機能評価を行った結果、ADRC シート移植群はコントロール群に比べ有意な心機能改善効果が認められた (図 2)。



(図2) ADRC シート移植 4 週間後における心機能評価

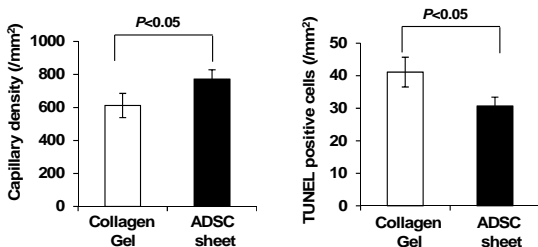
手術後 4 週間における生存率について、 Kaplan-Meier 生存曲線を作成し、評価を行った結果、コントロール群で 52%であった生存率が、ADRC シート移植群においては 68% に改善が認められた。

次に、ADRC シート移植 4 週間後の心臓を採取し、組織学的評価を行った。マッソントリクローム染色を行い、線維化領域の定量を行った結果、ADRC シート移植群はコントロール群に比べ、有意に線維化が抑制されていることが明らかとなった(図3)



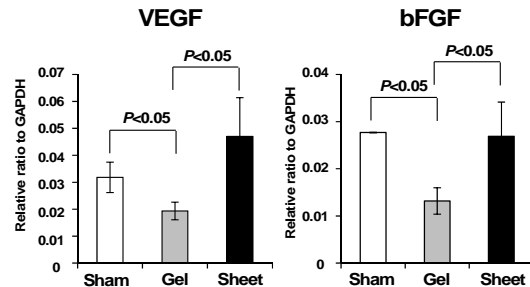
(図3) ADRC シート移植による線維化抑制効果

虚血心筋内における毛細血管密度とアポトーシス細胞の割合を評価するために、それぞれ、CD31 抗体での免疫染色、および TUNEL 染色を行った。ADRC シート移植群においては、コントロール群に比べ有意に毛細血管密度が増加していることが確認された。一方で、アポトーシス細胞はコントロール群に比べ有意に減少することが確認された(図4)



(図4) ADRC シート移植による虚血心筋内の毛細血管密度の増加、アポトーシス抑制効果

次に、虚血心筋内の毛細血管密度の増加とアポトーシス抑制効果の機序を検討するために、虚血心筋内における血管新生因子発現の評価を行った。リアルタイム PCR によって、VEGF および、bFGF 遺伝子発現を評価した結果、ADRC シート移植群において、両血管新生因子の発現が増加していることが明らかとなった(図5)



(図5) 虚血心筋内における血管新生因子発現比較

ADRC は多分化能を有し、これまでに血管や心筋細胞への分化の報告もある。そこで、移植を行った ADRC がホスト心筋内において、血管および心筋への直接的な分化が起こっているかについて評価を行った。MCL を含有する移植細胞は、血管内皮細胞への分化は確認されなかったが、一部の移植細胞がペリサイト周囲に取り込まれている所見が確認された。一方、Troponin T での免疫染色の結果から、移植された ADRC は心筋細胞への分化は確認されなかった。以上のことから、移植された ADRC は直接的な血管内皮細胞への分化は起こらないが、壁細胞として血管構造の支持を行っている可能性が示唆される。

以上の結果から、ADSC シート移植は虚血心筋内への血管新生を誘導することにより、心筋リモデリングを抑制することが示唆された。本研究により、ADSC シート移植は虚血性心疾患に対する新規の治療法となり得ることが示された。

## 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 8 件)

Niwa M, Numaguchi Y, Ishii M, Kuwahata T, Kondo M, Shibata R, Miyata K, Oike Y, Murohara T. IRAP Deficiency Attenuates Diet-induced Obesity in Mice Through Increased Energy Expenditure. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;457(1):12-18. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.071.

Ishii M, Shibata R, Kondo K, Kambara T, Shimizu Y, Tanigawa T, Bando-Kureishi, Y, Nishimura M, Ouchi N, Murohara T. Vildagliptin stimulates endothelial

cell network formation and ischemia-induced revascularization via an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2014; 289(39):27235-27245. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M114.557835.

Hao CN, Shintani S, Shimizu Y, Kondo K, Ishii M, Wu H, Murohara T. Therapeutic Angiogenesis by Autologous Adipose-Derived Regenerative Cells: Comparison With Bone Marrow Mononuclear Cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014; 307(6):H869-879. 査読有 doi: 10.1152/ajpheart.00310.2014

Ishii M, Shibata R, Shimizu Y, Yamamoto T, Kondo K, Inoue Y, Ouchi N, Tanigawa T, Kanemura N, Ito A, Honda H, Murohara T. Multilayered adipose-derived regenerative cell sheets created by a novel magnetic tissue engineering method for myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2014; 175: 545-553. 査読有 doi: 10.1016/j.ijcard.2014.06.034.

Tanigawa T, Shibata R, Ouchi N, Kondo K, Ishii M, Katahira N, Kambara T, Inoue Y, Takahashi R, Ikeda N, Kihara S, Ueda H, Murohara T. Adiponectin deficiency exacerbates age-related hearing impairment. *Cell Death Dis*. 2014; 5: e1189. 査読有 doi: 10.1038/cddis.2014.140.

Shimizu Y, Shibata R, Ishii M, Ohashi K, Kambara T, Uemura Y, Yuasa D, Kataoka Y, Kihara S, Murohara T, Ouchi N. Adiponectin-mediated modulation of lymphatic vessel formation and lymphedema. *J Am Heart Assoc*. 2013; 2: e000438. 査読有 doi: 10.1161/JAHA.113.000438.

Yamamoto T, Shibata R, Ishii M, Kanemura N, Kito T, Suzuki H, Miyake H, Maeda K, Tanigawa T, Ouchi N, Murohara T. Therapeutic Reendothelialization by Induced Pluripotent Stem Cells After Vascular Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33: 2218-2221. 査読有 doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301313.

Kito T, Shibata R, Ishii M, Suzuki H, Himeno T, Kataoka Y, Yamamura Y,

Yamamoto T, Nishio N, Ito S, Numaguchi Y, Tanigawa T, Yamashita JK, Ouchi N, Honda H, Isobe K, Murohara T. iPS cell sheets created by a novel magnetite tissue engineering method for reparative angiogenesis. *Sci Rep*. 2013; 3: 1418. 査読有 doi: 10.1038/srep01418.

#### [学会発表](計 4 件)

Hao C, Shintani S, Shimizu Y, Wu H X, Kondo K, Ishii M, Murohara T: Comparative Study of Adipose Derived Regenerative Cells versus Bone Marrow-Mononuclear Cells for Therapeutic Angiogenesis, American Heart Association 81<sup>th</sup> Annual scientific session, 2013. Dallas (USA)

Ishii M, Shibata R, Yamamoto T, Kanemura N, Numaguchi Y, Kito T, Suzuki H, Shimizu Y, Honda H, Murohara T: Adipose-derived stem cell sheets created by a novel magnetite tissue engineering method for myocardial infarction. American Heart Association 80<sup>th</sup> Annual scientific session, 2012. Los Angeles (USA)

Yamamoto T, Shibata R, Ishii M, Kito T, Suzuki H, Kanemura N, Miyake H, Maeda K, Murohara T: Intravenous Transfusion of iPS Cell-derived Vascular Progenitor Flk-1+ Cells Reduces Neointimal Formation After Vascular Injury, American Heart Association 80<sup>th</sup> Annual scientific session, 2012. Los Angeles (USA)

Shimizu Y, Shintani S, Shibata R, Ishii M, Hao C, Hayashida R, Murohara T: Adipose-Derived Regenerative Cells Implantation Alleviates Lymphedema via Augmentation of VEGF-C Mediated M2 Macrophage Mobilization, American Heart Association 80<sup>th</sup> Annual scientific session, 2012. Los Angeles (USA)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

石井 正和 (ISHII, Masakazu)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00456683