

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26671017

研究課題名(和文) 心筋梗塞モデルマウスへの幹細胞移植後の生着に対する加齢と運動の影響

研究課題名(英文) Influence of aging and exercise on engraftment after stem cell transplantation into myocardial infarction model mice

研究代表者

千葉 由美 (CHIBA, Yumi)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：10313256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：高齢者の心疾患は死因の最上位にあり、重症化することで治療の選択肢が限られる。この解決のための一手段が幹細胞移植による心筋再生による治療法の確立であるといえる。そこで本研究では、この課題に取り組むための疾患モデル動物を作製し、評価することで、ヒトの心疾患病態での幹細胞移植の安全性・有効性の適切性につなげていくことを目指している。これまで、若齢、老齢マウスに心筋梗塞を作製し、超音波評価などによる評価系をほぼ確立した。一方で、心筋梗塞部位への幹細胞移植のソースとしての幹細胞の樹立・培養に関しては単離、培養ともに順調に開始し、問題なく進めている。今後は疾患モデルへの移植を進めていく。

研究成果の概要(英文)：Heart diseases in the elderly are at the top of the cause of death, and treatment options are limited by severity. One means to solve this problem can be said to establish a treatment method by myocardial regeneration by stem cell transplantation. In this study, the aim is to lead appropriateness of the safety and effectiveness of stem cell transplantation in human heart disease pathology by making and evaluating disease model animals to solve this task. Until now, myocardial infarction occurred in young and old mice, and almost completed the evaluation system of heart functions based on ultrasonic evaluation and so on. On the other hand, with regard to the establishment and culture of stem cells as a source of stem cell transplantation to the site of myocardial infarction, both isolation and culture started smoothly, and they are progressing without problems. In the future we will continue to transplant to a disease model.

研究分野：看護学

キーワード：心筋梗塞 幹細胞 再生 モデルマウス 細胞培養

1. 研究開始当初の背景

幹細胞を用いた心臓再生医療は、医学領域における最先端の臨床研究課題として注目されており、日本においても幹細胞を用いた再生医療の実用化を目指した「再生医療推進法」が平成 25 年 4 月 26 日に参院本会議で可決、成立した。なお、日本における死因の第二位は心疾患であり、その約 8 割は虚血性心疾患である(厚生労働省,2006,2011)。心臓の幹細胞再生治療は、心筋梗塞による壊死部位周辺に幹細胞を入れ、機能再生したり、細胞再生を促したりして、心機能を回復させる方法である。これまでに生命に危険をもたらす重症心不全の原因の一つである虚血性疾患によって心機能の著しい低下が見られる症例に対し、心臓幹細胞移植医療による心機能の改善が報告されている(R Bolli, et al., 2011; AR Chugh, et al.,2012; P Donorf, et al.,2012; DM Clifford, et al., 2012)。心臓幹細胞移植医療には、心臓幹細胞(CSC: Cardiac Stem Cell)、骨髄幹細胞(BSC: Bone Marrow Stem Cell)、間葉系幹細胞(MSC: Mesenchymal Stem Cell)などが用いられ、また今後期待される細胞ソースとして人工多能性幹細胞(iPS細胞: induced Pluripotent Stem Cell)や胚性幹細胞(ES細胞: Embryonic Stem Cell)由来の細胞などがある。何れにしても、移植した細胞が組織に効果的に生着させる幹細胞の特定と組み合わせが課題とされている(IH Schulman, 2012; KG Oldroyd, et al.,2012)。

幹細胞移植医療は、日本でもすでに冠動脈バイパス術と併用実施されているが、加齢に伴う生着率の違い、幹細胞移植治療後の運動負荷による影響に関する評価は皆無である。臨床での人対象研究ではバイアスが多く、その解釈と評価が難しい。動物モデルを用いた実験研究によって加齢と術後の運動強度の影響に関する基礎データ収集とその解析、評価が急務であると考えられる。

2. 研究の目的

高齢者において心疾患は死因の最上位にあるが、急性期から慢性期に移行し重症化することで治療の選択肢が限られてしまうことが一因である。この解決のための一手段が幹細胞移植による心筋再生治療法の確立であるといえる。そこで本研究では、課題に取り組む研究のための疾患モデルを作製し、評価することで、ヒトの心疾患病態での幹細胞移植の安全性・有効性の適切性につなげていくことを目指した。

まず比較対象となるデータを習得するため、若齢、加齢マウスに心筋梗塞を作製し、手術負荷を最小限とし再現性のよい手技を試みるとともに、心筋梗塞部位への幹細胞移植を行うための幹細胞の単離、培養を行う。また、基礎データを得たら、幹細胞を移植し、若年、加齢マウスにおける生着、及び運動による比較検討を行う。

3. 研究の方法

対象の疾患モデルは、8、26 及び 52 週齢のマウスに心筋梗塞(MI: Myocardial Infarction)を作製したものを、無介入群(Sham 群)、生理食塩水群(control 群)、幹細胞注入群(治療群)に幹細胞を同量注入し、比較検討する。また、術後 2、4 週間後からトレッドミルにて軽度運動負荷した場合の心機能を比較検討する。

(1) 事前に培養・凍結保存した幹細胞の解凍・培養を実験時期に合わせて準備する(注入に際し、 10^6 個の細胞量×マウスの匹数分)。用いる細胞については Western 分析、免疫染色後の組織学的評価、ELISA によって評価する。

(2) 実験前にマウスの体重、血圧、脈拍、麻酔下での超音波による心機能評価(6 項目: Ejection Fraction: 左室駆出分画, Fractional Shortening: 左室内径短縮率%, Stroke Volume: 1 回拍出量, End-Diastolic Volume: 心室拡張終期容積, End-Systolic Volume: 心室収縮終期容積, Anterior wall thickness: 前壁厚度)核磁気共鳴検査を行う。

(3) 全身麻酔下で MI マウスを作製する(O Tarnavski, et al., Physiol Genomics, 2003 に基づく)。但し、気化器は SN-487、人工呼吸器は SN-480 (シナノ製作所)を用いる。

(4) 施行 1 週間ごとに体重、血圧、脈拍、超音波評価(6 項目)核磁気共鳴検査を行う。

(5) 施行 8 週間後、体重、血圧、脈拍、超音波、核磁気共鳴検査後にと殺し、心臓の重さ、ホルマリン・アルコール固定、パラフィン包埋後、標本スライスを作成し、細胞核は DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) で、幹細胞は EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)、血管新生は Ang-1 (Angiopoietin)、筋原線維は -SA (-Sarcometric Actin)、平滑筋細胞は -SMA (-Smooth Muscle Actin)、血管内皮細胞を vWF (Von Willebrand Factor)、増殖因子(FGF: Fibroblast Growth Factor, VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor)、細胞増殖 BrdU (Bromodeoxyuridine) を免疫染色にて同定し、組織学的に評価する。結果から比較する細胞の特徴について、比較検討する。

(6) 運動介入プログラムは、軽度の運動負荷をプランニングし、運動負荷は心機能評価を行いながら、プログラム修正する。

4. 研究成果

MIによる老化・幹細胞移植効果を科学的に評価するための実験を行った。

(1) 使用細胞の準備

心筋再生の細胞源として有効な細胞の一つとされる Cortical bone stem cell (皮質骨由来幹細胞) を C57BL/6-Tg (CAG-EGFP

: Enhanced green fluorescent protein、8週齢)から単離、培養し、使用細胞が発現してきたので、いったん-80度下で凍結保存を行った。

(2) 心機能評価

実験前におけるマウスの体重、血圧、脈拍、麻酔下での超音波による心機能評価について、マウス実験の経験を有する循環器内科医の指導の下、評価法の確認・統一化を図った。

(3) 疾患モデルマウスの作製とその評価

心筋梗塞モデルマウス作製において、負荷を最小限として再現性のよい技術をほぼ確立できた。麻酔導入から心臓廓清までの一連の流れは、従来の方法を踏襲する形で行った。作製におけるポイントとして麻酔導入や挿管の円滑な実施、開胸創の侵襲を最小限にすること(血管を傷つけず出血を防止)、左前下行枝(LAD: Left Anterior Descending)の特定と結紮(冠動脈を傷つけず、筋層に針を貫通させ、1針で行い、出血をさせない)閉胸時、皮膚の結紮を統一方法で実施、リカバリまでの一連の流れをほぼ30分以内で行っている。MIマウスの施術後は、生存率90%以上の維持させることが必要とされるが、8週齢、48週齢マウス(週齢は変更)ともに生存率は同等に維持できている。具体的な確認は、組織形態学的評価にて、心臓に関するマウス実験の経験を有する循環器内科医師の検証を得ながら、手技の修正を図った。

MIマウス作製後の評価のプロセスにおいて、心機能評価等についても試行した。プレ実験終了後、心臓を廓清し、梗塞2ヶ月後まで形態的な心肥大が確認されるとともに、超音波検査による評価では、Sham群に比べ、MI群にてEF低下を確認することができた。MIマウスの基準値を得るために、8週齢、48週齢で実施例を比較すると、48週齢において体重の回復率が悪い傾向が見られた。

現在は、再検証実験における8、48週齢マウスの施術後1、2週目の心機能評価、廓清心の解析を進めている。

(4) 考察

切片から糖たんぱく質糖鎖のプロファイリングが得られることが示されたことから、この点においても解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

Zou X, Yoshida M, Nagai-Okatani C, Iwaki J, Matsuda A, Tan B, Hagiwara K, Sato T, Itakura Y, Noro E, Kaji H, Toyoda M, Zhang Y, Narimatsu H, Kuno A. A standardized method for lectin microarray-based tissue glycome mapping. *Sci Rep*,7:1-12,2017. 査読有

Tateno H, Saito S, Hiemori K, Kiyoi K, Hasehira K, Toyoda M, Onuma Y, Ito Y, Akutsu H, Hirabayashi J. 2-6 sialylation is a marker of the differentiation potential of human mesenchymal stem

cells. *Glycobiology*,26(12):1328-1337, 2016. 査読有

Tone H, Yoshioka S, Akiyama H, Nishimura A, Ichimura M, Nakatani M, Kiyono T, Toyoda M, Watanabe M, Umezawa A. Embryoid Body-Explant Outgrowth Cultivation from Induced Pluripotent Stem Cells in an Automated Closed Platform. *Biomed Res Int.*,2016:1-7,2016. 査読有

Itakura Y, Sasaki N, Kami D, Gojo S, Umezawa A, Toyoda M. N- and O-glycan cell surface protein modifications associated with cellular senescence and human aging. *Cell Biosci.*,6(14),2016. 査読有

Sasaki N, Itakura Y, Toyoda M. Ganglioside GM1 contributes to the state of insulin resistance in senescent human arterial endothelial cells. *J. Biol. Chem.*,290:25475-25486,2015. 査読有

Kawasaki T, Kirita Y, Kami D, Kitani T, Ozaki C, Itakura Y, Toyoda M, Gojo S. Novel detergent for whole organ tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A.*,103(10):3364-3373,2015. 査読有

Kami D, Kitani T, Kishida T, Mazda O, Toyoda M, Tomitaka A, Ota S, Ishii R, Takemura Y, Watanabe M, Umezawa A, Gojo S. Pleiotropic functions of magnetic nanoparticles for ex vivo gene transfer. *Nanomedicine*,10:1165-1174,2014. 査読有

Toyoda M, Umezawa A. Stem cells bond our organs/tissues and engineering products. *Circ. J.*,78:1582-1583,2014. 査読無

[学会発表](計3件)

千葉由美. 心疾患患者への幹細胞移植による効果指標の検討-国内文献レビューから看護の取り組みを考える-. 第12回日本移植・再生医療看護学会. 2016年11月12日. ウィンク愛知(愛知県名古屋市). Yumi Chiba, Ritsuko Yamada, Kumiko Ichimura. Comparison between cerebrovascular and heart disease regarding dysphagia related clinical conditions among hospitalized patients in general hospitals. 第36回日本看護科学学会学術集会 English Session (oral). 2016年12月10日. 東京国際フォーラム(東京都千代田区).

川村飛翔, 峯岸慎太郎, 木野旅人, 中島理恵, 陳琳, 土肥宏志, 杉山美智子, Rajesh Prajapati, 藤田孝之, 石川義弘, 千葉由美, 石上友章, 田村功一. 第20回日本心血管内分泌代謝学会学術集会. 2016年12月17日. 東京コンベンションホール(東京都中央区).

〔産業財産権〕

出願状況
特になし

取得状況
特になし

〔その他〕
ホームページ等、特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 由美 (CHIBA, Yumi)
横浜市立大学・医学部・教授
研究者番号: 10313256

(2) 研究分担者

豊田 雅士 (TOYODA, Masashi)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長
研究者番号: 50392486

石上 友章 (ISHIGAMI, Tomoaki)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号: 50264651

峯岸 慎太郎 (MINEGISHI, Shintaro)
横浜市立大学・附属病院・助教
研究者番号: 80458398

(3) 連携研究者

佐々木 紀彦 (SASAKI, Norihiko)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員
研究者番号: 80639063

板倉 陽子 (ITAKURA, Yoko)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員
研究者番号: 30582746

(4) 研究協力者

中島 理恵 (NAKASHIMA, Rie)
横浜市立大学大学院・医学研究科・大学院生