

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15631

研究課題名(和文) 心筋幹細胞ニッチを制御する細胞外基質を用いた新規デバイスによる心不全治療法の開発

研究課題名(英文) Development of heart failure treatment by new device using extracellular matrix modulating cardiac stem cell niche

研究代表者

澤 芳樹 (Sawa, Yoshiki)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00243220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄由来間葉系幹細胞はラミニン(LM)511に対して強い接着活性および増殖活性を示した。急性心筋梗塞モデルラットの病変部にLM511を移植したところ、経時的に間葉系幹細胞と思われる細胞、血管内皮細胞、および血管新生関連サイトカインがコントロール群に比して顕著に増加した。組織の線維化および心機能においてもLM511移植群ではコントロール群に比して、有意な改善が認められた。これらの結果により、急性心筋梗塞モデルへのLM511移植は、幹細胞の接着を促進し、病変部での血管新生に影響を与え、組織線維化および機能の改善に寄与する可能性を示唆した。これは、心不全治療における新しい可能性を見出すものであった。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) showed strong adhesive and proliferation activity on LM511. To examine the effects of LM511 in vivo, we transplanted LM511 in rat acute myocardial infarction model. Four weeks later, the number of MSCs or that of endothelial cells were significantly higher in the LM511-transplanted group than in the control group. The number of them increased further over four to eight weeks. In addition, transplantation of LM511 increased the expression of angiogenic cytokines. Moreover transplantation of LM511 was induced suppression of fibrosis and improvement of cardiac function. Our data indicate that transplantation of the LM511 may contribute to localization of MSCs to the implantation site and to modulating stem cell activities, leading to angiogenesis and improvement of the cardiac function in the rat acute myocardial infarction heart. Supplementation of components of the cardiac stem cell niche may be a promising new approach in the treatment of heart disease.

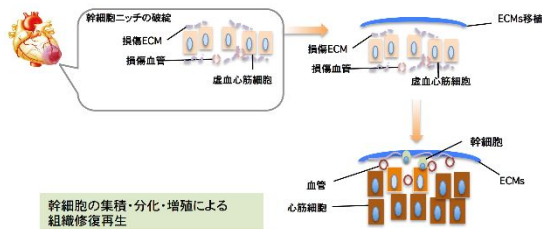
研究分野：心臓血管外科

キーワード：幹細胞ニッチ 細胞外マトリックス 組織修復

### 1. 研究開始当初の背景

近年、修復能力が低いとされてきた心臓に幹細胞が存在し、障害を受けた心臓組織の修復に寄与する可能性があることが報告されてきている。それに伴い、幹細胞の機能や恒常性の維持等、その動態を制御している微小環境（幹細胞ニッチ）の存在が明らかにされつつある。さらに基底膜成分のラミニンが、幹細胞ニッチを構成する細胞外基質として、細胞の接着・増殖・分化を制御し、器官形成・維持に寄与することが報告されている。通常、幹細胞はニッチ内においてその機能や恒常性が維持されているが、虚血性障害部位ではニッチ環境は破綻し、そこに存在する幹細胞は適切なシグナルを受けることができず、幹細胞としての機能を失い、組織修復が妨げられていると考えられる。そこでニッチ環境を保護あるいは補充することで、内因性幹細胞にとって、適切なプラットフォームを構築し、その機能を回復できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的 本研究のスキーム



規格化・製品化された細胞外基質を用いて人工的に幹細胞ニッチを構築し、内在性の自己幹細胞の機能を改善することにより、心機能を回復させるという、今までにない新たな組織修復法の開発を行い、心不全に対する新たな治療法につなげることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) *in vitro*において、幹細胞と細胞外基質の相互作用について検討を行う。これらの結果をもとに、生着した幹細胞が組織修復に有用な細胞に分化しうる、あるいは組織修復に有用なサイトカイン等を産生するデバイスを作製する。

(2) 心不全モデル動物を用いた実験により、その効果を検討する。心筋梗塞モデルラットを作製し、その病変部に細胞外基質を移植する。経時的に心臓組織を採取し、集積する細胞のキャラクタライズ、組織再生過程の検討、メカニズム、細胞の由来について解析を行うとともに、心機能の改善について検討する。

### 4. 研究成果

(1) 培養間葉系幹細胞 (MSCs) における細胞外基質 (ECMs) の主なりガンドとなるインテグリンの発現を確認したところ、MSCs には、ラミニン (LM) 511 のリガンドとなる 3 インテグリン、5 インテグリンが高発現 (90%以上) していることが確認できた。一方、LM221 のリガンドとなる 7 インテグリンの発現はほとんど認められなかった。他にも、MSCs には 1 インテグリン、2 インテグリン、6 インテグリンが中程度に発現 (約 50%) し、4 インテグリンはほとんど発現していないことを確認した。

ECMs 上での MSCs の接着活性および増殖活性を検討したところ、MSCs は LM511 上で非常に強い接着活性 (図 1、図 2) および増殖活性を示した。一方、LM221 上での接着活性は非常に低く、また増殖活性においても、LM511 上での活性に比して有意に低いものであった。

LM221 LM511

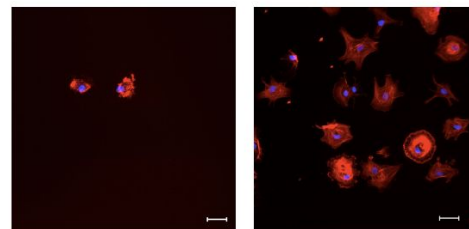


図 1 LM221、LM511 に対する MSCs の接着

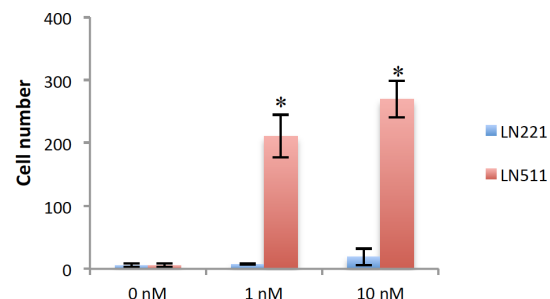


図 2 LM221 と LM511 に対する接着能の定量化

(2) *in vivo*での LM511 移植および LM221 移植の効果を検討するために、急性心筋梗塞モデルラットを作製し、アテロコラーゲンシートに LM511 あるいは LM221 を含浸させ、病変部に移植した。

#### 間葉系幹細胞の集積

移植 4 週間後、ECMs 含浸アテロコラーゲンシート貼付部には PDGFR<sup>+</sup>・CD90<sup>+</sup> 共陽性の間葉系幹細胞と思われる細胞が集積していた。LM511 移植群ではコントロール群に比して約 5 倍の PDGFR<sup>+</sup>・CD90<sup>+</sup> 共陽性細胞数が、また LM221 移植群と比しても 2 倍以上の PDGFR<sup>+</sup>・CD90<sup>+</sup> 共陽性細胞数が認められていた。このことは、LM511 移植群では、他群に比して間葉系幹細胞と思われる細胞が有意に病変部に集積していることを示唆していた (図 3)。

移植 8 週後では、病変部に集積する PDGFR・CD90 共陽性の間葉系幹細胞数はさらに増加傾向を示した。

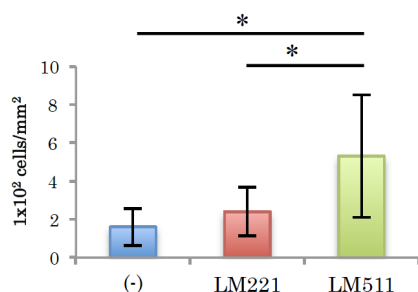


図 3 移植 4 週後での病変部への PDGFR・CD90 共陽性細胞の集積

#### 血管内皮細胞の集積

移植 4 週後、ECMs 含浸アテロコラーゲンシート貼付部には ILB4 陽性の血管内皮細胞の集積も確認できた。LM511 移植群ではコントロール群に比して約 1.7 倍の ILB4 陽性血管内皮細胞数が、また LM221 移植群と比しても 1.5 倍以上の ILB4 陽性細胞数が認められていたことから、LM511 移植群の病変部では、他群に比して血管内皮細胞が有意に多くなっていることが確認できた。移植 8 週後では、ILB4 陽性の血管内皮細胞数はさらに増加傾向を示した。

さらに、ILB4 陽性の血管の一部は、平滑筋マーカーである SMA 陽性の細胞に裏打ちされており、より成熟した血管になっていると考えられる。この数は、移植 4 週後から 8 週後にかけて増加傾向を示した。

また、ILB4 陽性の血管内皮細胞の一部は少ないながらも PDGFR・CD90 共陽性であった。このことは、血管内皮細胞の一部は、間葉系幹細胞から分化した細胞である可能性が示唆された(図 4)。

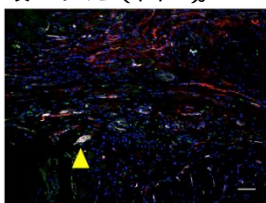


図 4 ILB4・PDGFR・CD90 陽性細胞(矢頭)

#### 血管新生関連サイトカインの発現

ECMs 含浸アテロコラーゲンシート貼付部における様々なサイトカインの発現を、qRT-PCR 法で検討したところ、移植 4 週後において、LM511 移植群ではコントロール群に比して血管新生に関わるサイトカインの発現が高くなっていった。特に、SDF-1、FGF2、PGF、HGF の発現は、コントロール群に比して有意に高くなっていった。これらのサイトカインのタンパク質発現は免疫組織染色法による解析においても認められ、LM511 移植群で有意に高くなるという同様の傾向が認め

られた。

#### 組織の線維化

移植 4 週後の組織の線維化率を評価したところ、コントロール群では  $18.2 \pm 0.9\%$ 、LM221 移植群では  $9.6 \pm 3.0\%$ 、LM511 移植群では  $8.1 \pm 2.4\%$  であり、コントロール群に比して、LM221 移植群、LM511 移植群では有意に組織線維化率は抑制されていた。しかし、LM221 移植群と LM511 移植群では有意な差は認められなかった。移植 8 週後では、それぞれの線維化率は抑制傾向が認められ、LM511 移植群ではコントロール群に比して顕著に組織の線維化が抑制されていた。

#### 心機能評価

心エコー検査にて、経時的に各群の心機能を評価したところ、コントロール群では EF 値および %FS 値は顕著な低下を示したのに対し、LM221 移植群では維持されており、LM511 移植群では有意な上昇が認められていた。LM511 移植群では、コントロール群に比して移植 2 週後より有意に心機能が改善していることが確認できた(図 5)。

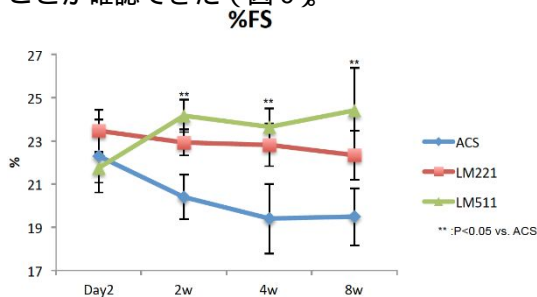


図 5 経時的な心機能の変化

本研究では、LM511 のような細胞外基質を含む幹細胞ニッチを直接病変部に貼付し、体内の自己再生能力の向上を目指した新規治療法「自己組織再生型インプラントデバイス」の開発につなげることを目的としており、他に類を見ない技術である。

これまでの重症心不全の治療手段としては、心臓移植や機械型人工心臓が挙げられるが、心臓移植においてはドナー数に限りがあり、また人工心臓は現時点では心臓移植への橋渡しとしてのみ保険医療が認められていることから、治療を受けることができる患者数は極めて限られている。本研究開発による新規治療法は、細胞を用いない、体内の再生能力を最大限に向上させる治療法であり、内視鏡を用いるなど、比較的侵襲も低く、安全でシンプルな術式により患者への提供が可能となり、汎用性が高くなると考えられる。

心臓移植はドナー不足という問題点だけでなく、移植に至るまでの治療・管理、また移植後の免疫抑制剤にも相当のコストを要し、医療経済上相当の負担となる。既存の重症心不全においては、高額な治療費が発生することから、よりコストダウンが期待できる

再生型治療の開発が望まれている。本研究開発テーマである「自己組織再生型インプラントデバイス」は移植医療や人工心臓が抱える倫理社会的問題が少ないことから、国内だけでなく国際的にも汎用性が高い治療と考えられる。

より詳細な治療メカニズムの解析や、より効果的な因子の探索、あるいはデバイスの投与方法、投与時期の検討など課題は残っているが、本申請の研究開発により得られた結果は、心不全治療における新しい可能性を見出すものであり、次世代型の心臓再生医療製品につながるものと期待している。

#### 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)

[学会発表](計 2件)

寒川 延子、宮川 繁、福嶋 五月、齋藤 充弘、横山 淳也、原田 明希摩、小田一 望月 紀子、佐藤(西内) 涼子、関口 清俊、澤 芳樹、急性心筋梗塞に対するラミニン 511 含有アテロコラーゲンシート移植の有用性の検討、第 17 回日本再生医療学会、2018 年

Sougawa N, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Yokoyama J, Kitahara M, Harada A, Sato-Nishiuchi R, Sekiguchi K, Sawa Y, Novel stem cell niche Laminin-511 promotes functional angiogenesis through enhanced stem cell homing by modulating Stem cell “niche” in the failed heart. American Heart Association Scientific Sessions 2017, 2017 年

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

澤 芳樹 (SAWA, Yoshiki)  
大阪大学大学院医学系研究科・教授  
研究者番号： 00243220

##### (2)研究分担者

増田 茂夫 (Masuda, Sigeo)  
大阪大学大学院医学系研究科・特任准教授  
(常勤)  
研究者番号： 10396749

齋藤 充宏 (SAITO, Atsuhiko)  
大阪大学大学院医学系研究科・特任准教授  
(常勤)  
研究者番号： 20448038

寒川 延子 (SOUGAWA, Nagako)

大阪大学大学院医学系研究科・特任助教  
(常勤)

研究者番号： 30432579

福嶋 五月 (FUKUSHIMA, Satsuki)

国立研究開発法人国立循環器病センター・病院・医長

研究者番号： 80596867

秦 広樹 (HATA, Hiroki)

大阪大学大学院医学系研究科・講師

研究者番号： 80638198

##### (4)研究協力者

関口 清俊 (SEKIGUCHI, Kiyotoshi)