

平成 22 年 2 月 18 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790543

研究課題名(和文) 骨髄単核球細胞由来新規心筋細胞保護的増殖因子の同定

研究課題名(英文) Identification of cardioprotective growth factor derived from bone marrow mononuclear cells

研究代表者

松浦 勝久(MATSUURA KATSUHISA)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：70433993

研究成果の概要：

重症心不全に対する細胞移植治療は、次世代の治療法として期待されている。今回我々は非虚血性拡張型心筋症マウスに対する骨髄単核球細胞移植の効果およびその分子機序を明らかにすることを目的と検討を行った。骨髄単核球細胞移植は、短期的な左室収縮能の改善効果を示し、それは、骨髄単核球中の顆粒球系の細胞が分泌する成長ホルモンによる効果であることが明らかとなった。ただ、心不全マウスの骨髄顆粒球の成長ホルモン分泌量は健常マウスに比し有意に低値であることから、臨床応用に向けては、骨髄顆粒球の成長ホルモン分泌制御に関わる分子機序の解明が今後必要と考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：細胞移植、心筋細胞、成長ホルモン、パラクリン

## 1. 研究開始当初の背景

生活習慣の欧米化にともない、我が国では高血圧、心筋梗塞などの動脈硬化性疾患が増加し、心疾患は日本人の死亡原因の第2位を占めている。しかし、薬物治療、外科治療、循環補助装置の進歩にもかかわらず、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、また、高齢化社会をむかえるにあたり、心不全患者は今後増加すると考えられ、QOLや医療経済的にも大きな問題であ

る。近年、各種臓器の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、特に循環器領域においては、骨髄幹細胞を始めとした幹細胞移植が、重症の虚血下肢を有する症例や、重症の虚血性心疾患患者を対象として行われ始めている。最近になり、急性心筋梗塞患者に対する経冠動脈的骨髄単核球細胞移植による、心機能改善効果及び心血管死の抑制効果が報告されている(N.Eng.J.Med. 355,1210,2006)。骨髄単核

球細胞内には、造血系幹細胞、間葉系幹細胞を含む未分化な細胞とともに、各々の血球分画の中での各種分化段階の細胞が含まれる。特に造血系幹細胞は、当初、心筋局所への細胞移植により、高率に心筋細胞に分化すると報告(Nature. 410,701,2001)がなされ、その有効性に対して大きな期待が寄せられたが、後の報告では、その心筋細胞への分化能は非常に限られていることが示されるなど(Nature. 428,664,2004)、いまだ議論の多いところである。我々も、心臓への細胞移植及び心筋細胞との共培養における、各種体性細胞の心筋細胞への形質転換の多くが、心筋細胞との細胞融合であることを報告しており(J Cell Biol.167,351,2004)、組織幹細胞における心筋細胞への分化能に関しては極限られた現象と考えるに至っている。しかし、一方で虚血性心疾患モデルにおいては、骨髄単核球細胞移植による心機能改善効果が数多く報告され(Circulation. 104,1046,2001, Cardiovasc. Res. 69,476,2006)、また上記のようにヒトへの移植においても、同様に心機能改善効果が報告されるに及び、その詳細な機序の解明が急務となっている。わが国においては、重症心不全患者の多くが、拡張型心筋症を含む非虚血性心疾患である。骨髄単核球細胞内には、以前より血管内皮前駆細胞が含まれていることが報告されていることから(Science. 275,964,1997)、その脈管新生促進効果により、虚血組織の機能回復が得られることが示唆されており(Circulation. 107,461,2003)、虚血性心疾患に伴う心不全に対する骨髄単核球細胞移植の意義は、既存の概念で説明しうるものであるが、その非虚血性心疾患に対する効果、及びその機序に関しては、依然不明なままである。以上を踏まえ、本研究において我々は、非虚血性心疾患に伴う心不全の新しい治療法として、骨髄単核球細胞移植の可能性及びその機序について検討する。

## 2. 研究の目的

各種非虚血性拡張型心筋症モデルマウス(心筋特異的epidermal growth factor receptor dominant negativeマウス、doxorubicin心筋症マウス)に対し、経静脈的に骨髄単核球細胞移植を行い、急性期及び慢性期の心機能改善効果を確認したところ、骨髄単核球細胞移植3日後に一時的な左室収縮能の改善が認められることが明らかとなった。しかし心臓含めた実質臓器には移植細胞の生着が認められなかったことから、移植細胞の分泌する増殖因子による左室壁運動の改善効果が示唆された。以上を踏まえ、今回我々は、骨髄単核球細胞移植による非虚血性拡張型心筋症

モデルマウス心機能改善効果に関わる骨髄細胞由来の因子の同定を行い、その分子機序を明らかにすることを目的とし検討を行った。

## 3. 研究の方法

平成 18 年度

### 1) 骨髄単核球細胞移植による拡張型心筋症モデルマウスの心機能改善効果の検討

生後8週齢の拡張型心筋症モデルマウスの心機能を心臓超音波検査にて、また血圧、脈拍数をマウス用血圧計を用いて測定する。野生型マウス(雄)より骨髄単核球細胞を比重分離法にて単離、精製し、約 $2.0 \times 10^7$ 個の細胞を、尾静脈より移植する。コントロール群には同量のPBSを尾静脈より投与する。移植3日目、7日目、14日目に、心臓超音波検査、及び血圧、脈拍数を計測する。移植14日目に再度同量の骨髄単核球細胞を尾静脈より移植する。このプロトコルを計4クール施行し、終了時に、全血採取により血清を分離するとともに、心臓は摘出し、HE染色、マッソン・トリクローム染色、Tunel染色にて、各々心筋細胞の肥大、心筋間質の線維化、心筋細胞のアポトーシスについて組織学的検討を行う。図1に示すように、骨髄単核球細胞移植群において、移植急性期及び慢性期においても、コントロール群に比して心機能の改善する傾向を認めている。次に、移植された骨髄細胞のホストの組織内での生着を評価するため、約 $2.0 \times 10^7$ 個のGFPマウス由来骨髄単核球細胞を野生型マウス及び拡張型心筋症モデルマウスに移植する。移植3日目、7日目、14日目に、心臓、脾臓、肺を摘出し、また全血を採取する。臓器に関しては、免疫染色法にて、また血中の細胞に関しては、フローサイトメトリー法にて各々GFP陽性細胞の数を経時的に比較する。また、心臓においては、GFP陽性細胞の、心筋細胞、血管内皮細胞特異的抗体を用いて二重染色を行い、分化の頻度についても定量化を行う。

### 2) 骨髄単核球細胞との共培養における、新生仔ラット心筋細胞の自律拍動の検討

新生仔ラット心筋細胞を単離し、1%ゼラチンでコートした培養皿上に播種し、数日間培養する。心筋細胞の十分な自律拍動を確認後、各濃度の血清入りの培養液中で12時間培養する。12時間後、野生型マウス(雄)より骨髄単核球細胞を比重分離法にて単離、精製し、インサートを介して、心筋細胞と共培養を行う。この方法により、骨髄単核球細胞は、心筋細胞と直接は接触せずに共培養している状態にある。共培養開始12時間後では、図2に示すように、心筋細胞は、0%、1%の

ような無・低血清存在下では、その自律拍動は著しく減少するが、骨髄単核球細胞との共培養により、有意にその数が増加することが明らかとなった。

骨髄単核球細胞内には、造血系細胞としては、顆粒球系、B細胞系、赤芽球系の細胞が存在し、また非常にまれながら、造血系幹細胞が存在する。また非造血系細胞として間葉系細胞が存在する。マウス骨髄においては、顆粒球系の細胞はGr-1陽性、リンパ球系の細胞はB220陽性、赤芽球系の細胞はTer119陽性、また造血系幹細胞は、Lineage陰性かつSca-1陽性のfractionに存在することが報告されており、各々のfractionを、マグネットビーズ法を用いて、選別することが可能である。また、間葉系細胞は、接着系細胞として、上記の造血系細胞と分離可能である。以上のように分離した各fractionの細胞を、同数ずつ、低血清存在下にて培養中の心筋細胞上に、インサートを介して共培養を行い、12時間後に、心筋細胞の自律拍動数を比較検討する。また、一部の心筋細胞においては、Fura-2AMを用いて、自律拍動の増加と細胞内カルシウム流入と関連を明らかにする。次に、同数の各fractionの細胞を、無血清培地にて24時間培養したのちに、培養上清を回収する。再度、低血清培地にて培養中の心筋細胞の培地を、得られた培養上清に変更し、12時間後に心筋細胞の自律拍動数及び細胞内カルシウムの流入を測定する。この実験により、心筋細胞のviabilityに対してpositiveもしくはnegativeに作用するfractionを分別することが可能である。

### 3) 細胞培養上清のin vivoにおける心筋保護的効果の検討

上記2)で確認された、positive及びnegativeのfractionの細胞を24時間、無血清で培養した後に、培養上清を回収する。フィルターにて高分子蛋白を除去した後に、尾静脈より各々拡張型心筋症モデルマウスに投与する。上記1)と同様に、2週間毎に計4回の投与を行い、経時的な心機能の変化を検討する。

4) マイクロアレイを用いた骨髄単核球細胞由来心筋保護的増殖因子のスクリーニング  
上記2)で確認されたpositive及びnegativeのfractionの細胞より、total RNAを抽出した後に、マイクロアレイを行い、サイトカイン、増殖因子等に関わる遺伝子の発現に関しスクリーニングを行う。マイクロアレイにて有意な発現の差を認められた因子に関しては、real time PCRにて、発現量の差を定量化し、確認する。

平成19年度

平成18年度に確認された新規心筋保護的増

殖因子の、in vitroおよびin vivoでの効果を確認するため、下記の実験を行う。

### 1) 心筋細胞の自律拍動に関するin vitroでの検討

平成18年度と同様に、新生仔ラット心筋細胞を、低血清存在下にて培養を行う。インサートを介した骨髄由来細胞との共培養、および骨髄由来細胞の培養上清存在下での心筋細胞の自律拍動数を陽性コントロールとし、同定された心筋保護的増殖因子のみを加えた条件での心筋細胞自律拍動数に関し比較検討を行う。また、インサートを介した骨髄由来細胞との共培養、および骨髄由来細胞培養上清存在下での心筋細胞の培養に、心筋保護的増殖因子の中和抗体を同時に加え培養を行い、骨髄由来細胞の心筋保護的効果と、同定された因子との関連を検討する。

2) 拡張型心筋症モデル動物の末梢血中における、心筋保護的増殖因子血中濃度の測定  
平成18年度に骨髄単核球細胞移植実験を施行した拡張型心筋症モデルマウスに関し、屠殺時に採取保存した血清を用い、同定された心筋保護的増殖因子の末梢血中の濃度を、ELISA法にて測定する。

### 3) 拡張型心筋症モデルマウスへの新規心筋保護的増殖因子投与による心筋機能改善効果の検討

平成18年度に使用した拡張型心筋症モデルマウスを用いて、新規心筋保護的増殖因子を経静脈的に投与を行い、生存率、心機能改善効果、血行動態に及ぼす影響について、心臓超音波検査、マウス用血圧計、ミラーカテテルを用いて評価する。また、投与に際しては、その投与間隔、投与量についても比較検討を行う。投与開始10週間後を目途に、マウスは屠殺し、心筋間質の線維化、心筋細胞の肥大、アポトーシス等に関し、組織学的に検討を行う。

## 4. 研究成果

骨髄単核球細胞を、経静脈的に拡張型心筋症モデルマウスに移植を行うと、移植3日目に一時的な左室壁運動の改善が確認されたが、移植14日目には心機能改善効果は確認されなかった。また2週間おきに繰り返し移植を行うと、その度ごとに移植3日目に心機能の改善が観察された。GFPマウス由来骨髄細胞を移植した実験を行い、組織学的検討を行った結果、心臓を含め実質臓器には移植細胞の生着は確認されず、そのほとんどが末梢血にいたことが確認された。またTunel染色およびvWF染色により、細胞移植後の心筋アポトーシスおよび血管新生について評価を行ったところ、移植群および非移植群との間で、

Tunel 陽性細胞数、vWF 陽性血管数には差を認めなかった。一方で、HE 染色により、骨髄細胞移植群では、心筋細胞の有意な肥大が観察された。以上より骨髄細胞移植は、骨髄細胞の分泌する因子により、心筋細胞に直接に効果をもたらしている可能性が示唆された。

そこで、骨髄単核球細胞培養上清が骨髄単核球細胞の培養上清を回収し、非血清存在下に培養した新生仔ラット心筋細胞に添加培養を行うと、有意な細胞短縮率の改善および自律拍動数の増加が確認された。骨髄単核球細胞には複数の系統の細胞が混在していることから、MACS を用いて顆粒球系、赤芽球系、リンパ球系、未分化細胞 (lineage negative fraction) に分離し、各々より培養上清を回収した後心筋細胞に添加すると、顆粒球系細胞由来培養上清によってのみ心筋細胞の細胞短縮率の改善および自律拍動数の増加が確認された。一方で拡張型心筋マウス由来骨髄顆粒球培養上清では、心筋細胞の収縮改善効果は認められないことが確認された。以上より、健常マウスおよび拡張型心筋マウスより各々骨髄顆粒球を回収し、RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現の差異を検討した。すると、健常マウス由来骨髄顆粒球において 23 遺伝子が、拡張型心筋マウス由来細胞に比して発現増加が確認された。その中で成長ホルモンが最も発現の差異が大きいことから、以後成長ホルモんに注目し検討を継続した。定量的 RT-PCR および培養上清を用いた ELISA においても、拡張型心筋マウスに比して健常マウス骨髄顆粒球における成長ホルモンの増加が確認された。

次に、成長ホルモン受容体の特異的阻害剤である pegvisomant を用いて、骨髄顆粒球培養上清の効果における成長ホルモンの役割について検討を行った。骨髄顆粒球培養上清添加による心筋細胞短縮率の改善および自律拍動数の上昇効果は、pegvisomant 添加により完全に抑制された。一方 pegvisomant 単独では、心筋細胞の収縮には影響を認めなかったことから、骨髄細胞は、顆粒球中分画細胞の分泌する成長ホルモンによって心筋細胞の収縮に直接的に影響しているものと考えられた。

骨髄顆粒球培養上清添加により、心筋細胞における Jak2、Stat3/5、Akt、Erk、PKA のリン酸化が確認され、またこれらキナーゼの活性化は pegvisomant の前処置により抑制された。さらに健常マウス骨髄単核球培養上清中の成長ホルモンと同じ濃度の成長ホルモンを新生仔ラット心筋細胞に添加すると、同様のキナーゼの活性化が確認された。一方、骨髄顆粒球培養上清および成長ホルモンは心筋細胞内の cyclic AMP の量を増加させが、

この効果は pegvisomant の前処置により完全に抑制されたことから、骨髄顆粒球は、成長ホルモンおよび成長ホルモン受容体を介して、心筋細胞内 cyclic AMP を増加させ、心筋細胞収縮能改善に寄与するものと考えられた。

## 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 1 件)

Honda A, Matsuura K, Fukushima N, Tsurumi Y, Kasanuki H, Hagiwara N. Telmisartan induces proliferation of human endothelial progenitor cells via PPARgamma-dependent PI3K/Akt pathway. *Atherosclerosis*. 2009 Aug;205(2):376-84. Epub 2008 Dec 31 査読あり

[学会発表](計 4 件)

福島教照(研究協力者) 松浦勝久 Bone Marrow Derived Mononuclear Cells Improve the Cardiac Function of Dilated Cardiomyopathy Models via Gr-1 Positive Cells-secreted Factors 第 73 回日本循環器学会 2009 年 3 月 29 日 大阪

福島教照(研究協力者) 松浦勝久 Bone marrow derived mononuclear cells transiently improve the cardiac function of dilated cardiomyopathy models via Gr-1 positive cells-secreted factors 第 72 回日本循環器学会 2008 年 3 月 29 日 福岡

福島教照(研究協力者)、松浦勝久 拡張型心筋症モデルマウスへの骨髄単核球細胞移植心保護効果における、骨髄顆粒球の新たな役割 第 7 回日本再生医療学会 2008 年 3 月 14 日名古屋

松浦勝久 骨髄単核球細胞は、心筋保護の因子の産生を介し、拡張型心筋症マウス心機能を改善する 第 7 回日本再生医療学会 2008 年 3 月 13 日名古屋

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 勝久 (MATSUURA KATSUHISA)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70433993

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし