

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390223
 研究課題名（和文） 新たな幹細胞増幅因子とヒト心臓内幹細胞を併用した心不全への自家細胞移植療法の開発
 研究課題名（英文） Integrated cardiac stem cell therapy to treat heart failure

研究代表者
 王 英正（OH HIDEMASA）
 岡山大学・岡山大学病院・教授
 研究者番号：50372579

研究成果の概要(和文): 重度の虚血性心不全に対して、自己心臓内幹細胞の心筋内注入に加え、幹細胞増殖促進因子の一つである塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を併用した細胞治療法を開発することに成功した。慢性心筋梗塞のミニブタにおける免疫機能を抑制下、ヒト心臓内幹細胞の心筋内注入とbFGFの組織内徐放を併用した細胞治療法の前臨床試験を行った。本法による治療後、左室駆出率と心筋局所壁運動は有意に改善し、心筋梗塞サイズは著明に縮小した。

研究成果の概要(英文): Current cell therapies for cardiac repair are limited by loss of the transplanted cells and poor differentiation. Controlled delivery of bFGF modulates the post-ischemic microenvironment to enhance human cardiosphere-derived cell engraftment and differentiation. This novel strategy demonstrates significant functional improvements after myocardial infarction and may potentially represent a therapeutic approach to be studied in a clinical trial in human heart failure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：循環器内科学、心筋再生医学。

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：心臓内幹細胞、再生医療、細胞移植、心不全、成長因子、塩基性線維芽細胞成長因子、組織工学。

1. 研究開始当初の背景

わが国での心臓移植待機中の心不全患者の病態的特徴は、機能的な心筋細胞がほとんど残存しない虚血性心筋症で90%以上の割合を占めており、実質的な作業心筋細胞を新たに

補充する形での心筋細胞再生を絶対的に必要とし、骨髄または末梢血内に存在する血管内皮前駆細胞による血管新生という治療法では救命できない難治性の疾患である。

2003年に世界で初めて申請者らの研究が

ループを含めて、特定の細胞表面抗原である Sca-1 を用いた単離法で、能動的に拍動性の心筋細胞に分化しうる心筋幹細胞の存在を報告してきた [Oh H (筆頭著者、他11名) *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:12313-12318]。

また、図1のようにヒトの心臓組織内より単一細胞から cardiosphere を形成し増幅させた心筋幹細胞の単離に成功し、その細胞機能を拍動性心筋細胞への分化及び移植実験によって明らかにした [Oh H (最終著者、他9名) *Biochem Biophys Res Commun* 2007;352:635-641; Takehara N, Oh H (最終著者、他7名) *Circulation Suppl* 2007]。しかしながら、幹細胞単独移植療法ではドナー細胞の生着性が低く、より有効な心筋再生医療を目指すためには、心臓内幹細胞の特異的増殖調節因子の同定が必須不可欠である。

2. 研究の目的

- 1) 心筋幹細胞を認識する Sca-1 をノックダウンさせたマウス及び Sca-1 promoter 依存性に持続活性型 Akt1 をノックインさせたマウス成熟心臓内から単離精製した幹細胞の遺伝子プロファイルを網羅的検索し、新規の幹細胞増殖調節因子の同定とその機能解析。
- 2) 申請者らが単離精製に成功したヒト心臓組織由来幹細胞の心筋細胞再生効果を最大限に発揮させるため、幹細胞固有の増殖促進因子を心筋組織内に徐放させたハイブリッド細胞移植療法の臨床応用に向けた大型動物による前臨床治験の開発推進。
- 3) 心臓内より新たに単離した筋特異的蛋白 muscle-restricted coiled-coil protein (MuRC) の心筋細胞分化における役割と心臓特異的過剰発現マウスを用いた心肥大に関する機能解析。
- 4) 新規 MuRC 遺伝子を制御する特異的結合

蛋白の同定と機能解析。

3. 研究の方法

- 1) Sca-1 promoter 依存性活性型 Akt1 ノックイン心筋幹細胞の単離
心筋幹細胞を認識する Sca-1 をノックダウンさせたマウス及び Sca-1 promoter 依存性に持続活性型 Akt1 をノックインさせたマウス成熟心臓内から単離精製した幹細胞の遺伝子プロファイルを網羅的検索し、候補遺伝子を同定する。各種レトロウイルスや包括的ノックダウンシステムを用いて細胞内での機能検証し、最終候補因子の絞込みを行う。
- 2) 心筋幹細胞と候補因子の心筋組織内徐放を併用したハイブリッド療法の有効性の検討
上記の実験で、最も有効と思われる心筋幹細胞増幅因子または成熟心筋細胞保護因子について、10%ゼラチンで作成した生体吸収性薬物徐放シートの上に浸透させ乾燥させる。検討目的とする因子の徐放量は体重 kg 当たり 10 -100 μ g とし、1ヶ月間経過した慢性心筋梗塞を作成したミニブタの心臓にヒト心筋幹細胞とともに同時移植する。
- 3) MuRC 遺伝子改変動物の作成と心筋細胞分化制御機構の解析
生体内での MURC の役割について検討するため、心臓特異的 MURC 欠損マウスを作成した。MURC の exon1 を標的とした MURC flox/flox のコンストラクトをマウス受精卵に注入し、キメラマウスの誕生後、継代的に繁殖させ、心臓特異的プロモーターで制御されている MHC-2v Cre マウスとの掛け合わせで、心臓特異的 MURC 欠損マウスを入手し、様々な環境下でのマウス心機能を解析する。
レトロウイルスベクターを用いてマウス及びヒト心筋幹細胞で検証し、in vitro での心筋分化誘導因子または in vivo における幹

細胞増殖促進因子の両側面の可能性から機能解析を進めていく。

4) MuRCとの結合蛋白の同定と解析

MuRC を bait とした yeast two-hybrid 法により、heart cDNA library の screening を行い、MuRC と結合する候補蛋白質を同定する。

また、質量分析法を利用して、MuRC-Flag を過剰発現させた Tg マウス (Tg-MuRC) の心臓を用い、最初に抗 Flag 抗体、次に MuRC のポリクローナル抗体にて MuRC 複合体の精製を行い、SDS-PAGE 電気泳動後に切り出されたバンドをマスマスペクトロメトリーにより断片ペプチドのデータベース検索し、候補蛋白質を同定する。

4. 研究成果

1) 心臓内幹細胞特異的増殖刺激因子の同定
心臓内幹細胞の多くは表面抗原である Sca-1 で認識されることから、我々は既に報告した心臓内幹細胞の増幅因子である Akt 依存性に増殖調節する遺伝子群を Sca-1 プロモーター制御下で網羅的にスクリーニングした。合計 95 個の遺伝子群が初期分離で同定され、うち、46 遺伝子群が Akt 依存性に発現低下、49 遺伝子群が有意に発現上昇した。49 遺伝子群の中で、我々のスクリーニング条件に一致した遺伝子群を 12 個同定し、二次的検索により、最終的に 4 つの候補遺伝子に集約した。Osteopontin、SPARC、インターロイキン 1 受容体様因子 (ST2) と低酸素誘導因子 (HIF- α) に焦点を当てて、以下の解析を行った。

上記の 4 遺伝子群はともに、成熟心筋細胞や線維芽細胞に比べ、心臓内幹細胞において、その発現は多く、それぞれのリコンビナント蛋白及びレトロウイルスによる遺伝子の過剰発現実験においても、通常の幹細胞培養条件よりも 5 から 10 倍有意に幹細胞の特異的増幅作用があることが明らかとなった。ま

た、si-RNA を用いた遺伝子欠損実験での検討では、これらの遺伝子群の発現欠損により、心臓内幹細胞の自己複製障害から、虚血ストレス障害における心機能の回復が有意に低下した。

2) 心臓内幹細胞と bFGF とのハイブリッド移植療法の前臨床試験の実施

大型動物 (ブタ) を用いたヒト心臓幹細胞移植の有効性・安全性評価を目的とする前臨床試験を施行した。試験デザインは、陈旧性心筋梗塞による慢性虚血機能不全心を作成し、前向きランダム化試験として、心臓幹細胞単独移植による生体内での安全性と梗塞心改善に関する有効性評価とした。移植細胞数は 3×10^5 個/kg と設定、また心臓幹細胞の対照細胞としてヒト組織由来幹細胞の骨髄間葉系幹細胞を用い、比較検討を行った。異種間細胞移植治療に該当するため、全頭に免疫抑制剤を移植前日から治療終了まで継続して投与し、血中濃度のモニタリングを行った。

安全性に関しては、全治療ブタ 70 例において、全死亡は術関連死 1 例のみで、術後〜試験終了時までの期間における死亡例の発生は認めなかった。24 時間心電図による不整脈監視においても、心室性不整脈を含む有害事象としての不整脈の発生はいずれの群においても発生は認められなかった。

有効性に関しては、心臓内幹細胞単独移植においても、梗塞後心機能の有意な改善と梗塞部重量の減少を認めた。病理組織学的検討による心筋再生の効率は、骨髄間葉系幹細胞に比し 8 倍以上の実質的な心筋細胞再生を確認した。この再生心筋細胞は、30%の形質転換と宿主ブタ心筋との間の細胞融合が 70%の機序で心筋細胞再生を果たしていることが、本前臨床研究で明らかにされているが、同時に宿主心筋細胞との間に gap 結合蛋白である Connexin43 の発現を介して電気

的結合・融合を形成していることも明らかとなった。心臓幹細胞、及び骨髄間葉系幹細胞の移植後の奇形腫形成、癌腫形成の危険性について術後4週の短期観察及び術後4ヶ月の長期観察を行い、最終的に36頭の免疫不全ブタの細胞移植後心臓の病理学的検索を行ったが、内胚葉、中胚葉、外胚葉組織を含めいかなる奇形種、異形細胞腫の形成も確認されなかった。

3) ヒト心不全症例におけるMURCのゲノム解析

新規単離にした心筋構造蛋白の心不全における機能的重要性を明らかにするため、米国テキサス大学医学部と共同研究にて、1199人の末梢血標本を用いてヒトゲノム解析を行った。内訳はDCM383人、HCM307人、正常人509人であった。この結果、約5%のヒト心筋症例より、発症した重度心不全の患者さんにMURCの突然変異があることが明らかとなった。臨床像の特徴は、拡張型心筋症に多く、黒人の心不全症例にMURCの突然変異があることが確認された。

網羅的MURCのゲノム解析により、我々はp. N128K, p. R140W, p. L153P, p. S307T, p. P324L, p. S364Lの合計6か所におけるMURC遺伝子変異をDCM患者さんから同定した。さらに、変異群p. S307TとP. N128KはDCMの家系内に有意に認め(p=0.003)、変異群p. P324Lは散発性のDCM3症例に存在し、うち一症例においてトロポミオシン-1の変異がp. M245Tにおいて認められた。

また、p. L232-R238の欠損変異が孤発的なHCM3症例に認められ、これらの症例はいずれもミオシン重鎖7の変異(p. L970V)を伴っていた。心筋症にまつわる他の臨床病態像として、MURCの変異をもつ4人の症例において、心不全が重篤化し心臓移植が実施された。

臨床病態像を裏付ける実験データとして、

新生児心筋細胞にMURC変異遺伝子を導入すると、野生型の心筋細胞に比べ、細胞内におけるRhoAの活性が低下し、心筋細胞の成熟過程が有意に阻害されていた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計10件)

1. Isodono K, Takahashi T, Imoto H, Nakanishi N, Ogata T, Asada S, Adachi A, Ueyama T, Oh H, Matsubara H. PARM-1 is an Endoplasmic Reticulum Molecule Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis in Rat Cardiac Myocytes. *PLoS ONE* 18(5):e9746 (2010). 査読有
2. Satomi-Kobayashi S, Ueyama T, Mueller S, Toh R, Masano T, Sakoda T, Rikitake Y, Miyoshi J, Matsubara H, Oh H, Kawashima S, Hirata K, Takai Y. Deficiency of nectin-2 leads to cardiac fibrosis and dysfunction under chronic pressure overload. *Hypertension* 54:825-831 (2009). 査読有
3. Takehara N, Tsutsumi Y, Tateishi K, Ogata T, Tanaka H, Ueyama T, Takahashi T, Takamatsu T, Fukushima M, Komeda M, Yamagishi M, Yaku H, Tabata Y, Matsubara H, Oh H. Controlled Delivery of Basic Fibroblast Growth Factor Promotes Human Cardiosphere-Derived Cell Engraftment to Enhance Cardiac Repair for Chronic Myocardial Infarction. *Journal of American College of Cardiology* 52:1858-1865 (2008). 査読有
4. Tateishi K, Takehara N, Matsubara

- H, Oh H. Stemming heart failure with cardiac- or reprogrammed-stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12(6A):2217-2232 (2008). 査読有
5. Harada K, Ogai A, Takahashi T, Kitakaze M, Matsubara H, Oh H. Crossveinless-2 controls bone morphogenetic protein signaling during early cardiomyocyte differentiation in p19 cells. *Journal of Biological Chemistry* 283:26705-26713 (2008). 査読有
 6. Asada S, Takahashi T, Isodono K, Adachi A, Imoto H, Ogata T, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. Downregulation of Dicer expression by serum withdrawal sensitizes human endothelial cells to apoptosis. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 295:H2512-2521 (2008). 査読有
 7. Tagawa M, Ueyama T, Ogata T, Takehara N, Nakajima N, Isodono K, Asada S, Takahashi T, Matsubara H, Oh H. MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein, is involved in the regulation of skeletal myogenesis. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 295:C490-498 (2008). 査読有
 8. Ogata T, Ueyama T, Isodono K, Tagawa M, Takehara N, Kawashima T, Harada K, Takahashi T, Shioi T, Matsubara H, Oh H. MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein that modulates the Rho/ROCK pathway, induces cardiac dysfunction and conduction disturbance. *Molecular and Cellular Biology* 28:3424-3436 (2008). 査読有
- [学会発表] (計 25 件)
1. Takehara N, Tsutsumi Y, Amano K, Oh H., Yaku H, Tabata Y, Matsubara H, Transplantation of autologous human cardiosphere-derived stem cells innovated via hydrogel surgical approach; the first-in-man clinical trial. *XX World Congress of International Society for Heart Failure*, 114:P-1-37-2 (2010. 5. 4).
 2. 王 英正 心筋再生医療が描く現在と未来 2010年循環器エキスパート合同ミーティング 岡山 (2010. 4. 12)
 3. 王 英正 小児心不全への細胞治療法の開発 第16回西日本小児がんセミナー 大阪 (2010. 2. 25)
 4. 王 英正 心血管再生医療の新たな臨床展開 第15回岡山血流改善研究会、岡山 (2009. 11. 5)
 5. Oh H. New Advances in Cardiac Cell Therapy. The 17th Asian Pacific Congress of Cardiology, Kyoto (2009. 5. 16)
 6. Oh H. New Developments in Cardiac Cell Therapy. 第73回日本循環器学会学術集会、大阪 (2009. 3. 12)
 7. Takehara N, Amano K, Takahashi T, Kawabe J, Oh H., Yaku H, Tabata Y, Hasebe N, Matsubara H. Cell Therapy Improves Cardiac Dyssynchrony and Reduces the Transmural Extent of the Ischemic

- Regions in Chronic Myocardial Infarction. 第73回 日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal* 73; PJ-335 (2009. 3. 12)
8. Takehara N, Tsutsumi Y, Amano K, Takahashi T, Yaku H, Tabata Y, Oh H, Hasebe N, Matsubara H. Cardiac Regenerative Hybrid-therapy Integrated via Human Autologous Cardiac Stem Cell and Biodegradable bFGF-incorporating Gelatin Hydrogel. 第73回 日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal* 73; SY-11-5 (2009. 3. 12)
9. Oh H. A novel hybrid cell therapy for cardiac repair. The 2nd Spring Cell Therapy Symposium, Korea (2008. 5. 14)
10. 王 英正 重症心不全に対する心臓内幹細胞の自家細胞移植による心筋再生医療 秋桜会学術懇話会、大阪 (2008. 4. 6)
11. 王 英正 ヒト心臓内幹細胞を用いた自家細胞移植による心筋再生医療 第7回日本再生医療学会総会 名古屋 (2008. 3. 18)
12. Takehara N, Tabata Y, Tsutsumi Y, Matsubara H, Oh H. Human cardiac stem cell biotherapy integrated with bFGF controlled-release: Two randomized, dose-ranging, controlled preclinical trials 第72回 日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal* 72; SY-12-3 (2008. 3. 15)

〔図書〕(計 13 件)

1. 王 英正 心筋幹細胞 循環器科特集 66 : 453-460 (2009)

2. 王 英正 新しい心臓再生法 Medical View Point: 3-4 (2009)
3. 竹原有史、服部玲治、松原弘明、王 英正 Cardiosphereによる心筋再生(分担) 中外医学社 Annual Review 循環器: 10-17 (2009)
4. 王 英正、立石健人、松原弘明 心臓内幹細胞の特性と自己複製制御機構 実験医学 増刊号 134 ; 100-106 (2008)
5. 王 英正 心臓組織内幹細胞を用いた心不全への心筋再生医療の現状 心電図 28: S-3-22-S-3-36 (2008)
6. 王 英正 Isl-1 前駆細胞 中外医学社 Annual Review 循環器 1 ; 8-15 (2008)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: 細胞移植治療に用いられる心疾患治療薬

発明者: 王 英正、竹原有史、田畑泰彦、松原弘明

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2008/068809

出願年月日: 2008 年 9 月 10 日

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://shin-iryo.jp/>

<http://cvs.icn.jp/shiniryo.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

王 英正 (OH HIDEMASA)

岡山大学・岡山大学病院・教授

研究者番号: 50372579