

令和元年6月25日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10221

研究課題名(和文) HMGB1蛋白過剰発現間葉系幹細胞移植を用いた心不全に対する再生医療の開発

研究課題名(英文) The development of cell therapy by transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing HMGB1 protein to heart failure

研究代表者

金子 政弘 (KANEKO, Masahiro)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40433346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、ラットから採取した幹細胞の一種である間葉系幹細胞に、心不全に対する細胞治療効果において重要な役割を果たしていると考えられるHMGB1タンパクを大量に分泌いつさせるように遺伝子操作をした間葉系幹細胞を確立し、それを心不全モデルラットに移植することでその治療効果の評価を行うことを目指していた。しかしながら、HMGB1タンパクを過剰に分泌する間葉系幹細胞の遺伝子操作に成功せず、本研究の目標を達成することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の仮説通りに、HMGB1タンパクを過剰に分泌するように遺伝子操作をした間葉系幹細胞が心不全を起こした心臓に移植されて、心機能の改善等の治療効果があったのならば、現在の心不全に対する幹細胞治療をもっと効果的な標準的な治療法として今後確立させることに役立つと思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, our aim was that we evaluated whether the transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing HMGB1 protein, which played a important role in the cell therapy to heart failure, had a therapeutic effect for heart failure model rats or not. we, however, failed to establish overexpressing HMGB1 protein to mesenchymal stem cells. Therefore, we could not achieve our aim in this study.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：心不全 再生医療 幹細胞治療 間葉系幹細胞 HMGB1タンパク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

慢性心不全は、虚血性心疾患、弁膜症、そして心筋症などの心疾患の臨床的末期像として、先進国の死因の上位を占めている。慢性心不全に対する治療としては、薬物療法、カテーテル治療、そして心臓手術などがあるが、慢性心不全では長年にわたる心筋に対する負荷により心筋そのものが障害を受けているため、どれも根本的治療とは言い難い。唯一の末期的心不全に対する根治的治療としては心臓移植があるが、donor 数の絶対的不足という問題が、これを標準的治療にするのを難しくしている。

心不全に対する骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells: MSCs) 移植療法は現在脚光を浴びている新しい治療法である。以前は、移植された MSC が心筋細胞に分化することによって、低下した心機能が改善されると考えられていたが、現在の概念としては、移植された MSC が成長因子、サイトカインなどを含む様々な因子を分泌することによって、障害を受けている心筋がさらなるダメージから保護され、回復する手助けとなると考えられている (paracrine effect) (Williams AR and et al., *Circ Res* 109: 923-940, 2011)。しかしながら、臨床試験の結果は、この新しい治療法は有望であるが、臨床に応用されるにはまだまだ色々な面での改良が必要であることが示唆されている。改良すべきである点の一つは、細胞移植の delivery method である。既存の移植方法として、静脈注入、冠動脈注入、そして心筋直接注入などがあるが、低い移植細胞の生着率などの原因から、治療効果はそれほど高くなかった (Cambell N and et al., *J Cardiovasc Transl Res* 5: 713-726, 2012) が、近年細胞シート法が開発され、それによって移植された MSC は既存の移植法よりも高い移植細胞の生着率および治療効果が、急性心筋梗塞モデルと慢性虚血性心不全モデルの両方で示された (Narita T and et al., *Mol The* 4: 860-867, 2013, Tano N and et al., *Mol The* 10: 1864-1871, 2014)。

また、もう一つの MSC 移植療法の治療効果の改善点として paracrine effect の面からのアプローチが挙げられる。paracrine effect に関しては、どの因子が key molecule であるかは、まだまだ未知であり、paracrine effect の詳細なメカニズムを理解することは、心不全に対する MSC 移植療法を実際に臨床応用するためにも重要である。もし、paracrine effect の key molecule が何であるのかが解明されれば、key molecule を過剰発現させた MSC を不全心に移植することにより、治療効果を既存の MSC 移植治療よりも増強させる可能性がある。

我々は、慢性心不全に対する幹細胞移植の治療効果のメカニズムの一つとして、心筋直接注入された移植細胞が細胞死を起こした際に放出される核タンパク質の一種である high mobility group box 1 (HMGB1) が炎症細胞の一つであるマクロファージを制御することによって心機能改善に寄与することを報告した (Kaneko M and et al., *Plos One* 8(10): e76908, 2013)。

さらには、虚血性心不全モデルに recombinant HMGB1 を心筋内に直接投与することによって、線維化の抑制、毛細血管の増加、そして炎症反応が抑制され、その結果として低下した心機能が改善されたことも報告されている (Takahashi K and et al., *Circulation*. 118 (14 Suppl) :s106-114, 2008)。

## 2. 研究の目的

上記の背景により、我々は HMGB1 が MSC の paracrine effect の key molecule の一つであると考え、MSC からの HMGB1 タンパクの分泌を増強すれば、MSC 移植療法の治療効果が増強されるという仮説を立てた。HMGB1 放出のメカニズムは、移植細胞が細胞死する際に、崩壊した核から放出されるという受動的な放出 (passive release) であり、過剰発現された HMGB1 が生存している移植細胞から積極的に分泌された場合にも治療効果が増強するのかはまだ明らかではない。

そこで我々は、passive release される HMGB1 を増強させるモデルとして、HMGB1 過剰発現 MSC の心筋内直接注入モデルを選択し、また HMGB1 を active secretion させるモデルとして、HMGB1 過剰発現 MSC の細胞シート移植モデルを選択し、HMGB1 放出もしくは分泌が増強されることによって、心不全に対する MSC 移植療法の治療効果が増強されるかどうかを評価することを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

rat から採取した MSC に HMGB1 タンパク過剰発現ベクターを遺伝子導入し、HMGB1 過剰発現 MSC 株を確立する。左冠動脈前下行枝を結紮することで人工的に作成した虚血性心不全ラットにその HMGB1 過剰発現 MSC を移植する。移植後 3 日目の細胞治療の効果を、組織学的に心筋細胞の変性や壊死や炎症細胞の集簇を評価し、また生化学的には発現している paracrine effect の因子の発現量を解析し、総合的に評価する。また細胞移植後 1 か月後には心エコーや左心カテテル検査を用いて、心機能の改善度を生理学的に評価する。

## 4. 研究成果

本研究の根幹をなす、HMGB1 過剰発現 MSC 株の樹立に成功せず、本研究の目的を遂行することができなかった。

## 5. 主な発表論文等

なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：岡村 吉隆  
ローマ字氏名：OKAMURA, Yoshitaka  
所属研究機関名：和歌山県立医科大学  
部局名：医学部  
職名：博士研究員  
研究者番号（8桁）：80245076

研究分担者氏名：本田 賢太郎  
ローマ字氏名：HONDA, Kentaro  
所属研究機関名：和歌山県立医科大学  
部局名：医学部  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：60508018

研究分担者氏名：湯崎 充  
ローマ字氏名：YUZAKI, Mitsuru  
所属研究機関名：和歌山県立医科大学  
部局名：医学部  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：80405448

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。