

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08734

研究課題名(和文) 抗炎症効果の高い間葉系幹細胞を微重力培養して用いた虚血心筋細胞の保護と再生

研究課題名(英文) Mesenchymal stem cell with anti-inflammatory effect cultured under microgravity prevents myocardial ischemia and regenerates myocardium.

研究代表者

黒崎 達也 (Kurosaki, Tatsuya)

広島大学・病院(医)・准教授

研究者番号：40448270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ラット心筋梗塞モデルに対する微重力で無血性培養した幹細胞による心筋保護効果に関する検討を行った。微重力培養とSTK2を利用した無血性培養の併用の至適条件を決定した。形態学的に均質化した間葉系幹細胞(MSC)の作成が可能であった。間葉系幹細胞数は、当初大量としていたが、費用対効果と血栓症と思われる合併症の回避のため、通常量が適切であると考えられた。通常培養よりも微重力培養した細胞の方が、左室駆出率を改善する可能性があると考えられたが、今回の結果からは明らかな有意差は出せなかった。Angiopoietinやpdgfcの変化を認め微重力培養細胞の血管新生に与える影響が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋の虚血障害は、心筋梗塞や不整脈、弁膜症から心不全を引き起こし、生活の質の低下や生命を危険性がある重篤な病態である。近年種々の幹細胞を利用した再生医療の研究が行われていが、iPSやESを用いた研究は進んでおり今後の成果が期待されるが、これらはその生物学的特性から癌化などの危険性が否定できない。自己の体から採取した細胞を微重力並びに無血性培地で培養し、心筋梗塞の程度の軽減や修復を行うことが出来ることは、同種あるいは異種移植という問題を回避できるため非常に魅力的かつ合理的である。本研究では、微重力ならびに無血性培養した細胞での心筋梗塞の改善の可能性を見出した。今後の検討の継続が必要である

研究成果の概要(英文)：We investigated the cardioplegic effect of stem cells cultured bloodlessly under microgravity on a rat myocardial infarction model. The optimum conditions for the combined use of microgravity culture and bloodless culture using STK2 were determined. It was possible to produce morphologically homogenized mesenchymal stem cells (MSCs). The number of mesenchymal stem cells was initially high, but was considered appropriate for cost-effectiveness and avoidance of possible complications of thrombosis. It was considered that cells cultured in microgravity may improve the ejection fraction of the left ventricle compared to normal culture, but no clear significant difference could be obtained from the results of this study. Changes in angiopoietin and pdgfc were observed, and the effect on angiogenesis of microgravity cultured cells was observed.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：間葉系幹細胞 心筋虚血 抗炎症作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年、多分化能を有する幹細胞を利用した再生医療が注目されている。心臓血管領域においても重症疾患の治療を目指して再生医療が試みられているが、未だ技術的に確立されていない。間葉系幹細胞(MSCs)は、*in vitro*、*in vivo*にて軟骨、骨、脂肪、筋組織などへの多分化能を有しているが、心筋細胞への分化も報告されている。そこで、「いかにして、MSCsを用いた心筋再生を達成するか」ということが問題として提起されている。実際の心筋再生への治療応用を目指すには、MSCsを未分化のまま維持増殖し、効率的に心筋細胞に分化させる方法の開発が必要である。以前より我々は、独自に開発した3次元模擬微小重力細胞培養装置(Gravite;(株)スペース・バイオ・ラボラトリー、広島、日本)を用いて骨髄間葉系幹細胞を培養すると、通常重力下(1G)の細胞培養に比べて未分化な骨髄間葉系幹細胞を大量に培養できることを示してきた。また、MSCによる抗炎症性に関する検討は、腹膜硬化症モデルによって行ってきたが、ラット腹膜硬化症モデルへMSCの投与を行ったところ、投与したMSCは障害を受けた腹膜中皮細胞へのマクロファージをはじめとする炎症細胞の浸潤を減少させることによって、線維化を抑制することを明らかにした(Ueno T, et al. *Kidney Int.* 84: 297-307, 2013)。さらに、幹細胞用の無血清培地:STK2 (DS Pharma Biomedical)を用いてMSCの増殖を100~1000倍にすることが可能であり、STK2を用いることで患者血清を使用せずに多量の細胞数のMSCをより短期間で準備することができる。またMSCをSTK2で培養すると、ウシ血清含有培地で培養したMSCよりも活性化T細胞の細胞増殖を抑制できることから、MSCの有する抗炎症効果が増強していることを示した。また、虚血に関する研究としては、大動脈遮断時の脊髄虚血の予防法に関する研究も行ってきた。術中の脊髄虚血障害を軽減させるためのケミカルシャペロンであるトレハロース(Takahashi; *J Vasc Surg*, 2011)やsodium 4-phenylbutyrate (4-PBA)の保護効果を報告した。小胞体ストレスの軽減する4-PBAの大動脈内注入では、脊髄虚血再灌流における、小胞体ストレスに誘導されるアポトーシスの抑制を示した。(Mizukami, Takahashi; *J Vasc Surg*, 2010)。これらを総合的に利用することにより、心筋虚血および心筋梗塞に対する予防および治療法の開発を検討することとした。

## 2. 研究の目的

大量のMSCが傷害を受けた心筋に生着することにより、より効果的に抗炎症作用を発揮し、かつ心筋細胞のアポトーシスを抑制するかを評価すること目的とする。心筋虚血に対して微重力あるいはSTK2無血清培地で培養したMSCの有用性を検討する。そして、仮説として、虚血心筋に対する間葉系幹細胞の効果がアポトーシスの抑制にあるのではないかとした。MSCの培養に無血清培地STK2を用いることで、患者からの血清の採取が不要になり、また、微重力培養することにより未分化な状態を保ち、心筋細胞への分化の可能性も残されるため、臨床応用での期待が大きい研究となると考えた。

## 3. 研究の方法

### 1. 微重力下での無血清培地STK2を用いたMSCの大量増殖の至適条件

微重力培養とSTK2を利用した無血清培養の併用の至適条件を検討する。STK2は初代継代よ

り継続して使用する。微重力培養のタイミング(細胞数、継代数、培養期間)に関して検討を行う

2. 心筋虚血ラットに大量に無血清微重力培養した **MSC** を投与することによる脊髄保護作用、特に抗炎症作用ならびにアポトーシスの抑制作用を示すかを検討する。SD ラット・オス 10 週令を用いて、冠動脈前下行枝を結紮することにより心筋虚血モデルを作成する。麻酔は 2%セボフルレンにてマスク換気により行う。左開胸にて心臓を露出し、左心耳前方にて前下行枝を結紮する。虚血 30 分後に、心尖部より別途準備した **MSC** あるいは **PBS** を注射する。創部を閉鎖し麻酔を中止する。**MSC** は 5 週齢のラット大腿骨、脛骨より採取した骨髄細胞を培養、継代する。**MSC** を 1 個体あたり  $1 \times 10^7$  cells 投与する。**MSC** 投与後 3, 7, 14 日目に組織障害の程度を判定し、群間比較する。炎症性サイトカイン(**TNF**、**IL-1**、**CD68**、**MCP-1**、**CD3**)、**IGF-1**(**PI3K/Akt** シグナル伝達系)の発現を免疫組織化学的評価にて行い、マクロファージおよび T 細胞の浸潤がどの程度抑制されるかを検討する。アポトーシス関連蛋白(**Survivin**, **Bcl-2**, **Bax**)の発現変化を免疫染色と **PT-PCR** 法にて確認する。我々は脊髄虚血モデルに対して投与した **MSC** の生着を、**GFP** ラットより採取した **MSC** を用いて確認しており、**MSC** は何日目まで生着しているか、**MSC** 投与後 1, 3, 7, 10, 14 日目に検討する

#### 4. 研究成果

ラット心筋梗塞モデルに対する微重力で無血性培養した幹細胞による心筋保護効果に関する検討を行った。微重力培養と **STK2** を利用した無血性培養の併用の至適条件を決定した。形態学的に均質化した間葉系幹細胞 (**MSC**) の作成が可能であった。細胞数に関しては、骨髄から採取する細胞数を増やせば大量に培養することは可能であったが、**preliminary** な実験を通じて、1)費用対効果が適切ではないと判断したことや、2)将来的な臨床応用を考えてヒト脂肪由来間葉系幹細胞大量の投与をラット心筋梗塞モデルに行うと、早期死亡を来し、その原因として塞栓症を起こしている可能性が高いと考えられたため、通常の細胞数での検討を継続することとした。また、今回の実験に際して、抗炎症作用を複合させる結果を見出すことが困難と判断したため、微重力の効果を重点的に研究することとした。

心筋梗塞ラットに微重力培養した **MSC** を投与することによる心筋保護作用ならびにアポトーシスの抑制作用を検討した。微重力培養細胞投与群 (**MSC-MG** 群)、通常培養細胞投与群 (**MSC-1G** 群)、**PBS** 投与群 (**PBS** 群)、**sham** 群の 4 群にて比較検討した。投与心筋梗塞ラットの作成は、左肋間開胸、心膜切開にて心臓を露出し、左心耳右縁の心筋に 7 - 0 プロリンにて前下行枝の結紮による心筋梗塞を作成した。前下行枝領域の梗塞モデルを作成し、心エコーにて心機能評価を行った。心エコーでの評価では、術後 7 日目での左室駆出率は、**MSC-MG** 群が **MSC-1G** 群及び **PBS** 群よりも良い傾向が認められた。心筋梗塞モデルの不安定性から 4 群の投与前および投与後状態の均一化が十分に図ることが出来ず、特に、生存したラットの一部では冠動脈結紮後も心機能が良好な場合もあり、このような除外すべき例が多く発生する点が問題であった。組織学的検討では、心筋梗塞部位における機能的毛細血管開通率は、**MSC-MG** 群で高い傾向があり、微重力培養細胞の血管新生に与える影響が認められた。**VEGFs** 発現に関しては有意差を認めなかったが、**angiopoietin** や **pdgfc** の変化を認められた。炎症性サイトカイン並びに白血球表面抗原の検討では、明らかな有差を認める結果は得られず、このあたりもモデルの問題があるものと考えられた。**MSC** の生着に関しては、明らかな生着を認めておらず、以前からの報告にもある通り、**paracrine** 的

効果が主体となっているものと考えられたが、引き続き検討を継続する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Naoki Ishiuchi, Ayumu Nakashima, Shigehiro Doi, Ken Yoshida, Satoshi Maeda, Ryo Kanai, Yumi Yamada, Takeshi Ike, Toshiki Doi, Yukio Kato, Takao Masaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells prevent renal fibrosis and inflammation in ischemia-reperfusion rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Res Ther .	6. 最初と最後の頁 130,144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-020-01642-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurose T, Takahashi S, Otsuka T, Nakagawa K, Imura T, Sueda T, Yuge L	4. 巻 41
2. 論文標題 Simulated microgravity-cultured mesenchymal stem cells improve recovery following spinal cord ischemia in rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Res	6. 最初と最後の頁 1, 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2019.101601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shinya Takahashi, Tomoyuki Kurose, Kei Nakagawa Keijiro Katayama, Tatsuya Kurosaki, Yumi Kawahara, Louis Yuge, Taijiro Sueda
2. 発表標題 Simulated microgravity culture enhances the neuroprotective effects of mesenchymal stem cells in spinal cord ischemia.
3. 学会等名 日本胸部外科学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	末田 泰二郎  (Sueda Taijiro)  (10162835)	広島大学・医系科学研究科(医)・名誉教授   (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	弓削 類 (Yuge Rui)  (20263676)	広島大学・医系科学研究科(保)・教授  (15401)	
研究分担者	中島 歩 (Nakashima Ayumu)  (40448262)	広島大学・医系科学研究科(医)・共同研究講座教授  (15401)	
研究分担者	高橋 信也 (Takahashi Shinya)  (70423382)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授  (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関