

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591628
 研究課題名（和文） メカニカルストレスが心筋再生に及ぼす影響と
 その分子・細胞学的機序の解明
 研究課題名（英文） The role and relative mechanisms of hemodynamic loading
 in myocardial repair
 研究代表者
 美甘 章仁（MIKAMO AKIHITO）
 山口大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号：30372709

研究成果の概要：心臓がポンプ臓器であるが故に常に被るメカニカルストレスが心筋再生に悪影響を及ぼすと仮説を立て、検証を行った。マウス心筋梗塞作製後に梗塞心を摘出し、別マウスの腹腔内に異所性心移植を行い、メカニカルストレス軽減モデルを作製した。対照群と比較して、壁厚が保たれ、梗塞面積も縮小していた。また、細胞増殖の増加やアポトーシスの減少、障害心筋内への幹細胞集積が認められた。以上から、メカニカルストレス軽減が心筋再生を促すことが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：メカニカルストレス、心筋再生、細胞増殖、アポトーシス、心筋幹細胞

1. 研究開始当初の背景

従来、心臓は、皮膚・肝臓・筋肉などの他の臓器と異なり再生できない臓器と考えられてきた。しかし、近年、成人心筋でも細胞増殖が認められ、心筋幹細胞が存在することが報告された。さらに、その増殖能は心不全や梗塞が生じた心筋で増加していることがわかった。これらの報告から、心臓は他の臓器と同様に自己再生修復機能を備えていると考えられる。しかし、心筋梗塞等によって心筋が傷害された心不全患者において、心筋の自己修復再生から心機能回復へ至る症例は一般的に存在しない。その原因の1つとして、心臓がポンプ臓器であるが故に常に被るメカニカルストレスが心筋再生に悪影響を及

ぼすのではないかと推測した。興味深いことに、近年、末期心不全の患者に補助心臓装置 left ventricular assist device (LVAD) を装着することで心機能が改善し、LVAD から離脱できる症例が多数報告されている。LVAD 装着による心機能回復の詳細な機序については不明である。しかしながら、我々は、LVAD 補助により心室のメカニカルストレスが軽減されることによって、心筋再生が促されるのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、メカニカルストレスが心筋再生に与える影響について調べ、その分子・細胞学的機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス心筋障害モデル作製と心臓移植 10 週齢 C57BL/6 マウスを用いて心筋梗塞モデルを作製し、60 分後に以下の 2 群に分けた。
移植群 (unloading 群) : donor として梗塞心を摘出し、それを別のマウスの腹腔内へ異所性に心移植を行った。梗塞心の冠血流は保たれたまま、メカニカルストレスがかからない状態で拍動する (図 1)。
対照群 (loading 群) : 心筋梗塞を作製後、Sham 手術 (開腹) のみを行った。梗塞心はメカニカルストレスがかかった状態で拍動する。

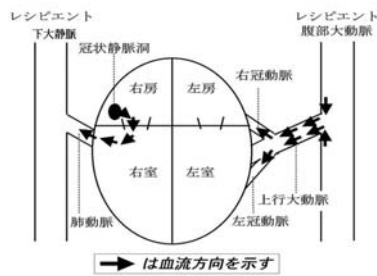


図1. 移植心臓モデルの血行動態

(2) 標本採取と形態学的評価

心筋障害モデル作製後 3、7、14、28 日目に、unloading 群および loading 群のマウスの梗塞心を標本用に採取した。心臓の心室以外はすべて切除した後、心室のみの重量を測定した。また、心室の形態学的評価を行うために、約 1.5mm 間隔で横断面を 5 切片作製した。さらに、凍結切片作製のために、梗塞心を OCT compound に包埋し液体窒素に入れた後、-80°C で凍結保存した。

(3) 心筋障害の組織学的評価

凍結切片 (5 μm) を作製し、組織学的評価を行った。左室の壁厚と梗塞範囲の測定は、それぞれヘマトキシリン-エオシン染色とアザン染色を行い、イメージアナライザーを用いて定量評価した。各値は、5 切片以上の測定の平均値とした。

(4) 梗塞心での細胞増殖とアポトーシスの定量評価

細胞増殖能は、phycoerythrin (PE) 標識 Ki-67 抗体による免疫染色により評価した。細胞のアポトーシスは、TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling) 法により評価した。核染色は、蛍光色素 DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindol) にて行った。蛍光顕微鏡下 (×400 倍) で単位視野内の陽性細胞数を計測し、20 視野の平均を陽性細胞数とした。

(5) 梗塞心内の心筋幹細胞数と Stromal cell-derived factor (SDF)-1 の発現の評価

梗塞心内の幹細胞数の評価は、PE 標識 c-kit、sca-1 抗体による免疫染色にて行った。蛍光顕微鏡下 (×400 倍) で単位視野内の陽性細胞数を計測し、20 視野の平均値とした。さらに、幹細胞動員における重要な因子の一つであるケモカイン SDF-1 の発現を免疫染色によって評価した。

4. 研究成果

(1) 梗塞心での心筋再生

心筋梗塞作製後 28 日目の標本で梗塞心の形態学的評価を行った。梗塞心の左室壁は loading 群では薄くなり、白色の癒痕組織となっていた (図 2)。一方、unloading 群では、心筋梗塞部の左室壁は loading 群と比較して明らかに厚くなり (図 2)、内腔側に残存心筋がはっきりと確認された (図 3)。

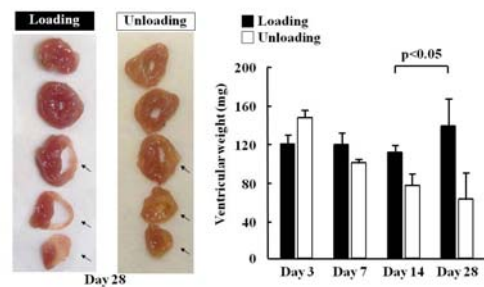


図2. 梗塞心の形態学的変化

左室の重量が unloading 群ではメカニカルストレスがなくなり心臓が萎縮するためと思われるが、徐々に軽くなった (図 2)。loading 群では最初の 2 週間は変化を認めなかったが、28 日目では増加した (図 2)。これはメカニカルストレスがかかることで心不全を生じ、代償性肥大を起こしたことによると考えられる。定量評価では梗塞心の左室壁は、loading 群と比較して unloading 群の方が有意に厚く (図 3)、梗塞範囲も縮小していた (図 4)。

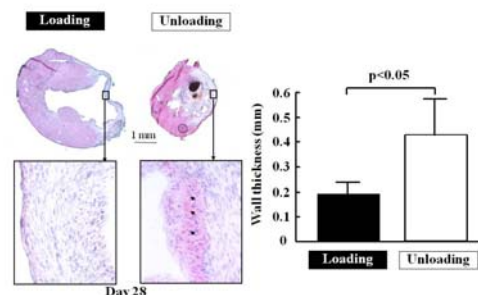


図3. 左室壁の厚さ

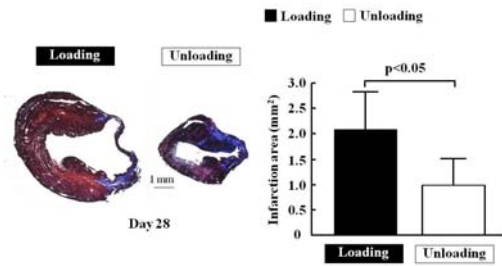


図4. 梗塞面積

(2) 梗塞心での細胞増殖能とアポトーシスの評価

梗塞作製後 3、7 日目の標本を用いて、増殖能とアポトーシスを評価した。測定は梗塞と正常な心筋の境界領域で行った (図 5)。梗塞作製後 7 日目の Ki-67 陽性細胞数は、loading 群と比較して、unloading 群の方が有意に多かった ($P < 0.05$)。しかし、梗塞作製後 3 日目では明らかな差は認められなかった ($P = 0.12$)。一方で、アポトーシスを起こしている TUNEL 陽性細胞数は、梗塞作製後 3、7 日目共に、loading 群よりも、unloading 群で有意に少なかった ($P < 0.05$)。

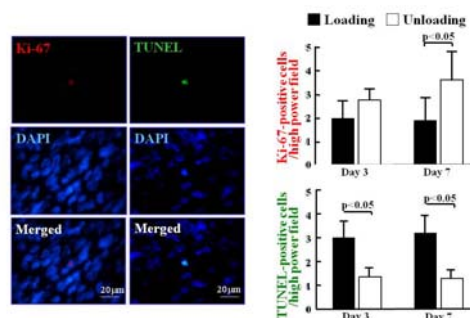


図5. 細胞増殖とアポトーシス

(3) 梗塞心における心筋幹細胞と SDF-1 の発現

梗塞作製後 3、7 日目の標本を用いて、障害心筋内への幹細胞動員を評価した。c-kit 及び Sca-1 陽性細胞の定量は最も陽性数の多く認められた梗塞領域と正常な心筋の境界領域で行った (図 6)。梗塞作製後 7 日目には、unloading 群における c-kit 陽性幹細胞数は loading 群と比較して有意に多かった ($P < 0.05$)。しかし、梗塞作製後 3 日目には有意な差は認められなかった ($P = 0.28$)。同様に、梗塞作製後 7 日目における Sca-1 陽性幹細胞数も loading 群と比較して、unloading 群で有意に多かった ($P < 0.05$)。しかし、3 日目では多い傾向があるのみであった ($P = 0.10$)。また、免疫染色にて SDF-1 の発現を検討したところ、主に梗塞と正常な心筋

の境界領域で認められた。また、SDF-1 の発現は loading 群よりも、unloading 群で強く発現していた。

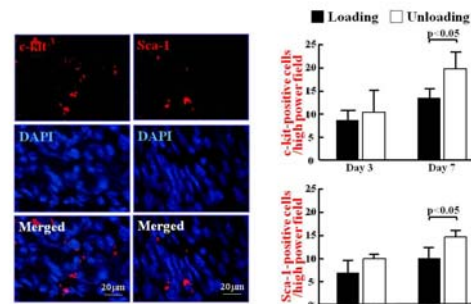


図6. 心筋幹細胞数

(4) 結語

本研究成果として、メカニカルストレスを減らすことにより、心筋障害が軽減されることが示唆された。その作用機序として、細胞増殖の増加と共に、アポトーシスの減少が認められた。また、障害心筋内への幹細胞の集積が増大することも明らかとなった。

本研究の遂行によって、メカニカルストレスが心筋再生に及ぼす影響を明らかにすることができ、心臓における自己再生修復過程に対する理解を深めることができたと考えられる。さらに、心筋再生を促す治療として、障害心筋のメカニカルストレス軽減が新たな治療戦略になり得ることを提示する結果となった。

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 6 件)

- ① Kamota T, Li TS, Morikage N, Murakami M, Ohshima M, Kubo M, Kobayashi T, Mikamo A, Ikeda Y, Matsuzaki M, Hamano K. Ischemic pre-conditioning enhances the mobilization and recruitment of bone marrow stem cells to protect against ischemia/ reperfusion injury in the late phase. J Am Coll Cardiol. 2009; 53(19): 1814-22. (査読有)
- ② Li TS, Takahashi M, Ohshima M, Qin SL, Kubo M, Muramatsu K, Hamano K. Myocardial repair achieved by the intramyocardial implantation of adult cardiomyocytes in combination with bone marrow cells. Cell Transplant. 2008; 17(6): 695-703. (査読有)

- ③Suzuki R, Li TS, Mikamo A, Takahashi M, Ohshima M, Kubo M, Ito H, Hamano K. The reduction of hemodynamic loading assists self-regeneration of the injured heart by increasing cell proliferation, inhibiting cell apoptosis, and inducing stem-cell recruitment. J Thorac Cardiovasc Surg. 2007; 133(4): 1051-8. (査読有)
- ④Li TS, Murakami M, Kobayashi T, Shirasawa B, Mikamo A, Hamano K. Long-term efficacy and safety of the intramyocardial implantation of autologous bone marrow cells for the treatment of ischemic heart disease. J Thorac Cardiovasc Surg. 2007; 134(5): 1347-9. (査読有)
- ⑤Li TS, Mikamo A, Takahashi M, Suzuki R, Ueda K, Ikeda Y, Matsuzaki M, Hamano K. Comparison of cell therapy and cytokine therapy for functional repair in ischemic and nonischemic heart failure. Cell Transplant. 2007; 16(4): 365-74. (査読有)
- ⑥Li TS, Suzuki R, Ueda K, Murata T, Hamano K. Analysis of the origin and population dynamics of cardiac progenitor cells in a donor heart model. Stem Cells. 2007; 25(4): 911-7. (査読有)

[学会発表] (計4件)

- ①Kamota T, Li TS, Morikage N, Murakami M, Ohshima M, Kubo M, Kobayashi T, Mikamo A, Hamano K. Ischemic preconditioning enhances the mobilization and recruitment of bone marrow stem cells to protect against ischemia/reperfusion injury in the late phase
American Heart Association
Scientific Sessions 2008
2008.11.10 New Orleans (U.S.A.)
- ②李 桃生, 鴨田隆弘、佐藤正史、村上雅憲、小林俊郎、白澤文吾、美甘章仁、濱野公一
自己骨髄細胞を用いた血管再生療法の治療効果に及ぼす因子の探索
第38回日本心臓血管外科学会学術総会
2008.2.20. 福岡
- ③鈴木 亮、李 桃生、村上雅憲、小林俊郎、白澤文吾、美甘章仁、濱野公一
障害心筋における圧容量負荷の軽減は心筋再生を促す
第91回日本循環器学会中国地方会
2007.12.1. 米子
- ④李 桃生、鈴木 亮、村上雅憲、小林俊郎、

白澤文吾、伊東博史、美甘章仁、濱野公一
心不全に対する自己骨髄細胞を用いた再生医療：臨床長期成績と心筋再生への展望
第107回日本外科学会定期学術集
2007.4.11 大阪

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

美甘 章仁 (MIKAMO AKIHITO)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30372709

(2) 研究分担者 (2007年度)

李 桃生 (LI TAO-SHENG)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50379997

(3) 連携研究者 なし