

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03738

研究課題名(和文) 輸送幹細胞の肺組織内集積反応により遊出される心筋再生促進因子の同定と実用化研究

研究課題名(英文) Cardiosphere-derived cells preconditioned lung macrophages to induce immune tolerance in the remote stressed heart

研究代表者

王 英正 (Oh, Hidemasa)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：50372579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：心臓内幹細胞の全身投与によって、移植した細胞が停留した肺組織内から、心臓組織の修復に最も関与する複数のmicroRNA (miR)を同定した。うち、miR-21、miR-221およびmiR-217は、ラット単心室や肺動脈絞扼術による右心負荷モデルにおいて、モデル構築後6時間までに最も顕著に上昇することを確認した。また、これらのmiRの発現上昇度はCX3CR1依存性であり、miR-217はmiR-21/221を介して制御され、単心室ラットの生存予後の改善ならびに肺高血圧症による心室筋組織の線維化抑制に対して、細胞移植療法と同様の治療効果があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により導かれた成果として、miR-21/miR-221/miR-217のin vivo導入することで、単心室ラットの生存予後の改善ならびに肺高血圧症による右心負荷がもたらす心室筋組織の線維化抑制に対して、細胞移植療法と同様の治療効果があることを明らかにした。今後、次世代の細胞フリーの心筋組織修復法として、今後、単心室症症例に対する臨床研究の実施を目指し、基盤技術開発をさらに発展させていく。

研究成果の概要(英文)：Intravenously administered cardiosphere-derived cells (CDCs) engraft only transiently in recipient heart, but confer long-term therapeutic benefits in patients with heart failure. We demonstrated that intravenous injection of CDCs in single ventricle models preconditioned lung resident macrophages toward an immune regulatory phenotype in a Cx3cr1-dependent manner. The lung macrophage primed by lodged CDCs expressed high levels of miR-21, miR-221, and miR-217, and exhibited antifibrotic activities in volume loading heart. Adoptive transfer of either miRs prevented myocardial fibrosis and extended the life-span in the animal models of single ventricle; however, deletion of either of these miRs failed to attenuate the immune responses and inflammation in the stressed heart. Our results suggest that transplanted CDCs lodged in the lung may directly stimulate the endogenous macrophages within the engrafted lung to induce innate immune tolerance for functional recovery in the remote heart.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心臓内幹細胞 単心室 マクロファージ マイクロRNA 肺高血圧症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 小児発症の拡張型心筋症や構造異常による心臓奇形といった先天性心疾患は、診断後の薬物治療や心臓手術法の進歩により経年的に死亡率は低下しているが、成人後の遅発性心不全や術後合併症の罹患率は逆に年々増加の一途である(*Circ Res.* 2017;120:1353)。一方、これまで我々が開発してきた小児心不全に対する細胞治療法の第 1/2 相臨床研究により、冠動脈注入法の技術的安全性と治療有効性が確認され、さらに中長期死亡率と術後合併症の発生が有意に低下することが明らかとなった(*Circ Res.* 2015;116:653; *Circ Res.* 2017;120:1162; *Circ Res.* 2018;122:994)。

(2) 冠動脈注入法においても移植した細胞の多くが心臓組織よりも肺や肝臓といった他臓器に流出することが報告されており(*Stem Cell Res Ther.*2010;1:4)、臨床的に実質的な心筋再生医療法の治療機序は未だ不明である。特に移植した細胞のうち最もロジックする近接臓器である肺組織自身を介した paracrine 効果の検討が極めて重要であり、我々が報告してきた IGF-1 や HGF 以外の新たな心筋再生促進因子を同定できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

(1) 心筋再生医療に関する作用機序解析法として、これまでの研究では、移植に用いる幹細胞自身の特性や細胞機能解析が主たる注目点であった(*Circ Res.*2017;120:816)。本研究では、冠動脈注入法によって移植した細胞でも大部分が肺組織内に生着していることに着目し、新たに確立した単心室動物モデルを用いて、経静脈的に移植した心臓内幹細胞とロジックした肺組織間との反応により、肺組織内から遊出される exosome を含む各種液性因子を網羅的に検索し同定することで、小児心不全に対する細胞フリーの新たな心臓再生医療法を開発する。

(2) 本研究では、低侵襲で普及性の高い心臓再生医療の開発を目指し、以下の 3 項目を研究目的とする。新たに確立した単心室循環モデルに対し心臓幹細胞静脈内投与による予後改善効果の検討。静脈内投与された幹細胞と反応し肺組織内から分泌される心臓再生促進因子の網羅的検索。同定した心臓再生促進因子の静脈内投与による単心室循環不全心における機能改善の検討。

### 3. 研究の方法

#### (1) 2019年度

新たな手術法により確立したラットおよびブタ単心室循環モデルに対する心臓内幹細胞の経静脈的注入法による生命予後改善効果の検討。

正常の2心室心ならびに単心室心のラットに、培地もしくは $1.0 \times 10^6$ /kg個の心臓内幹細胞を静脈内に注入後12時間目に心臓と肺組織を採取し、Agilent Array発現解析による網羅的遺伝子検索を行う。Real-Time RT-PCR法を用いて、正常心で培地もしくは細胞移植で有意に変化した遺伝子群を抽出し、この候補因子群に対して、2次スクリーニングとして単心室心モデルにおいても同様に有意な変化を示した遺伝子群に最終的に絞る。

#### (2) 2020年度

絞り込まれた候補遺伝子群のうち、最も発現変化度が上昇した遺伝子に焦点を当てて、以下の実験を進めていく。

線維芽細胞をnegative controlとして、候補遺伝子が心臓内幹細胞特異的に発現していることを mRNA レベルで確認する。

候補因子を特異的に抑制する siRNA、非特異的 siRNA およびリコンビナント蛋白を単心室ラットモデルに投与し、単心室症に伴う心筋線維化マーカーの指標として、Col3, MMP9,  $\alpha$ -SMA, TIMP1 ならびに TNF- $\alpha$  に対する特異的発現抑制効果について mRNA で検討する。

#### (3) 2021年度

候補因子のリコンビナント蛋白をラット単心室モデルに投与して、病理組織上の心筋組織線維化抑制効果を確認する。

ラット単心室モデルにおけるリコンビナント蛋白処置による駆動心室機能の向上や生命予後の改善効果について検討する。

ブタ単心室モデルに応用し、製品としての実用化展開を進める。

### 4. 研究成果

(1) 単心室ラット/マウスおよび単心室循環のブタモデルに対し、心臓内幹細胞(CDCs)の経静脈的全身投与により、両モデル動物における生命予後に約 50%程度の延伸を確認した。心エコー法による移植前後における心室機能計測では、心室駆出率に有意な変化はないものの、心筋組織の線維化

領域の縮小効果を認めた。また、病理組織解析により、Col3, MMP9,  $\alpha$ -SMA, TIMP1 を含む各種線維化マーカーの有意な低下を確認した。

(2) CDCs 移植に関する心室機能改善の分子生物学的機序を探索するため、正常心ならびに単心室マウス由来の心臓及び肺組織を採取し、CDCs 由来 exosomes、心臓内線維芽細胞由来 exosomes との比較検討目的で、RNA-sequencing 解析を行った。CDCs 由来 exosomes は他の組織臓器に比べ、miR-155 及び miR-146a-5p の時相特異的な上昇を認めた。一方、肺組織内に集積した CDCs により、肺組織では、miR-21, miR-221, miR-217 の段階的で有意な上昇を確認した。これら 3 つの miR は非移植群及び正常心と比較し、有意的な上昇値を示したことから、単心室心における低酸素状況での心筋組織修復に関わる重大な miR であることが示唆された。

(3) 次に、我々は移植された CDCs が最も集積する肺組織内で高発現する miR-21, miR-221, miR-217 に注目し研究を進めた。まず、肺組織内のどの起源細胞から放出された miR であるかを検討するため、マクロファージを経時的に追跡できる Cx3cr1-CreERT2 と交配した Rosa26-loxp-STOP-loxp-TdTomato リポーターマウスを用いて、肺組織内における Cx3cr1 陽性細胞の分布量を解析した。驚くことに、RNA-sequencing で検出した上記 3 つの miR は正常心ならびに単心室心マウスモデルの肺組織では Cx3cr1 陽性細胞の発現量に関する相対的な上昇はなく、CDCs 移植した肺組織内のみ有意に高頻度で検出された。さらに、Cx3cr1 陽性細胞は肺組織の線維化領域特異的に発現上昇しており、細胞移植に伴う肺局所組織の損傷や炎症が惹起され、マクロファージの極性制御システムに autocrine/paracrine 機構が強く発動する契機になったことが推察される。

(4) また、タモキシフェン誘導型 Cx3cr1 欠損マウスでは、CDCs 移植による単心室心マウスにおける心室筋の線維化抑制と生命予後延伸効果はなく、肺組織内に集積した CDCs が局所内マクロファージを刺激することで、心筋保護因子を放出していることが示唆された。同様の *in vivo* 確認実験として、TNF- $\alpha$  刺激した Cx3cr1 欠損マウスにおいても、心室筋の線維化の増悪が観察され、心臓及び肺組織における内在性マクロファージを介した paracrine 保護効果が強く示唆された。

(5) 次に、ヒトマクロファージである THP-1 細胞を用いて、各種刺激による *in vitro* 実験を行った。THP-1 細胞は、LPS 刺激において、miR-155 の早期上昇と miR-146a-5p の晩期上昇を惹起し、TNF- $\alpha$  ならびに PDGF- $\alpha$  刺激では、miR-21/miR-221 の早期上昇と miR-217 の晩期上昇を認めた。一方、これら 3 種の miR 機能をより詳細に解析するため、ヒト心筋細胞株である AC-16 細胞を用いて解析した。TNF- $\alpha$  刺激による心筋細胞死の誘導は miR-21, miR-221 ならびに miR-217 mimic で抑制され、一方、それぞれの antagomir によって細胞死が増大することから、miR-21/miR-221/miR-217 は心筋保護作用を持つ miR-axis であることを明らかにした。

(6) *in vivo* における miR 機能においても、上記それぞれの miR 欠損マウス用いて、単心室心モデルを作成し詳細に検証した。まず、CDCs 移植した miR-21 および miR-221 欠損単心室心マウスにおいて、右心負荷に伴う心筋細胞死や組織線維化は細胞移植で抑制されず、抗炎症性 miR-217 の後期上昇も認めなかった。また、miR-217 欠損マウスでは、TNF- $\alpha$  や PDGF- $\alpha$  の過剰な発現上昇と心室筋組織内での collagen の貯留と線維芽細胞の増殖を認めた。これらのデータから、移植細胞がロッジした肺組織内において、既存のマクロファージを直接刺激することで、二相性の炎症惹起および組織修復を司る一連の miR の自律的な発現調節過程が連続的に生じていることを明らかにした。

(7) 本研究成果によって、新たに同定した肺組織内マクロファージにより分泌される miR-217 は miR-21/221 を介して制御されており、*in vivo* 導入することで、大型モデル動物や単心室症症例に向けた臨床実用化研究を進めた。全身投与による off-target 効果を鑑みて、心筋細胞に高発現する miR-1 を guide として、相補的結合を持つ pre-miR-1 を設計し、発現調節する miR-21/miR-221/miR-217 とともに Crispr/dCas9 システムを活用して、VPR を含む lentivirus vector に組み換え後、pVSV-G packaging vector に組み込み、lentivirus-Crispr-dCas9-miR-221/miR-221/miR-217 の作成に成功した。

(8) 単心室の小型及び大型モデル動物における生存予後の改善ならびに肺高血圧症による右心負荷がもたらす心室筋組織の線維化抑制に対して、細胞移植療法と同様の治癒効果があることを明らかにした。今後、次世代の細胞フリーの心筋組織修復法として、臨床研究開発をさらに発展させていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Hirai K., Ousaka D., Fukushima Y., Kondo M., Eitoku T., Shigemitsu Y., Hara M., Baba K., Iwasaki T., Kasahara S., Ohtsuki S., Oh H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Cardiosphere-derived exosomal microRNAs for myocardial repair in pediatric dilated cardiomyopathy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Transl Med	6. 最初と最後の頁 eabb3336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scitranslmed.abb3336	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 平井健太、王英正	4. 巻 3
2. 論文標題 Stem cellを用いた治療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 小児科	6. 最初と最後の頁 126-129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 4件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 王 英正
2. 発表標題 小児心不全に対する再生医療のupdate
3. 学会等名 日本再生医療学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 王 英正
2. 発表標題 Cardiosphere-derived cells in congenital heart disease
3. 学会等名 日本循環器学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 王 英正
2. 発表標題 Clinical Translation of Cell Therapy for Congenital Heart Disease
3. 学会等名 国際遺伝子細胞治療シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 王 英正
2. 発表標題 小児心不全に対する再生医療
3. 学会等名 日本心臓病学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 王 英正
2. 発表標題 The Impact of Inferior Vena Cava Banding to Improves the Survival of a Novel Fontan Failure Model in Piglet.
3. 学会等名 European Society of Cardiology.（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 王 英正
2. 発表標題 Exosomes Mediate Myocardial Regeneration of Cardiac Progenitor Cells in a Swine Model of Dilated Cardiomyopathy.
3. 学会等名 European Society of Cardiology.（国際学会）
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------