

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390069

研究課題名(和文) 心筋組織修復・再生における幹細胞のダイナミクスと、サイトカインによる細胞運命制御

研究課題名(英文) Dynamics of cardiac stem cells in myocardial repair/regeneration and regulation of their cell fate by cytokines

研究代表者

藤尾 慈 (FUJIO YASUSHI)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：20359839

研究成果の概要(和文)：心筋組織は、従来、修復・再生能が極めて低い組織と考えられてきた。近年、心筋組織の中にも多分化能を有する幹細胞が存在することが明らかになったが、心筋組織内での分化制御機構、および、細胞動態に関する知見は十分には得られていない。本研究では、心筋組織幹細胞が、IL-6 ファミリーサイトカイン刺激により血管内皮に分化すること、そのメカニズムとして STAT3 の活性化を介したタンパクキナーゼ Pim-1 の発現誘導が重要であることを、培養細胞レベル、生体レベルで明らかにした。

研究成果の概要(英文)：So far, cardiac regenerative activity has been believed to be trivial; however, recent studies have demonstrated that pluripotent stem cells exist in myocardium. In this study, we addressed the molecular mechanisms of cardiac stem cell differentiation and examined the cellular dynamics of the cardiac stem cell-derived endothelial cells in infarct myocardium. And we found that IL-6 family cytokines induce endothelial differentiation from cardiac stem cells through STAT3/Pim-1 pathway both in vitro and in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：組織幹細胞、サイトカイン、心筋リモデリング、細胞運命、心臓

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまで心筋組織における IL-6 関連サイトカインの役割に関する研究を行い、以下のことを明らかにしてきた；

(1)心筋細胞に虚血や伸展刺激などのストレスが課せられると、leukemia inhibitory factor (LIF)、あるいは cardiotrophin-1 (CT-1)といった IL-6 family cytokines が分

泌される(Biochem. Biophys. Res. Comm. **264**, 436; J. Mol. Cell. Cardiol. **32**, 1275)。

(2)LIF、CT-1 は、心筋細胞に作用し、PI3 kinase/Akt、ERK、STAT のシグナルを活性化する(Circulation **94**, 2626; J. Biol. Chem. **273**, 9703)。

(3)Akt は、IGF と同様に細胞死を抑制する(Circulation **101**, 660; Circulation **103**,

555)。

(4) ERK は、心筋細胞の細胞構築を制御する。
(Circ. Res. **93**, 221)

(5) STAT シグナルは、抗アポトーシス遺伝子 (bcl-xL)、活性酸素スカベンジャー遺伝子 (MnSOD、メタロチオネイン (MTs)) を誘導し細胞保護作用を示す (J. Clin. Invest. **99**, 2698; Circulation **104**, 979; Cardiovas. Res. **65**, 428)。

(6) また、STAT は、Wnt5a や VEGF といったパラクラインシステムを活性化し、それぞれ細胞間接着構造の保持作用、組織内血管新生促進作用を示す (FEBS Lett. **573**, 202; J. Biol. Chem. **275**, 10561; J. Biol. Chem. **277**, 6676)。

心筋細胞に対する作用に加え、最近、LIF が心筋組織幹細胞に作用して、組織幹細胞を血管内皮細胞に分化誘導すること、その過程に STAT3 の活性化が必須であることを見出した (J. Biol. Chem. **281**, 6442)。この知見は、ストレスにより発現誘導されるサイトカインにより、心筋組織幹細胞が血管内皮細胞に分化する可能性を示唆するものである。

2. 研究の目的

幹細胞を標的とした、サイトカインによる再生医療の確立を目指し、心筋組織修復、再生機構における心筋組織幹細胞のダイナミクスを明らかにし、サイトカインによる心筋組織幹細胞の細胞運命の制御機構を解明することを目的とする。具体的には以下の研究をおこなう；

(1) 心筋組織幹細胞から血管内皮細胞への分化誘導機構の解明

(2) 心筋組織幹細胞の生体内での細胞動態の解析

3. 研究の方法

(1) 心筋組織幹細胞から血管内皮細胞への分化誘導機構の解明

①分化誘導シグナルの解析

マウスから心筋組織幹細胞として Sca-1 陽性細胞を、抗 Sca-1 抗体を用いた MACS 法を用いて調整した。

心筋由来 Sca-1 陽性細胞を、様々なサイトカイン存在下で培養し、14 日後、その分化状態を RT-PCR 法を用いて検討した。

心筋組織幹細胞におけるシグナル系の活性は、心筋組織幹細胞をサイトカインで刺激後、リン酸化特異的抗体を用いて western blotting 法により検討した。

活性化されたシグナル系の意義に関する評価は、そのシグナル分子に対する siRNA もしくは抑制型変異体 (dominant-negative 体)

アデノウイルスベクターを用いて検討した。STAT3 に関しては、STAT3^{flox/flox} マウスから心筋組織幹細胞を調整し、Cre-リコンビナーゼを発現するアデノウイルスを用いて STAT3 遺伝子欠損心筋組織幹細胞を調整した。
②血管内皮細胞への分化を担う STAT3 の標的分子の検討

心筋組織幹細胞を LIF で刺激し発現上昇する遺伝子群を DNA アレイ法で検索した。STAT3 標的分子の機能解析は、(1)①に記載した方法を用いた。

(2) 心筋組織幹細胞の生体内での細胞動態の解析

①梗塞後心筋組織におけるサイトカインの発現に関する研究

マウス心筋梗塞モデルは、マウスを呼吸器管理下、開胸し左冠動脈を結紮することにより作製した。心臓を回収し total RNA を調整、real time RT-PCR 法にてサイトカインの発現を解析した。

②梗塞後心筋組織における組織幹細胞の細胞動態に関する研究

核内移行シグナルを付加された β ガラクトシダーゼ遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いて心筋組織幹細胞をラベリングした後、梗塞作製時に心筋組織に細胞を移植した。2 週間後に心臓を回収し、組織切片を作製して、LacZ 染色と血管内皮細胞マーカー (CD31 など) に対する抗体を用いた免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) 心筋組織幹細胞から血管内皮細胞への分化誘導機構の解明

①分化誘導シグナルの解析

心筋組織幹細胞を TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-11、CT-1、LIF で刺激し、14 日目に血管内皮マーカー遺伝子の発現を検討した。その結果、IL-11、CT-1、LIF などの IL-6 family cytokines は血管内皮マーカーを発現誘導することが明らかになった (図 1)。

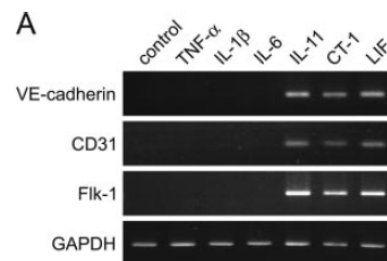


図 1. 様々なサイトカイン刺激による心筋組織幹細胞の血管内皮細胞への分化

これまで、LIF による心筋組織幹細胞の血管内皮への分化に STAT3 の活性化が必須であることを明らかにしてきたこと (J. Biol. Chem. **281**, 6442) から、各サイトカインによる STAT3 の活性化を、リン酸化 STAT3 (p-STAT3) 特異的抗体を用いて western blotting にて検討した (図 2)。(total STAT3 を同様の方法で検出し、バンドを定量化し、p-STAT3/STAT3 を STAT3 の活性化として示した。) その結果、心筋組織幹細胞を血管内皮細胞に分化誘導したサイトカイン (IL-11、CT-1、LIF) は、いずれも STAT3 を活性化することが明らかになった。

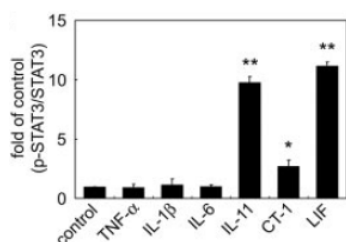


図 2. 心筋組織幹細胞における、様々なサイトカインによる STAT3 の活性化

そこで、次に、心筋組織幹細胞から血管内皮細胞への分化における STAT3 の重要性を検討するために、STAT3 を siRNA を用いてノックダウンし、各サイトカイン刺激による血管内皮への分化を検討した。その結果、STAT3 遺伝子のノックダウンは心筋組織幹細胞の血管内皮細胞への分化を抑制した (図 3)。

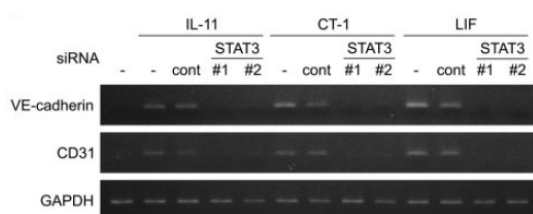


図 3. STAT3 ノックダウンによる組織幹細胞の血管内皮細胞への分化抑制

図 3 と同様の結果は、STAT3 flox マウス由来 STAT3 遺伝子欠損心筋組織幹細胞を用いた実験でも得られた。STAT3 flox/flox マウス心臓から心筋組織幹細胞を調整し、Cre-リコンビナーゼを発現するアデノウイルスを感染させ STAT3 遺伝子を欠失させた。(コントロールには β ガラクトシダーゼを発現するアデノウイルスを用いた。) 細胞を LIF 存在下、14 日間培養し、細胞を回収し、血管内皮細胞特異的遺伝子の発現を RT-PCR により検討した。結果を、図 4 に示す。

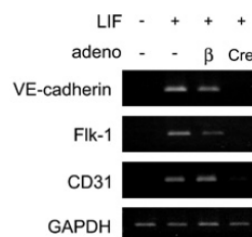


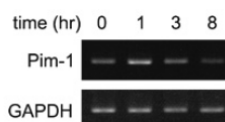
図 4. STAT3 遺伝子欠損心筋組織幹細胞は血管内皮細胞に分化しない
Cre; Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス β ; β ガラクトシダーゼ発現アデノウイルス

②血管内皮細胞への分化を担う STAT3 の標的分子の検討

上記のように心筋組織幹細胞から血管内皮細胞への分化に STAT3 の活性化が必須であることが明らかになった。そこで、心筋組織幹細胞における STAT3 の標的遺伝子を、DNA アレイを用いて探索した。具体的には、心筋組織幹細胞を LIF で 1 時間刺激し、刺激前後での遺伝子の発現を検討した。刺激 1 時間後に 134 遺伝子が刺激前の 4 倍以上の発現増強を示した。それらの中から、細胞の分化に関連するとされている Pim-1 遺伝子に注目した。

心筋組織幹細胞を LIF で刺激し、各時間について Pim-1 の発現を RT-PCR により検討した (図 5)。その結果、LIF が Pim-1 を極めて急速に発現増強することが明らかになった。

図 5. LIF 刺激による Pim-1 の発現誘導



ここでは、Pim-1 のみについて示すが、他の Pim family 遺伝子に関しても検討したところ、LIF 刺激により、Pim-2 遺伝子は発現誘導されなかったが、Pim-3 遺伝子は誘導された。

そこで次に、Pim-1 の発現が STAT3 を介しているかどうかを検討するため、前述の STAT3 遺伝子欠損心筋組織幹細胞を用いて、Pim-1 の発現誘導における STAT3 の重要性を検討した (図 6)。その結果、Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルスを用いた STAT3 flox/flox マウス由来心筋組織幹細胞から STAT3 遺伝子欠損させると、LIF による Pim-1 の誘導が抑制されることが明らかになった。(コントロールとして β ガラクトシダーゼ発現アデノウイルスを用いた。)

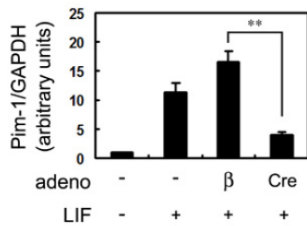


図 6. STAT3 遺伝子欠損心筋組織幹細胞においては、LIF は Pim-1 を発現誘導しない
Cre: Cre リコンビナーゼ
β: β ガラクトシダーゼ

最後に Pim family 遺伝子の血管内皮細胞への分化における意義を検討するため、抑制型 Pim-1 遺伝子導入による血管内皮への分化抑制作用を検討した(図 7)。

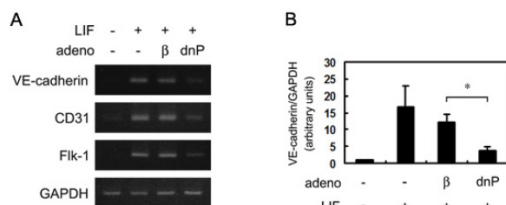


図 7. Pim 活性の抑制は、血管内皮細胞への分化を抑制する
dnP: 抑制型 Pim-1
β: β ガラクトシダーゼ

心筋組織幹細胞に抑制型 Pim-1 遺伝子をアデノウイルスベクターを用いて導入し、LIF で刺激、血管内皮細胞への分化を検討した。その結果、Pim-1 遺伝子機能の抑制は、LIF の分化誘導作用を抑制することが明らかになった。

(2)心筋組織幹細胞の生体内での細胞動態の解析

①梗塞後心筋組織におけるサイトカインの発現に関する研究

以上の結果から、心筋組織幹細胞は、IL-6 family cytokine 刺激により血管内皮細胞に分化誘導されることが *in vitro* で明らかになった。そこで、同様の分化誘導が生体内で観察されるどうかを検討することとした。まず、マウスにおいて心筋梗塞を作製し、経時的に IL-6 family cytokine の発現を検討した。その結果、梗塞後心筋において、IL-11、LIF の発現が誘導されることが明らかになった(図 8)。CT-1 に関しては梗塞後心筋では発現誘導されなかった。興味深いことに、*in vitro* で心筋組織幹細胞を血管内皮細胞に分

化させる効果が得られなかった IL-6 に関しても、梗塞心筋では IL-6 受容体(IL-6R) の発現が増強された。我々は、可溶性 IL-6R を添加すると、IL-6 刺激により心筋組織幹細胞が血管内皮細胞に分化する能力を獲得することを *in vitro* で確認しており、IL-6/IL-6R シグナルの意義についてはさらなる検討が必要であろう。

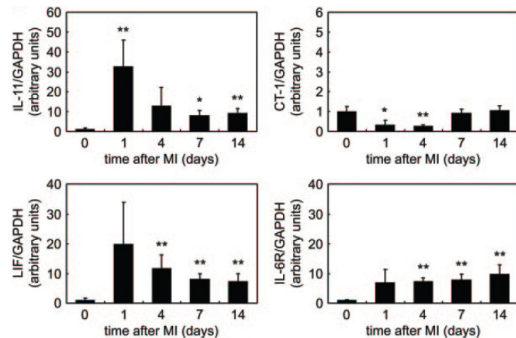


図 8. 梗塞後心筋組織におけるサイトカイン関連遺伝子の発現

②梗塞後心筋組織における組織幹細胞の細胞動態に関する研究

次に、心筋組織幹細胞の血管内皮への分化を生体内で確認した(図 9)。心筋組織幹細胞を、核移行シグナルを有する β ガラクトシダーゼ遺伝子を導入しラベリングした後、心筋梗塞作製時に心筋組織に移植した。2 週間後、血管内皮特異的マーカー遺伝子である抗 CD31 抗体で染色した。その結果、梗塞後心筋組織で、LacZ 陽性血管内皮細胞が認められた。

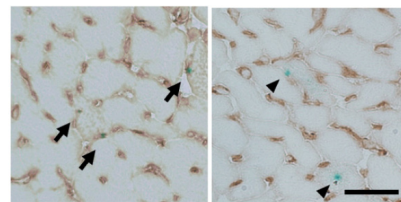


図 9. 心筋組織幹細胞の梗塞後心筋での分化
Arrows: 分化 Arrow heads: 非分化

そこでこの系を用いて、心筋組織幹細胞が血管内皮細胞に分化誘導される過程で、*in vitro* と同様に *in vivo* においても STAT3/Pim-1 シグナル系が重要かどうかを検討した。具体的には、野生型 STAT3 を発現させた心筋組織幹細胞、STAT3 遺伝子を欠損させた心筋組織幹細胞、抑制型 Pim-1 遺伝子を発現させた心筋組織幹細胞を用いて、同様の細胞移植実験を行った(図 10)。

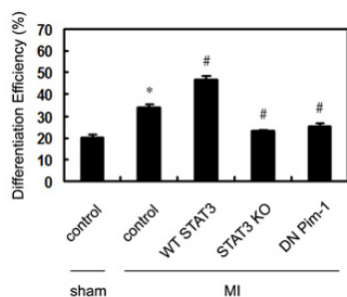


図 10. 血管内皮細胞への分化における STAT3/Pim-1 シグナルの意義の生体での解析
WT STAT3; 野生型 STAT3 発現細胞
STAT3 KO; STAT3 遺伝子欠損細胞
DN Pim-1; 抑制型 Pim-1 遺伝子発現細胞

その結果、野生型 STAT3 を発現させ STAT3 シグナルを増強すると MI による血管内皮細胞への分化効率が増強されること、逆に、STAT3 遺伝子を欠損させると分化効率が低下することが明らかになった。また、抑制型 Pim-1 遺伝子導入による Pim-1 の機能抑制は、STAT3 抑制と同様に、分化効率低下させることが示された。

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 12 件)

代表的は欧文論文

① Iwakura, T., Mohri, T., Hamatani, T., Obana, M., Yamashita, T., Maeda, M., Katakami, N., Kaneto, H., Komuro, I., Azuma, J., Nakayama, H., Fujio, Y. (2011) STAT3/Pim-1 signaling pathway plays a crucial role in endothelial differentiation of cardiac resident stem cells both *in vitro* and *in vivo*. J. Mol. Cell. Cardiol. In press

② Nakaoka, Y., Shioyama, W., Kunimoto, S., Fujio, Y., Higuchi, K., Nishida, K., Arita, Y., Kuroda, T., Hirota, H., Yamauchi-Takahara, K., Hirano, T., Komuro, I., Mochizuki, N. (2010) SHP2 negatively regulates skeletal alpha-actin gene expression downstream of gp130 signaling in cardiomyocytes. J. Mol. Cell. Cardiol. **49**, 157-164.

③ Obana, M., Maeda, M., Takeda, K., Hayama, A., Mohri, T., Yamashita, T., Nakaoka, Y., Komuro, I., Takeda, K., Matsumiya, G., Azuma, J., Fujio, Y. (2010) Therapeutic activation of STAT3 by

interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. Circulation. **121**, 684-691

④ Mohri, T., Fujio, Y., Iwakura, T., Matsuda, K., Maeda, M., Azuma, J. (2009) Signals through glycoprotein 130 regulate the endothelial differentiation of cardiac stem cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **29**, 754-760

⑤ Yamamoto, Y., Hoshino, Y., Ito, T., Nariai, T., Mohri, T., Obana, M., Hayata, N., Uozumi, Y., Maeda, M., Fujio, Y., Azuma, J. (2008) Atrogin-1 ubiquitin ligase is upregulated by doxorubicin via p38 MAP kinase in cardiac myocytes. Cardiovasc. Res. **79**, 89-96

邦文総説

① 尾花理徳、前田真貴子、藤尾 慈 IL-11 の心血管系における作用 (2010) 循環器科 67: 156-162

[学会発表] (計 16 件)

招待講演

① Fujio, Y. “Drug Dosing Considerations for Antithrombotic Therapy”
Session: Joint AHA/Asian Pacific Society of Cardiology: Pharmacogenomics: Implications for Drug Dosing and Clinical Trials in Different Populations.
American Heart Association, Scientific Session 2009 (Orlando) Nov. 14.-18, 2009

② Fujio, Y. “Cytokine”
Session: How to Recognize Cell Death and Its Impact on Heart Failure
American Heart Association, Scientific Session 2008 (New Orleans) Nov. 8-12, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤尾 慈 (FUJIO YASUSHI)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 20359839

(2) 研究分担者

東 純一 (AZUMA JUNICHI)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 30144463
H20 まで分担者として参画

前田 真貴子 (MAEDA MAKIKO)
兵庫医療大学・薬学部・講師
研究者番号: 70461168