

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591648

研究課題名(和文) 虚血プレコンディショニングによる心筋保護作用の機序の解明
——幹細胞の視点から研究課題名(英文) The Cardioprotective Effect of Bone Marrow Stem Cells
in the Late Phase of Ischemic Preconditioning

研究代表者

森景 則保 (MORIKAGE NORIYASU)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50335741

研究成果の概要(和文)：虚血プレコンディショニングは、さまざまな臓器において短時間の虚血にさらされることにより、それに続く虚血再灌流障害から保護される現象として知られている。しかしながら、臓器保護効果の詳細なメカニズムは明らかではない。本研究では、虚血プレコンディショニングの後期相における心筋保護効果に、骨髄幹細胞の動員と集積が重要な役割を果たすことを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Ischemic preconditioning is an innate phenomenon in which brief exposure to sublethal ischemia provides tissue protection from ischemia/reperfusion injury. But the precise mechanisms of organ protection by ischemic preconditioning are unclear. This study shows that the enhanced mobilization and recruitment of bone marrow stem cells play an important role in the late phase of ischemic preconditioning.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：Ischemic preconditioning、虚血再灌流障害、幹細胞、骨髄幹細胞、
虚血プレコンディショニング

1. 研究開始当初の背景

虚血プレコンディショニング(Ischemic preconditioning; IPC)は、さまざまな臓器において短時間の虚血にさらされることによりそれに続く虚血再灌流障害から保護される現象として知られている。また、IPCを行った臓器から離れた組織においても虚血再灌流障害に対する保護効果があることが証明されており、この現象は remote IPC (RIPC)と呼ばれている。IPCの保護効果は2つの時相からなり、IPCの直後から2、3時間

後までの早期相(early phase)と、IPCの12、24時間後から3、4日間まで続く後期相(late phase)とに分けられる。この2つの時相の作用機序は完全に異なる。IPCのearly phaseでは、アデノシンやブラジキニンなどのメディエーターの素早い放出、既に存在するタンパク質の修飾、セカンドメッセンジャーシステムの活性化などを介した保護効果と考えられている。これに対し、late phaseにおいては、様々な転写因子の活性化によって発現調節を受けた心筋保護タンパクによ

る効果であり、遅延性、持続性の臓器保護がもたらされると考えられる。しかし、詳細な IPC のメカニズム、特に late phase については分からない点が多い。興味深い事に、最近、IPC の数時間から数日後に末梢血中に骨髄幹細胞が動員されていることが報告されている。さらに、骨髄幹細胞が放出する多くの成長因子が心筋細胞をアポトーシスから保護し、その上骨髄幹細胞自身が心筋の修復に効果的に用いられることが示されている。末梢血中への骨髄幹細胞の動員に時間を要することを考えると、動員された骨髄幹細胞が障害された心臓に集積することで、IPC 後期相での心筋保護効果に寄与しているといった仮説が成立すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、RIPC 後の末梢血中での心筋保護因子や骨髄幹細胞の動態変化を明らかにすると共に、心虚血再灌流障害モデルを用いて末梢血中に動員された骨髄幹細胞が心臓に集積するか否か、ならびに、集積した骨髄幹細胞が IPC による心筋保護効果に寄与しているか否かを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RIPC モデルの作製

C57BL/6 マウスを用いて、全身麻酔下で開腹後、腹部大動脈を露出して、5 分間の遮断と 5 分間の再灌流を 4 サイクル行うことにより RIPC モデルを作製した。また、開腹と腹部大動脈露出のみを行ったマウスを対照群とした。

(2) IPC 後の末梢血におけるサイトカインおよび骨髄幹細胞の動態変化の測定

IPC の 1、3、6、12、24、48、および 72 時間後にマウスを犠牲死させ、末梢血を採取後、血漿および単核球を分離して以下の検討を行った。血漿中の Stromal cell-derived factor (SDF)-1 α および vascular endothelial growth factor (VEGF) 量は ELISA 法にて測定した。また、末梢血単核球中の CD34 および CD34/Flk-1 陽性細胞率をフローサイトメトリー解析により定量評価した。

(3) 骨髄キメラマウスと心虚血再灌流障害モデルの作製

骨髄キメラマウスは、C57BL/6 マウスに 10Gy の放射線照射後、GFP トランスジェニックマウスより採取した骨髄単核球を静脈内投与することで作製した。なお、キメラマウスは骨髄移植 8 週間後に実験に使用した。

心虚血再灌流障害モデルは、骨髄キメラマ

ウスに全身麻酔、気管内挿管、人工呼吸管理下で左開胸を行い、左冠動脈前下行枝を 30 分間遮断、その後再灌流することにより作製した。IPC の直後に行った群を early 群、IPC の 24 時間後に行った群を late 群、開腹のみの直後に行った群を対照群とした。

(4) 心臓エコー検査

心機能の評価は、心虚血再灌流障害の 1 および 2 週間後に行った。浅く麻酔をかけた後に、2 次元、長軸像で左室径が最大となるレベルで心臓を映し、M モードカーソルを左室前後壁に垂直になるようにした。左室拡張末期径および左室収縮末期径は、M モードで leading-edge 法にて計測した。左室内径短縮率は(左室拡張末期径-左室収縮末期径)/左室拡張末期径 \times 100 で算出した。

(5) 組織学的解析

虚血再灌流障害 2 週間後に、各群のマウスを犠牲死させ、心臓を摘出した。障害心の凍結切片を作製して、組織学的解析に用いた。Hematoxylin-eosin 染色および Azan 染色を行い、左室壁厚、線維化面積の割合を計測した。画像解析ソフトを用いて左室前壁の等間隔の 3 カ所で平均の左室壁厚を計測し、さらに、左室壁全体の面積で左室が青く染色された部分の面積を除き、線維化面積の割合を算出した。計測は、それぞれの心臓で少なくとも 3 切片で行い、平均値を統計学的分析に用いた。

(6) アポトーシスの評価

心筋細胞のアポトーシスを評価するために、虚血再灌流障害 1 日後にマウスを犠牲死させ、心臓を摘出した。障害心の凍結切片を用いて、アポトーシスに陥った心筋細胞を TUNEL 法にて検出した。また、核染色は 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) にて行った。3 枚のスライドからランダムに選出した 20 以上の異なる視野でアポトーシスを計測し、その平均値を統計学的分析に用いた。

(7) 骨髄幹細胞の集積の評価

骨髄幹細胞の集積の評価は、虚血再灌流障害 1 日後に行った。凍結切片を用いて、抗 GFP 抗体で染色して、骨髄由来の GFP 陽性細胞を検出できるようにした。さらに、PE 標識抗 Sca-1 および抗 c-kit 抗体で染色することで、幹細胞の同定を試みた。骨髄幹細胞は、それぞれの心臓の 3 枚の異なったスライドの 10 カ所以上で計測し、平均値を統計学的分析に用いた。さらに、定量的フローサイトメトリー解析による評価も行った。虚血再灌流障害 1 日後に採取した心臓を細かく切り刻んだ後に、0.1% コラーゲナーゼで酵素分解した。分

離された細胞を集め、PE 標識抗 Sca-1 および抗 c-kit 抗体にて染色後、フローサイトメトリ解析を行った。

(8) 骨髄幹細胞の分化の評価

虚血再灌流障害 2 週間後に、骨髄幹細胞 (GFP 陽性細胞) の心筋細胞や内皮細胞への分化を評価するために、それぞれ、トロポニン I 抗体、または、vascular endothelial (VE)-cadherin 抗体で免疫染色を行った。

(9) 虚血再灌流障害心への骨髄幹細胞の集積を阻害する介入実験

骨髄幹細胞の動員と集積が IPC の心筋保護効果に直接関与していることを証明するために、虚血再灌流障害心への骨髄幹細胞の集積を阻害する介入実験を行った。幹細胞が障害心筋に集積する際に重要な SDF-1/CXCR4 系を CXCR4 中和抗体の投与により阻害することで骨髄幹細胞の集積を阻害した。同量の非特異的抗体を投与する群を対照群とした。なお、抗体は IPC の 2 時間前 (early 群)、22 時間後 (late 群)、または、Sham 開腹の 2 時間前に腹腔内投与した。その後の虚血再灌流障害、組織学的解析、心機能評価は前述と同様に行った。

4. 研究成果

(1) IPC 後の末梢血におけるサイトカインおよび骨髄幹細胞の動態変化

IPC により、血漿中の SDF-1 α は 1 および 3 時間後に対照群と比較して 4 倍に増加していた ($p < 0.005$)。同様に、血漿中の VEGF は 1 時間後に対照群の約 6 倍に増加していた ($p < 0.005$)。しかしながら、SDF-1 α および VEGF は、6 時間後にはほぼベースラインに戻っており、12、24、48、および 72 時間後での再上昇は認めなかった。

末梢血単核球中の CD34 および CD34/Flk-1 陽性細胞率については、IPC の early phase では変化が認められなかったが、12 時間後より上昇傾向が認められ、24 時間後の late phase では有意な上昇が認められた。

以上から、IPC 後のサイトカイン (early phase で上昇) と幹細胞 (late phase で上昇) の動態変化には解離があることが分かった。

(2) IPC 後の虚血再灌流障害に対する心筋保護効果

虚血再灌流障害 1 および 2 週間後の心臓エコー検査の結果、対照群と比較し early 群および late 群では明らかに左室前壁の動きが良かった。左室拡張末期径は群間で有意差は認めなかったが、左室収縮末期径は対照群と比較して early 群および late 群で共に有意

に小さかった ($p < 0.001$)。左室内径短縮率もまた、対照群と比較して early 群および late 群で共に有意に高かった ($p < 0.001$)。

組織学的分析の結果、左室前壁厚は群間に有意差は認めなかった。しかし、虚血再灌流障害 2 週間後、対照群と比較して early 群および late 群では左室における線維化面積が有意に減少していた ($p < 0.005$)。さらに、虚血再灌流障害 1 日後の心臓において、対照群と比較して early 群および late 群ではアポトーシスに陥った心筋細胞 (TUNEL 陽性細胞) の数が有意に減少していることがわかった ($p < 0.001$)。以上の結果より、IPC の early phase および late phase において虚血再灌流障害に対する心筋保護効果がもたらされることが証明された。

(3) IPC の late phase における虚血再灌流障害心への骨髄幹細胞の集積

免疫組織学的評価を行った結果、骨髄幹細胞は虚血再灌流障害のない領域にも少数認められたものの、ほとんどは虚血再灌流障害のリスクエリアに集中していた。定量解析の結果、対照群と比較して、early 群および late 群ではリスクエリア内に存在する骨髄由来幹細胞 (GFP/Sca-1 および GFP/c-kit 陽性細胞) の数が有意に多かった ($p < 0.01$)。さらに、early 群と比較し、late 群では骨髄由来幹細胞の集積が約 2 倍も多く認められた ($p < 0.05$)。また、フローサイトメトリ解析においても、early 群と比較し、late 群では約 2-3 倍の骨髄由来幹細胞が心臓内に集積していることが確認された。以上の結果から、虚血再灌流障害に対する心筋保護効果に、IPC により動員された骨髄由来幹細胞の障害心筋への集積が関与することが示唆された。

(4) 虚血再灌流障害心へ集積後の骨髄幹細胞の分化

虚血再灌流障害 2 週間後、心臓内に集積した骨髄幹細胞 (GFP 陽性細胞) の一部は、心筋マーカーのトロポニン I、または、血管内皮マーカーの VE-cadherin を発現していた。以上の結果から、障害心に集積した骨髄幹細胞の一部が心筋や血管内皮細胞に分化し得ることが示された。

(5) 骨髄幹細胞の集積阻害による IPC の心筋保護効果への影響

虚血再灌流障害作製 1 および 2 週間後の late 群における左室内径短縮率は、CXCR4 抗体投与群で非特異的抗体投与群と比較して有意に低かった ($p < 0.01$)。しかし、early 群および対照群の左室内径短縮率については CXCR4 抗体投与による有意な差は認められなかった。組織学的解析でも、late 群では CXCR4 抗体投与によって左室線維化面積率が増加

していた ($p < 0.01$) が、early 群および対照群ではそうした変化は認められなかった。また、虚血再灌流障害 24 時間後のリスクエリアに集積した骨髄幹細胞 (GFP 陽性細胞) の数は、early 群および late 群で CXCR4 抗体投与によって有意に減少していた ($p < 0.01$)。以上の結果から、中和抗体による骨髄幹細胞の集積の阻害によって late phase での心筋保護効果は抑制されるが、early phase では影響を受けないことが分かった。

(6) 結語

本研究成果として、IPC の late phase において骨髄幹細胞が末梢血中へ動員されることが示された。また、動員された骨髄幹細胞は障害心臓に集積することで、虚血再灌流障害に対する心筋保護効果に寄与することが明らかとなった。本研究は、IPC による心筋保護効果に骨髄幹細胞が関与することを示した最初の報告であり、IPC による心筋保護メカニズムの解明に貢献するものと考えられる。

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 2 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)

[学会発表] (計 2 件)

① 鴨田隆弘、李 桃生、濱野公一
虚血プレコンディショニングによる心筋保護効果における骨髄幹細胞の関与
第 9 回再生心臓血管外科治療研究会
2010. 2. 15 神戸、神戸国際会議場

② Kamota 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, Ernest N. Morial Convention Center, USA

[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

森景 則保 (MORIKAGE NORIYASU)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 50335741

(2) 研究分担者

古谷 彰 (FURUTANI AKIRA)

山口大学・医学部附属病院・学術研究員

研究者番号: 90346552

李 桃生 (LI TAO-SHENG)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 50379997

(3) 連携研究者

なし