

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月14日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21249075

研究課題名（和文） 人工幹細胞ニッチと幹細胞誘導因子を用いた幹細胞制御心筋再生治療法の確立

研究課題名（英文）：Development of the new cell-free device for sever heart failure by restructuring of artificial stem cell niche using extracellular matrixes and stem cell recruitment/differentiation factors.

研究代表者

澤 芳樹 (SAWA YOSHIKI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00243220

研究成果の概要（和文）：200字程度

細胞外マトリックス工学を駆使して人工細胞外マトリックスによって心臓幹細胞ニッチを構築し、さらに心筋組織における幹細胞誘導分化増殖因子の徐放と機能発現を制御することで、内在性の自己心筋幹細胞を誘引し、人工幹細胞ニッチを生体内 bioreactor として心筋細胞への分化を促進して、心機能を改善する新規な自己組織修復型心筋再生用デバイスの開発を行い、重症心不全に対する普遍性の高い治療法の開発を行なった。

研究成果の概要（英文）：

We developed the new cell-free device for sever heart failure by restructuring of artificial stem cell niche using extracellular matrixes and stem cell recruitment/differentiation factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	15,600,000	4,680,000	20,280,000
2010年度	14,000,000	4,200,000	18,200,000
2011年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
年度			
年度			
総計	36,600,000	10,980,000	47,580,000

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：iPS細胞、心筋細胞、細胞シート、心不全

## 1. 研究開始当初の背景

循環器領域において、高齢化、虚血性心疾患の増加にともない、今後、心不全患者数の増大及びそれに伴う治療費の増加が予想され、既に高額化した医療費の高騰にさらに拍車をかけるものと思われる。重症心不全に対する現在の最終的な治療法は、補助人工心臓や、心臓移植などの置換型治療であり、これまでその有用性が報告されてきたが、現段階では前者はその耐久性や合併症など、後者は

ドナーの確保や免疫抑制剤の使用等に問題があり、普遍的な治療とはいえないのが現状である。最近、このような重症心不全に対し、これまでの置換型治療から、遺伝子工学や細胞組織工学、再生医療等を駆使した再生型治療が新しい治療法として注目されている。なかでも、重症心不全に対する治療の一選択肢として、心筋細胞移植の研究が盛んに行われ、種々の移植細胞が心機能を向上させることが報告されている。しかし、未だ臨床応用に

至るには細胞移植効率や細胞培養に長期間を有するなど多くの問題点があり、新しい治療法の開発が急務である。

これまで我々は、自己筋芽細胞を細胞シート工学により組織化し、これを重症心不全モデルに移植することにより著明な組織、機能改善が起こることを示した。しかし、この方法では、細胞グラフトを作成するために自己細胞を長期間培養する必要があり、緊急性の高い治療を要する重症患者への対処が困難である。さらに、治療効果や品質の安定性の確保が困難な生物由来製品に対するわが国の厚生労働省の審査のハードルの高さは、トランスレーショナルリサーチの進展を阻んでおり、細胞培養が不要な規格化・製品化された再生治療用デバイスの開発が急務である。

最近の組織幹細胞研究の進歩により、心臓においても、細胞分裂し心筋細胞に分化しうる心筋幹細胞の存在が発見され(Beltrami AP, et al. Cell 19:763-776, 2003, Oh H, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 100:12313-12318, 2003, Laugwitz KL, et al. Nature 433(7026):647-653, 2005)、さらに組織幹細胞の未分化性と分化誘導を制御する生体内での環境(幹細胞ニッチ)の存在が示され、生体内で細胞外マトリックスと制御因子が、組織幹細胞の分化誘導を制御していることも明らかとなった。これらのバイオテクノロジーの発展により、幹細胞ニッチの細胞外マトリックス構造や、幹細胞の分化誘導を制御するサイトカイン、その他分化誘導因子などの生体内発現時期を巧みに制御するような機能性材料を構築し移植することで、幹細胞の分化や機能を生体内で自在に操作することが可能になり、これらの融合技術による革新的デバイス開発が可能と考えられる。すなわち、従来の人工臓器/デバイスにおける幹細胞ニッチの再現・構築は、機能不全臓器における自己幹細胞の制御による臓器組織修復を可能にし、幹細胞の誘導/分化制御等の自己組織が持つ自己修復機能を活用することで、治療前の細胞培養が不要な自己再生修復型デバイスの開発が可能と考えられる。これまでも、コラーゲンなどの生体吸収性材料からなる3次元の担体に細胞を播種し心筋組織を再生させる研究は報告されている(Li RK, et al. Circulation 100:II63-69, 1999)が、心筋幹細胞を病巣に誘導し、かつ増殖、分化を制御して材料自身の機能によって心筋を再生するようなデバイスは現在のところ存在しない。

大阪大学では、関口らが、全臓器組織の細胞外マトリックスを解明する技術を構築し、幹細胞ニッチの主成分である細胞外マトリックスが多数の細胞の接着あるいは細胞の足場となっているだけでなく、多細胞からな

る器官の形成・維持においては、細胞増殖・細胞分化を制御する細胞外環境因子として働いていることを明らかにしてきた。特に基底膜成分の代表であるラミニンは、幹細胞ニッチを構成する細胞外マトリックスとして非常に重要な役割を担っているが、関口らは各種ラミニンの同定とその機能解析を明らかにしてきた。そして、ラミニンなどの細胞外マトリックスの微細構造や表面加工技術により、人工幹細胞ニッチを構築することが可能となってきた。

本研究の最も大きな特色は、大阪大学で開発してきた成果から、心筋幹細胞ニッチにおける細胞外マトリックス、基底膜成分を解明するとともに、細胞間もしくは細胞・マトリックス間相互作用を詳細に検討し、細胞外マトリックス工学技術を駆使することにより心筋幹細胞ニッチを模倣する人工細胞外マトリックスを構築する。さらに、心筋組織における幹細胞誘導分化増殖因子などを固定、徐放するような機能性表面を持つデバイスを構築することで、自己心筋幹細胞の動態を制御し、心筋を再生させることである。つまり、細胞移植や細胞培養など必要とせず、自己体内で自己心筋幹細胞より心筋を再生する規格化・製品化されたデバイスの開発は、末期重症心不全治療における新しい方向性と普遍性を見出すことであり、この点が独創的である。したがって、本研究が目指す心筋再生デバイスの開発は、心臓移植や細胞治療などの特殊な治療法と異なり、一般病院でも緊急症例にも対応可能で、汎用性の高い進化した心筋再生治療法になりうると考えられ、21世紀の新しい治療としてその重要性は極めて高いと思われる。

## 2. 研究の目的

人工細胞外マトリックスによって心臓幹細胞ニッチを構築し、さらに心筋組織における幹細胞誘導分化増殖因子の徐放と機能発現を制御することで、内在性の自己心筋幹細胞を誘引し、人工幹細胞ニッチを *bioreactor* として心筋細胞への分化を促進して、心機能を改善する新規な自己修復型心筋再生用デバイスを開発し、重症心不全に対する新たな治療法を確立することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 心筋幹細胞の分化・誘導因子の解明

心筋幹細胞の障害部位への遊走及び動員促進因子を解明する。心筋組織における幹細胞誘導分化増殖因子について検討を行う。さらに現在、我々が行っている心筋梗塞部位への筋芽細胞シート移植によって心機能の回復が認められた心筋組織について、遺伝子発

現パターン等を解析する。

## (2) 心筋幹細胞ニッチの解明

関口らが進めている細胞外マトリックス同定技術の成果から、心筋幹細胞ニッチにおける細胞外マトリックス、基底膜成分を解明する。細胞間もしくは細胞・マトリックス間相互作用を詳細に検討し、心筋幹細胞ニッチを模倣する人工細胞外マトリックスを構築する。

## (3) 因子の *in vitro* における効果とマトリックスへの導入の検討

種々の細胞増殖因子及び液性因子を候補として、培養心筋幹細胞などに作用させ、心筋細胞への分化誘導能について検討する。さらに、障害心筋部位で効果的に発現させるためのマトリックスへの導入法を検討する。

## (4) 梗塞心への移植、機能評価・組織評価

設計した心筋再生デバイスの動物実験にて評価する。ラット心筋梗塞モデルの梗塞巣に埋入し、心機能評価と埋入したマトリックスによって誘導された組織について評価する。

## (5) 大動物モデルへの応用

設計したデバイスの臨床応用を目指して、ブタ等の大動物心筋梗塞モデルにより評価を行う。因子とマトリックスを最適化し、より心機能改善効果の高い心筋再生治療法の完成を目指す。

## 4. 研究成果

幹細胞ニッチの構造的・機能的な中核となる細胞外マトリックスに着目し、幹細胞の増殖と機能維持に必要なニッチの分子実体を解明するとともに、その活性を保持した人工幹細胞ニッチの構築技術を開発した。具体的には、組織幹細胞の可視化技術と細胞外マトリックス分子の網羅的局在解析技術を組み合わせ、幹細胞ニッチを構成する細胞外マトリックス分子を同定するとともに、その活性を組織幹細胞培養系を用いて評価した。組織幹細胞の増殖と分化誘導制御に関わる液性因子（増殖因子等）とニッチ分子との相互作用を網羅的に検索し、液性因子を組み込んだ人工幹細胞ニッチの構築戦略を確立するとともに、デバイス表面へのニッチ分子の固相化技術を開発した。

具体的には、幹細胞ニッチを構築する細胞外マトリックスの分子実体を解明するためには、対象臓器の幹細胞の局在部位をまず知る必要がある。これまでに、組織幹細胞を可視化するため、通常幹細胞マーカー

(Sca-1, c-kit など) を利用する方法に加えてラベル保持細胞標識法を併用する方法を用いた。組織幹細胞は分化途上の細胞と比較して増殖が遅く、DNA の複製時に取り込まれた BrdU や核内に強制発現した蛍光タンパク質が長期に渡って保持される特性を有する。組織幹細胞の可視化技術と基底膜構成蛋白質の網羅的局在解析を組み合わせることにより、幹細胞ニッチを構成するマトリックス因子の探索を行った。なお、組織幹細胞は血管周囲に局在する傾向があることから、組織幹細胞の近傍に位置する血管基底膜の分子組成の解析をあわせて進めた。

これまでに、可視化された心臓幹細胞が主に心外膜に局在することを明らかとなった。また、幹細胞の近傍に発現する基底膜分子を網羅的に検索し、複数の幹細胞ニッチ分子の候補タンパク質を同定した（図1）。同定されたニッチ分子およびその候補分子の活性は、*in vitro* での組織幹細胞培養系を利用して評価した。上記の探索により同定されたニッチ候補分子を単独あるいは複数組み合わせ、基質上に固相化し、その上で組織幹細胞を培養して、基質への接着能、増殖能、分化マーカーの発現を指標にニッチ分子としての活性について評価を進めている。

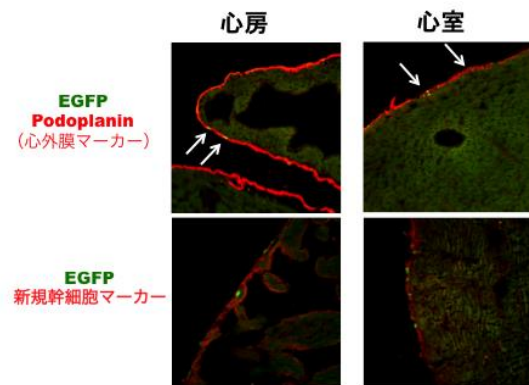


図1 幹細胞の可視化と新規心臓幹細胞マーカー

生体内組織の恒常性維持は、それぞれの組織に内在する組織幹細胞/前駆細胞により維持されている。我々は、これまでに皮膚基底膜部の接着分子欠損に起因する表皮剥離の結果、表皮幹細胞の大量喪失を来す表皮水疱症のマウスモデルを利用して、剥離表皮の再生機序に関わる分子基盤の研究を進め、剥離表皮から血中に放出される因子群が、末梢循環血中にわずかに存在する骨髓由来 lineage-negative/PDGFR $\alpha$ -positive (L-P+) 間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) を剥離部表皮に集積させ、表皮水疱症皮膚の再生・恒常性維持に寄与していることを明らかにしている。本研究では、生体内幹細胞ニ

ツチのマトリックス構造を再現した人工幹細胞ニッチを包含する生体内埋め込み型デバイス内に、骨髄由来間葉系幹細胞や組織由来幹細胞等の動員を可能にすることにより、デバイスに隣接した損傷組織の機能的再生を誘導する新規再生誘導治療の開発を行なった。具体的には、傷害組織への骨髄間葉系幹細胞 (MSC) の骨髄からの誘導に関わる因子と、MSC が傷害組織へ集積するための因子を組み合わせたゼラチンハイドロゲルをマウス皮下に埋め込むと、そのゲル内に MSC が有意に集積することが明らかになった (図 2)。

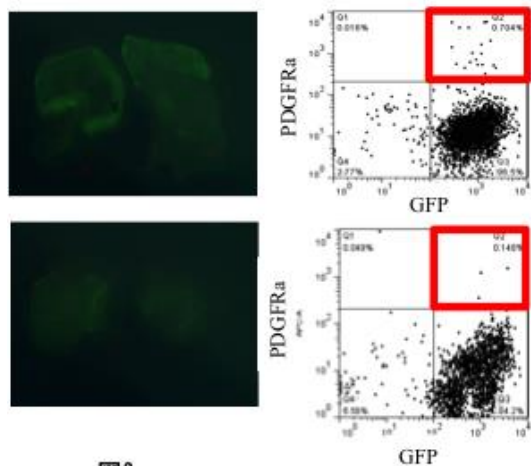


図2  
骨髄間葉系幹細胞の局所集積効果  
(上段: 因子あり、下段: 因子なし)

これまでに、このシグナル分子群の一つの機能発現メカニズムを詳細に解析し、その作用機序を明らかにした。そして大量発現系の構築を進めた。そして、この因子の静注あるいは徐放化によって骨髄から動員される L-P+MSC の損傷部位への集積効果を検討した。さらに、L-P+MSC の動員のための分子及び徐放化技術とデバイスの最適化を検討し、それをを用いた心筋梗塞治療効果について検討した。また、臨床応用を目指した候補因子の選択として低分子化合物が有力な候補となり得る知見が得られている。GFP 骨髄キメラマウスの急性期心筋梗塞モデルにおけるこの低分子化合物が心臓局所投与群において、心筋梗塞部位に GFP 陽性細胞の集積が認められた。さらにイヌ拡張型心筋症モデルにおいて、この低分子化合物投与群で心機能改善効果が認められた (図 3)。

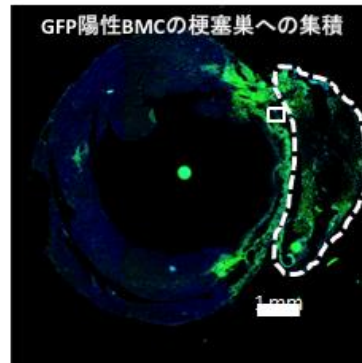
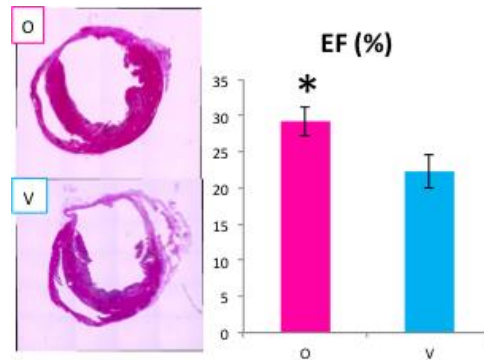


図3  
GFP骨髄キメラマウスの急性期心筋梗塞モデルに対する新規薬剤心臓局所投与による骨髄間葉系幹細胞の局所集積効果  
O: 新規薬剤投与群、V: PBS投与群

これまで心血管再生治療技術開発に関して蓄積してきたデータをもとに、小動物心不全モデルで効果があると判定された幹細胞誘導因子、幹細胞分化因子、デバイスのプロトタイプ等に関して、最も適した方法で大動物心不全モデルに移植し、その効果を機能的組織的に判定することにより、最適なセルフリー型心血管デバイスを開発した。

大動物心不全モデルについては、高速ペーシングによるイヌ拡張型心筋症モデルを対象疾患モデルとした。心臓超音波にて経時的に長期にわたり心機能評価を行い、核医学的手法を用いた心筋血流量の定量的評価、組織学的な血管新生の評価を行なった。また組織再生の程度に関しては、再生組織の分化、生存に関する組織学的評価を行った。

徐放化誘導因子と分化促進因子による生物活性の増強に加えて、幹細胞の増殖、分化を制御する二つの機能をあわせもつ、体内の細胞局所周辺環境 (ニッチ) に近いデバイスを開発するための、要素技術の抽出とデバイスの基本設計を行った。分解吸収性材料による独自のメッシュ状デバイス設計を行い基本的な構造を構築した。また、徐放物質をデバイスにコーティング可能であることを確認した。そして、心機能改善効果に有用な低分子薬剤を候補因子として、各種心不全モデ

ルでその効果を検討した(図)。さらに、具体的なデバイスでの評価手法の確立と、プロトタイプの評価を行った。特に、これまでに報告のある心筋サポートデバイス(メッシュ状デバイス)と新規薬剤との組み合わせによるデバイスの心機能改善効果を大動物によって検証し、本研究開発の基本コンセプトについての実現可能性を明確にした。

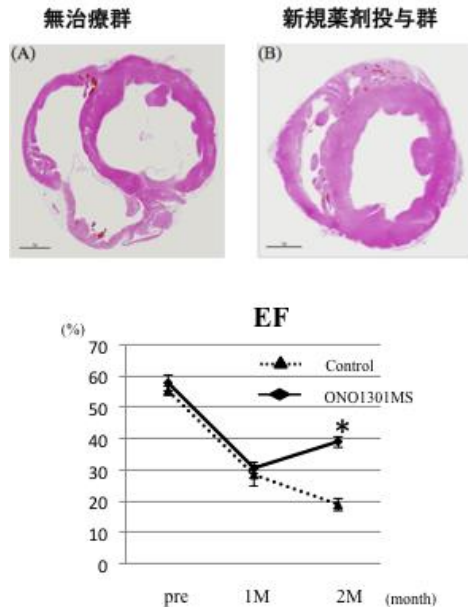


図4 拡張型心筋症イヌに対する新規薬剤投与実験

#### 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)

[学会発表] (計7件)

1. 澤 芳樹、心不全の克服に向けて ~人工心臓・心臓移植 そして再生医療~, 愛媛心臓病研究会、2011年6月4日、愛媛
2. 澤 芳樹、近未来の心不全戦略, J S P S 「再生医療の実用化」に関する研究開発専門委員会主催シンポジウム、2011年7月30日、東京
3. Yoshiki Sawa 「Stem Cell Therapy for Severe Heart Failure」国際細胞治療学会アジア太平洋地域学会、2010年10月18日、宮崎
4. 澤 芳樹、心筋再生治療の現状と展望、日本医工学治療学会、2010年4月2日、東京
5. 澤 芳樹、心筋再生治療の現状と未来、日本循環制御医学会、2010年5月28日、

大阪

6. 澤 芳樹、骨格筋芽細胞を用いた心不全治療、日本心臓病学会 学術集会、2010年9月17日、東京
7. 澤 芳樹、重症心不全治療のみらい、日本人工臓器学会、2010年11月18日、宮城

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

澤 芳樹 (SAWA YOSHIKI)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 00243220

##### (2) 研究分担者

松宮 護郎 (MATSUMIYA GORO)  
千葉大学・医学研究院・教授  
研究者番号: 20314312

倉谷 徹 (KURATANI TORU)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号: 90448035

上野 高義 (UENO TAKAYOSHI)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号: 60437316

坂口 太一 (SAKAGUCHI TAICHI)  
大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授  
研究者番号: 10467574

白川 幸俊 (SHIRAKAWA YUKITOSHI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号: 20457013

島村 和男 (SHIMAMURA KAZUO)  
大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教  
研究者番号: 10507205

齋藤 充弘 (SAITO ATSUHIRO)  
大阪大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 20448038

松山 晃文 (MATSUYAMA AKIFUMI)  
大阪大学・医学部附属病院・特任准教授  
研究者番号: 10423170

宮川 繁 (MIYAGAWA SHIGERU)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号: 70544237

山内 孝 (YAMAUCHI TAKASHI)  
大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20527999  
(H22 まで研究分担者として参画)

(3) 連携研究者

関口 清俊 (SEKIGUCHI KIYOTOSHI)  
大阪大学・蛋白質研究所・教授  
研究者番号：50187845

金田 安史 (KANEDA YASUFUMI)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：10177537

玉井 克人 (TAMAI KATSUTO)  
大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授  
研究者番号：70544237