

## 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5月29日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390391

研究課題名（和文） 内因性心筋再生を誘導するメカニズムの解明と新たな心筋再生治療法の開発

研究課題名（英文） Development of the new approach for cardiac repair by enhancing endogenous regeneration

研究代表者

美甘 章仁 (MIKAMO AKIHITO)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30372709

研究成果の概要（和文）：近年、心臓内にも心筋幹細胞や増殖する細胞の存在が認められ、自己再生修復能をもつことが示されている。その臨床事例として左室補助装置（LVAD）を装着された重症心不全患者でしばしば心機能の回復が認められており、メカニカルストレスの減少により内部環境が改善され、内因性心筋再生が促進されたことが推察される。本研究では、メカニカルストレスが心筋再生に関与することを示した。その機序の1つとして、メカニカルストレスが心筋幹細胞の増殖や分化、サイトカインの産生に影響を及ぼすことが挙げられる。

研究成果の概要（英文）：Recent studies show that cardiac stem cells and mitotic cardiomyocytes have been identified in the failing and infarcted hearts, suggesting that the heart may have regenerative potential. Substantial recovery of cardiac function by the implantation of a left ventricular assist device (LVAD) was found in some patients with heart failure. We speculate that reduction in mechanical stress achieved by LVAD support promotes cardiac regeneration by improving local environment. This study shows that reduction in mechanical stress assists the regeneration of the injured hearts. Furthermore, our findings suggest that mechanical stress suppresses the growth of cardiac stem cells, increases their release of the angiogenic factors, and enhances their myogenic differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

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：心筋再生、メカニカルストレス、再生医療、幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

心筋再生を含めて、今までの再生医療の研究は様々な細胞（ドナー細胞）を障害臓器へ移植する方法が主流で、いわゆる細胞移植による外因性再生治療である。我々もこれまで

に胎児心筋細胞、骨髄幹細胞、心筋幹細胞などを用いた心筋再生に関する研究に従事してきた (*Circulation*. 2003; 108: 1760-1765. *Circulation*. 2005; 111: 2438-2445. *Stem Cells*. 2007; 25: 911-917)。特に、虚血性心不全に対

する自己骨髄由来幹細胞移植治療は既に臨床試験で試されている。また、将来的には胚性幹 (ES) 細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞を用いた臓器再生治療が様々な難治性疾患の有効な治療法として大きく期待されている。

一方、内因性再生とは臓器の自己再生能を生かした再生治療法のことである。最近の研究により、心臓内にも心筋幹細胞と増殖する心筋細胞が認められ、自己再生修復能力を有することが明らかになった (*Nature* 2005; 433: 647-653. *New Engl J Med* 2001; 1344: 1750-1757)。しかし、心臓の内因性再生能を秘めているにもかかわらず、実際の臨床においては重篤な心不全に陥った患者が多く存在し、自然治癒することはほとんどない。その原因としては加齢や傷害心臓の内因性再生能の悪化などにより、内因性再生能が低下していることが考えられる。我々の考えを支持する心臓外科の臨床例としては Left Ventricular Assist Device (LVAD) が装着された重症心不全患者でしばしば心機能の回復が認められ、LVAD から離脱できる症例が散見される (*Circulation* 1997; 96: 542-549)。LVAD 装着による心機能回復の機序は心筋リモデリングの改善、細胞アポトーシスの減少、神経内分泌機能の改善などによるものと報告されている。しかし、LVAD 装着による心機能回復は内因性心筋再生によるものとも考えられる。つまり、LVAD 装着により左室に加わるメカニカルストレスの減少など内部の環境が改善され、内因性心筋再生が盛んとなったためと考えられる。

最近、我々はマウス梗塞心筋モデルを用いた研究で、メカニカルストレスが障害心筋の内因性再生を抑制し、メカニカルストレスの軽減により内因性心筋再生が促されることを明らかにした (*J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007; 133: 1051-1058)。また、最近の研究で、細胞を移植せず、障害心臓の細胞外基質を制御することにより、心筋の内因性再生が促進されることも報告されている (*Nature.* 2004; 432: 466-472. *Nat Med.* 2007; 13: 962-969)。これらの研究結果から、自己再生能を生かした内因性再生は心筋再生の新たな道となりうると考えられる。

以上のことから、メカニカルストレスをはじめとした心臓内の組織環境が内因性再生に重要であると考えられるが、そのメカニズムには不明な点が多い。さらに、そうした内因性環境が、心臓内に存在する幹細胞 (心筋幹細胞) に与える影響についても検討されていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究では、メカニカルストレスに着目して内因性心筋再生のメカニズムを解明する

ことを目指し、特に心筋幹細胞に及ぼす影響について検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) メカニカルストレスを軽減した動物モデルでの検討

### ①マウス心筋梗塞モデルとメカニカルストレスの軽減

C57/BL6 マウスを用い、冠動脈左前下行枝を 60 分間の結紮により障害心臓 (心筋梗塞) モデルを作製した。メカニカルストレスを軽減するため、作製した障害心臓はドナー心臓として摘出し、別の正常な C57/BL6 マウスの腹腔内に移植した。移植されたドナー障害心臓はメカニカルストレスをほとんど受けることなく、冠動脈からの血流供給を受けながら心拍動を続ける。移植後 3、7、28 日目に、心臓を摘出した (メカニカルストレスを軽減した障害心臓; メカニカルストレス軽減群)。

一方、障害心臓モデルを作製後に Sham 開腹した。このモデルでは障害心臓が通常のメカニカルストレスの下に心拍動を続ける。Sham 開腹後 3、7、28 日目に、障害心臓を摘出した (メカニカルストレスを軽減しない障害心臓; 対照群)。

### ②メカニカルストレス軽減が内因性心筋再生に及ぼす影響の評価

摘出したマウス心臓を用いて、線維化面積、Ki67 免疫染色による心筋細胞増殖指数、TUNEL 染色による心筋細胞アポトーシス指数、幹細胞マーカーである Sca-1, c-kit の免疫染色による心筋幹細胞の定量評価について組織学的解析を行った。

### ③メカニカルストレスが移植した細胞に与える影響

心筋内に移植した幹細胞に対するメカニカルストレスの影響を調べた。

移植細胞として、以下のように培養・増殖した心筋幹細胞を用いた。Green fluorescence protein (GFP) マウスの心臓を摘出し 1~2mm<sup>3</sup> に細切し、トリプシン酵素処理を行った後、フィブロネクチンでコーティングした培養皿に外植片として接着させ培養した。約 10 日間培養後、外植片を取り囲むように層状に増殖した間質様細胞を酵素処理で採取した。採取した細胞を poly-D-lysine でコーティングした培養皿に播種して、cardioshere を形成させた。cardioshere を再度採取し、フィブロネクチンでコートした培養皿に播種し、単層培養でヒト心筋幹細胞として増殖させた。

心筋幹細胞は、メカニカルストレス軽減群および対照群の障害心の梗塞領域へ直接注入し、移植後の細胞生着率について組織学的解析を行った。

(2) メカニカルストレスが心筋幹細胞に及ぼす影響 (in vitro での検討)

①心筋幹細胞に対するメカニカルストレスの暴露

ヒト心筋幹細胞を前述の(1)-③と同様にして培養・増殖させた。ヒト心筋幹細胞は、24時間培養し細胞を十分に培養皿へ接着させた後、シリコン製培養皿へ120%の伸展率、60回/分の周期で伸展刺激を加えた(伸展群)。このようにして、in vivoで拍動する心臓(心拍数60回/分、短径率20%)が発生するメカニカルストレスを疑似的に再現した。伸展刺激を加えずにシリコン製培養皿で培養した細胞を対照群とした。

②細胞の生存、増殖、アポトーシスの評価

位相差顕微鏡を用いて、細胞の形態を観察した(伸展刺激前、伸展刺激24時間後、3日後)。また、生存細胞数を計測した。

細胞の増殖とアポトーシスは、各々、Ki67免疫染色、TUNEL染色にて組織学的に解析した。

③サイトカインと成長因子の分泌(パラクライン効果)の評価

メカニカルストレスが心筋幹細胞のサイトカインおよび成長因子の分泌に及ぼす影響を評価した。培養12時間後の培養上清を採取し、上清中に含まれる様々なサイトカインおよび成長因子をELISA法にて測定することで評価した。

④幹細胞と分化マーカーの発現の評価

メカニカルストレスが心筋幹細胞の分化・成熟に及ぼす影響を検討するために、培養3日後、免疫染色法にて評価した。幹細胞マーカーとしてSca-1, c-kitを用いた。また、分化マーカーとして、troponin-I(心筋)、smooth muscle actin(SMA;平滑筋)、CD31(血管)を用いて評価した。

#### 4. 研究成果

(1) メカニカルストレスを軽減した動物モデルでの検討

①メカニカルストレス軽減が内因性心筋再生に及ぼす影響の評価

対照群と比較して、メカニカルストレス軽減群では、心筋梗塞部の左室壁が厚く、線維化面積が減少していることが分かった(モデル作製後28日目)。また、メカニカルストレス軽減群では、境界領域での細胞増殖指数(Ki67陽性)の増加やアポトーシス指数(TUNEL陽性)の減少が認められた(モデル作製後3,7日目)。さらに、心筋幹細胞(c-kitまたはSca-1陽性)の数も増加していた(モデル作製後3,7日目)。以上の結果から、メカニカルストレスの軽減によって、障害心臓

における内因性心筋再生が促進されることが示唆された。

②メカニカルストレスが移植した細胞に与える影響

両群の障害心の梗塞領域に心筋幹細胞(GFP陽性)を移植して細胞生着を調べた結果、対照群と比較して、メカニカルストレス軽減群では細胞生着が増加していることが分かった。また、細胞増殖(Ki67陽性)も増加していた。なお、今後、心筋幹細胞の分化成熟に関する検討も進めていく予定である。

(2) メカニカルストレスが心筋幹細胞に及ぼす影響 (in vitro での検討)

①細胞の生存、増殖、アポトーシスの評価

対照群では、細胞が不規則に唐草模様状に増殖した。一方、伸展群では培養24時間および3日において、対照群と比べ細胞密度が低く、さらに伸展方向に対して細胞が垂直に整列することが分かった。培養24時間および3日目の生存細胞数は、伸展群では対照群と比べ生存細胞数が有意に少なかった( $p<0.05$ )。

対照群と比較して、伸展群では心筋幹細胞の細胞増殖(Ki67陽性)が抑制される一方で、アポトーシス(TUNEL陽性)は増加していた。

②サイトカインと成長因子の分泌(パラクライン効果)の評価

メカニカルストレス負荷によってVascular endothelial growth factor(VEGF)、Fibroblast growth factor(FGF)、interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )などの液性因子の産生が増大していた。しかし、Insulin-like growth factor-1(IGF-1)やHepatocyte growth factor(HGF)といった細胞保護因子の産生は増加しなかった。さらに、幹細胞のホーミングに重要なStromal cell-derived factor-1(SDF-1 $\alpha$ )や血管成熟に重要なtransforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )の産生についても差は認められなかった。

③幹細胞と分化マーカーの発現の評価

対照群と比較して、伸展群におけるc-kitおよびSca-1陽性細胞率は有意に低かった。その一方で、troponin-I(心筋)陽性細胞率やSMA(平滑筋)陽性細胞率は、伸展群において有意に高値であった。CD31(内皮細胞)陽性細胞率は伸展群において低い傾向がみられたが、有意差は認められなかった。以上の結果から、伸展刺激によるメカニカルストレスは、心筋や平滑筋といった細胞への分化を促進すると考えられた。

(3) 総括

本研究によって、動物モデルの検討から、

メカニカルストレスが内因性心筋再生に関与することが示された。また、*in vitro*での検討を含めた検討から、メカニカルストレスが心筋幹細胞の増殖や分化、液性因子の産生などに影響を及ぼすことが示唆された。さらに、これらの影響は内因性心筋再生に寄与することが考えられる。

今後、メカニカルストレスに着目した内因性心筋再生のメカニズムについて、シグナル分子やパスウェイも含め、さらなる解析を進めていく予定である。

#### 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3件)

- ①Kurazumi H, Kubo M, Ohshima M, Yamamoto Y, Takemoto Y, Suzuki R, Ikenaga S, Mikamo A, Udo K, Hamano K, Li TS.

The effects of mechanical stress on the growth, differentiation, and paracrine factor production of cardiac stem cells.

*PLoS One*. 2011; 6(12): e28890.

(査読有)

- ②Li TS, Kubo M, Ueda K, Murakami M, Ohshima M, Kobayashi T, Tanaka T, Shirasawa B, Mikamo A, Hamano K.

Identification of risk factors related to poor angiogenic potency of bone marrow cells from different patients.

*Circulation*. 2009; 120(11): S255-S261.

(査読有)

- ③Kamota 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): 1814-1822.

(査読有)

[学会発表] (計3件)

- ①Kurazumi H, Li TS, Kubo M, Takemoto Y, Ohshima M, Mikamo A, Hamano K.

Mechanical stress suppresses the proliferation and improves the differentiation of cardiac stem cells and increases the release of

paracrine factors

The Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery (2012 annual meeting)

2012.3.11 Bali International Convention Center, Nusa Dua, (Bali, INDONESIA)

- ②藏澄宏之, 李 桃生, 工藤智明, 鈴木 亮, 久保正幸, 池永 茂, 白澤文吾, 美甘章仁, 濱野公一.

メカニカルストレスが心筋幹細胞へ及ぼす影響

第99回日本循環器学会中国地方会

2011.11.26 下関海峡タワー (山口県)

- ③藏澄宏之, 李 桃生, 池田 聡, 大島真子, 工藤智明, 竹本圭宏, 鈴木 亮, 久保正幸, 池永 茂, 白澤文吾, 美甘章仁, 濱野公一.

メカニカルストレスが心筋幹細胞へ及ぼす影響

第64回日本胸部外科学会定期学術集会

2011.10.11 名古屋国際会議場 (愛知県)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

美甘 章仁 (MIKAMO AKIHITO)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30372709

##### (2) 研究分担者

濱野 公一 (HAMANO KIMIKAZU)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60263787

林 雅太郎 (HAYASHI MASATARO)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00554057