

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：	15501
研究種目：	挑戦的萌芽研究
研究期間：	2011～2012
課題番号：	23659673
研究課題名（和文）	不全心における自己再生誘導因子の探索
研究課題名（英文）	Challenges to identify endogenous factors associating with cardiac regeneration in heart failure.
研究代表者	
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

研究成果の概要（和文）：実臨床において、重篤な心不全に陥った患者が多数存在し自然治癒することはほとんど期待できない。本研究では、補助心臓を有するマウス心筋梗塞モデルを用いて、心臓自己再生修復機能を誘導あるいは阻害する因子の同定を試みた。まず、C57BL/6 マウスの心臓に冠動脈左前下行枝（LAD）結紮による急性心筋梗塞を誘導後、梗塞心をレシピエントマウス腹部に移植し補助心臓モデルを作成した。このモデルでは心室重量の有意な増加、移植細胞の生着率向上が認められた。本研究で得られた知見は、心臓の自己修復能のみならず細胞移植効率に対するメカニカルストレスの影響を示し、新たな心臓再生療法の開発に役立つと思われる。

研究成果の概要（英文）：In clinical scenes, patients with severe heart failure show poor prognosis in spite of the capacity. Here, we investigate to identify factors associating with self-regeneration of adult heart using an assist heart mouse model. The left anterior descending coronary artery was ligated to make an acute myocardial infarction in mouse heart (C57BL/6), and then infarcted heart was transplanted into abdomen of recipient mouse. In this model, weight of ventricle was significantly increased and showed longer retention of transplanted cells in unloading group. Our results demonstrate effects of cardiac mechanical stress on not only self-regeneration capacity but also efficacy of cell transplantation into heart and are useful to establish novel therapeutic approach for cardiac regeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

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：心不全、心筋再生、補助心臓、メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

心筋再生を含め、従来の再生医療研究は様々な細胞（ドナー細胞）を傷害臓器へ移植する方法、いわゆる細胞移植治療が主流である。特に、自己骨髄細胞や心筋幹細胞を用いた心血管再生治療は既に臨床応用されている。研究代表者らもこれまでに骨髄幹細胞や心筋幹細胞などを用いた心血管再生治療に

関する研究に長年従事してきた（*Circulation*. 2003. 108: 1760-1765; *Circulation* 2005. 111: 2438-2445; *Stem Cells*. 2007. 25: 911-917; *Stem Cells*. 2010. 28: 1178-1185）。将来的には、ヒト iPS 細胞や ES 細胞を用いた再生治療が様々な難治性疾患の有効な治療法となる可能性がある。

これまで、肝臓や皮膚などの臓器・組織に

は自己再生修復能力があるが、心臓にはないと考えられてきた。しかし近年の研究により、心臓内にも心筋幹細胞と増殖能力を有する心筋細胞の存在が認められ、自己再生能力を有することが明らかとなった (*New Eng J Med.* 2001. 1344: 1750-1757; *Nature.* 2005. 433: 647-653)。しかしながら実際の臨床においては、自己再生修復能力を秘めているにも関わらず、重篤な心不全に陥った患者が多数存在し、自然治癒することはほとんど期待できない。その原因としては、加齢や障害心における内在環境の悪化などにより、自己再生修復機能の低下が考えられる。このような我々の仮説を支持する心臓外科の臨床例としては、Ventricular Assist Device (VAD) 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、VAD から離脱できる症例が散見することが挙げられる (*Circulation.* 1997. 96: 542-547)。また最近の研究で、細胞を移植せずに障害心の細胞外基質を制御することで、心筋再生が促進されることも報告されている (*Nat Med.* 2007. 13: 962-969)。さらに、我々のマウス心筋梗塞モデルを用いた研究でも、メカニカルストレスの軽減により心筋再生が促されることを明らかにしている (*J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007. 133: 1051-1058)。

2. 研究の目的

前述の研究背景を踏まえ、本研究では心不全患者における心臓自己再生修復機能を誘導あるいは阻害する因子を同定することを目的とした。目的を達成するために、VAD 装着した心不全患者の動物モデルとして、補助心臓を有するマウス心筋梗塞モデルを用い因子の同定を試みた。

本研究は、これまで主流であった移植ドナー細胞に関する研究とは一線を画す心臓自身の再生能に注目した研究である。それゆえ本研究は、心臓の自己修復能力を生かした画期的な心筋再生治療法の開発に結び付くことが期待される。

3. 研究の方法

(1) 動物

心筋梗塞モデル作成には 8-10 週齢の C57BL/6 雄マウス (日本 SLC 社) を用い、移植用ドナー心臓も同種・同週齢のマウスを用いた。また、心筋由来細胞の調整には、同週齢の GFP 発現マウス (*FEBS letter.* 1997. 407: 313-319) を用いた。

(2) 心筋由来細胞の調整

GFP 発現マウスより採取した心臓を適当な大きさに裁断し、トリプシン溶液に 5 分間つけたのちに、フィブロネクチンコートした細胞培養ディッシュに心組織片を静置した。

10%牛血清を含む IMD 培地で 2-3 週間培養し、心組織片からディッシュに移動した細胞を心筋由来細胞として、梗塞心へ移植した。

(3) マウス補助心臓モデルの作成

移植用ドナー心臓に冠動脈左前下行枝の結紮 (LAD 結紮) を 60 分間施し、心筋梗塞を誘導した。心停止液注入後、直ちに梗塞心を正常な心臓を有するマウス腹部に移植し、補助心臓モデルを作成した。この際、ドナー心 (梗塞心) の上行大動脈の吻合部をレシピエントマウスの腹部大動脈に、ドナー心の肺動脈をレシピエントの腹部大静脈に、それぞれつなげることで補助心臓移植を行った

(*Transplantation.* 1996. 62: 856-860) (下図)。

(4) 細胞移植

GFP 陽性の心筋由来細胞 (5×10^5 cells/心臓) を LAD 結紮により作成した梗塞心へ移植した。調整した GFP 陽性心筋由来細胞は、温めたリン酸バッファー (PBS) で溶解し移植直前まで保温した。

4. 研究成果

(1) 補助心臓マウスモデルの作出

心不全患者における心臓自己再生修復機能を誘導あるいは阻害する因子を同定するために、VAD 装着した心不全患者のモデルとして、補助心臓を有するマウス心筋梗塞モデルを作出した (下図)。

まず、GFP 発現心筋由来細胞を移植せず、

かつ LAD

結紮による

ドナー

心臓の梗

塞誘導を

施してい

ない状態

で、補助

心臓モデ

ルを作成

し、レー

ザードッ

プラー法

による血流評価により、移植 3 分以内に移植

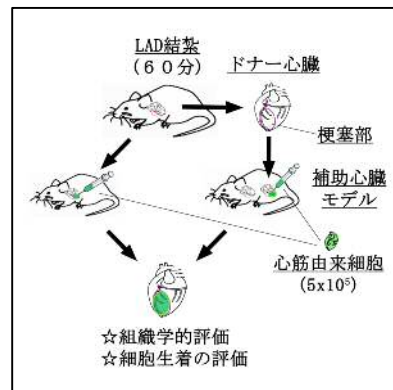
心の再灌流を確認した。また、組織切片作成

後の組織学的な評価により、心移植によるド

ナー心臓の損傷誘導が生じていないことを

確認した。これらの結果から、動物モデル作

出手技は確立されたと判断した。



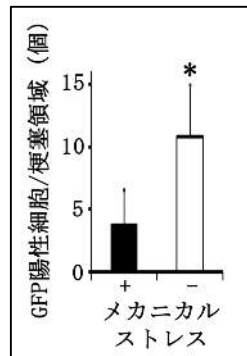
(2) メカニカルストレスの移植細胞生着に対する影響

続いて、メカニカルストレス軽減による移植細胞生着への影響について検討するために、梗塞心臓に GFP 発現心筋由来細胞を移植

(5×10^5 個/マウス)した(ドナー心)。このドナー心を正常なマウス腹部に移植し、心移植3日後にドナー心を採取した。採取したドナー心はホルマリン固定後に薄切し、GFPに対する免疫蛍光染色により移植細胞数を算出した(上図・右)。対象群として、メカニカルストレスを軽減していない梗塞心(メカニカルストレス \oplus)にGFP発現細胞を移植したものをを用いた(上図・左)。

梗塞部におけるGFP陽性細胞数は、補助心臓群(メカニカルストレス \ominus)で有意に多かった($p < 0.05$; 右図)。

これまでの研究では、梗塞心へ移植した細胞はアポトーシスにより3日以内にほぼ全てが脱落してしまうことが報告されている。それ故、本結果はメカニカルストレス軽減により、移植細胞の細胞死が抑制されたと推察される。



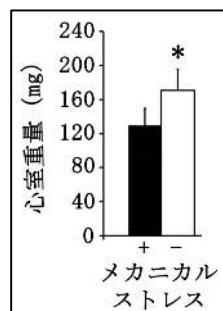
興味深いことに、Sca-1陽性/GFP陽性細胞(心筋幹細胞)数は、メカニカルストレス \ominus で有意に高かった($p < 0.05$)。このことは、メカニカルストレスが移植幹細胞の生着に影響を及ぼしていることを示唆している。一方、細胞増殖のマーカであるKi67に対する免疫蛍光染色を行ったところ、メカニカルストレス \ominus 群で有意に増殖細胞数が多かった($p < 0.05$)。この結果は、メカニカルストレスの軽減によって移植細胞生着性の増加と増殖能が維持されたことを示唆している。

(3) メカニカルストレス軽減による心筋再生への影響

メカニカルストレスの軽減により梗塞心における移植細胞の生存性が増加したことから、我々は実際に心筋再生が亢進していると考え組織学的にドナー心臓における心筋再生を評価した。

GFP発現心筋由来細胞を急性期の梗塞心臓に移植し、移植3日後および21日後にドナー心臓を回収した。移植3日後の心臓は心室部位を切除しその重量を測定し、また移植21日後の心臓は梗塞部位の壁厚の測定に用いた。

その結果、メカニカルストレス \ominus 群の心室重量はコントロール群と比較して有意に重く($p < 0.05$; 右図)、梗塞部位の壁厚の減少は認められなかった。メカニカルストレスの軽減による移植細胞の生着



性の向上と考え合わせると、本結果は細胞移植により心筋再生が亢進したと推察される。

本研究では、自己心筋再生を誘導する単一あるいは複数の因子を同定するには至らなかったが、一方で、メカニカルストレスが自己心筋再生誘導に深くかかわっていることが明らかとなった。近年、心筋細胞内の様々な因子がリガンド・受容体経路を介さずに心筋の拍動によって制御されることが示されている。本研究は、心臓の拍動(メカニカルストレス)が移植細胞の心筋再生能の維持に直接関わっていることを示したものであり、今後の自己心筋再生誘導因子探索に大きく貢献するものと期待される。

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1件)

- ① Kurazumi 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. (査読有り)

[学会発表] (計4件)

- ① 蔵澄宏之、李桃生、山本由美、西本新、久保正幸、濱野公一 メカニカルストレスが細胞移植による心筋再生療法に対して及ぼす影響 第11回日本再生医療学会総会 2012年6月12日 横浜 パシフィコ横浜
- ② 蔵澄宏之、李桃生、池永茂、白澤文吾、美甘章仁、濱野公一 心臓が発生するメカニカルストレスに着目した心筋再生療法に関する研究 第11回再生心臓血管外科治療研究会 2012年4月11日 秋田 秋田キャッスルホテル
- ③ Kurazumi H, Li TS, Kubo M, Ikenaga S, Mikamo A, Hamano K. Mechanical stress suppresses the proliferation and improves the differentiation of cardiac stem cells and increases the release of paracrine factors. ASCVTS 20th annual meeting. March 7, 2012. Bari, Indonesia.
- ④ 蔵澄宏之、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総会 2011年10月9日 名古屋 名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

李 桃生 (LI TAO-SHENG)

長崎大学・大学院医歯薬総合研究科・教授

研究者番号：50379997

美甘 章仁 (MIKAMO AKIHITO)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30372709