

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3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23790855

研究課題名（和文） 加齢によるヒト心臓内幹細胞の役割変化の包括的解析

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of the changes in role of cardiac progenitor cells during aging.

研究代表者

吉田 賢司（YOSHIDA MASASHI）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70532761

研究成果の概要（和文）：本研究では新生児と幼児ヒト心臓内幹細胞を対象として研究を行い、老化によるヒト心臓内幹細胞の役割変化を明らかにしてヒト心臓内幹細胞の心筋分化効率向上を試みた。幼児心臓内幹細胞は新生児心臓内幹細胞と比べすでに生体内で老化しており、心臓内幹細胞として扱った細胞は「前駆細胞」の性質をしていることが判明した。また新生児心臓内幹細胞は心筋分化を、幼児心臓内幹細胞は血管分化を生じやすくなっており、老化に伴い心筋細胞の再生能が低下していることが分かった。DNAマイクロアレイを用いることでIGF1受容体の発現が低下することにより心筋分化から血管分化を生じやすい性質に変化していることを突き止めた。

研究成果の概要（英文）：Aims of this study are to clarify the changes in role of cardiac progenitor cells (CPCs) during aging and to improve cardiogenic potential of those CPCs. We found that CPCs from human infant heart already became senescent when compared to those from neonates. This fact indicates CPCs possess potential of progenitor cells, not stem cells. Then we also found that CPCs from neonates had higher cardiogenic activity and CPCs from infants had higher angiogenic activity. DNA microarray analysis revealed that down regulation of insulin-like growth factor-1 receptor lead CPCs to have cardiogenic to angiogenic potential. Our results suggest a functional significance of IGF1R-mediated physiological alteration of human CPC differentiation potential.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心臓内幹細胞・老化・DNAマイクロアレイ・分子生物学

1. 研究開始当初の背景

重症心不全の予後は不良であり幹細胞移植による心筋再生療法は根治的な治療法として期待される。しかし幹細胞の心筋分化誘導効率は低く、臨床応用にあたっては問題となっている。

そもそもヒトの心臓は機能的に再生しない臓器であると考えられてきたが、近年ヒトの心筋細胞は少しずつ新しく入れ替わることが明らかとなった (Bergmann et al. *Science* 2009;324:98)。またマウスの心臓では心筋障害後に、心臓内幹細胞からの分化によって心筋細胞が新たに供給されることが報告された (Hsieh PC et al. *Nat Med* 2007;13:970)。これらのことから心臓は再生する臓器であると考えられる。現在ヒト及びマウス成体心臓内幹細胞を心筋梗塞モデルに移植することで低下した心機能は改善する (Takehara N et al. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1858, Johnston PV et al. *Circulation* 2009;120:1075)。しかしその機序は移植した成体心臓内幹細胞が心筋細胞に分化するよりも液性因子を介した細胞保護効果や血管新生作用が示唆されている。これらの結果からは成体心臓内幹細胞移植だけでは心筋を再生するには不十分であることが示唆される。また最近新生児マウス心臓内幹細胞は心筋細胞に分化するが、成体マウス心臓内幹細胞は心筋細胞に分化しないことが報告された (Zaruba MM et al. *Circulation* 2010;121:1992)。しかしヒトでは試料入手困難もあり加齢とともに心筋再生能力が低下するかどうか不明であり、なぜ成体心臓内幹細胞移植では心筋再生がほとんど認められないかわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では下記項目を中心に加齢により

老化したヒト心臓内幹細胞の機能低下の機序を解明し、心筋細胞への分化誘導効率を上げることで再生医療に必要な基礎的検討を行う。

(1) 加齢によるヒト心臓内幹細胞の老化の確認、および心筋分化能・血管新生能の変化の解析。

(2) ヒト心臓内幹細胞の老化による役割変化の機序を解明し、心筋分化効率を向上させる。

3. 研究の方法

ヒト心臓内幹細胞は研究協力者 (王) の報告した方法で精製する (Tateishi K et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;352:635)。

(1) 歴年齢の増加によるヒト心臓内幹細胞の老化の確認

① Real time quantitative telomeric repeat amplification protocol assay を用いてテロメラーゼ活性を定量的に評価。

② Flow-FISH (Telomere PNA Kit/FITC for Flow Cytometry, DAKO) を用いてテロメア長を測定。

(2) ヒト心臓内幹細胞の老化による心筋分化能・血管新生能などの変化の解析

① ヒト心臓内幹細胞をラット新生児心筋細胞と共培養し、新生児および幼児ヒト心臓内幹細胞の心筋細胞分化誘導効率を比較 (Smith RR et al. *Circulation* 2007;115:896)。

② 血管新生キット (In Vitor Angiogenesis Assay Kit Tube Formation, Cultrex) を使用し血管新生定量を行い、新生児および幼児ヒト心臓内幹細胞の血管新生能を比較。

(3) ヒト心臓内幹細胞の老化による役割変化の機序の解明

ヒト心臓内幹細胞の老化による役割変

化を認め、かつ心臓特異的転写因子の qRT-PCR の結果で差を示す代表的な新生児および幼児心臓内幹細胞に対して Agilent Technologies を用いて DNA Microarray を行う。得られた結果をもとに幼児心臓内幹細胞で増加する老化関連遺伝子、かつ差を示した心臓特異的転写因子を抑制する転写因子を、ヒト心臓内幹細胞の老化による役割変化の中核遺伝子の候補として選出。αMHC プロモーターに GFP レポーター遺伝子を組み込んだ幼児心臓内幹細胞に対して、各候補に対する siRNA を行い新生児ラット心筋細胞と共培養により GFP が発現する候補を同定する。

4. 研究成果

(1) ヒト心臓内幹細胞は新生児由来・幼児由来に関わらず、がん細胞と比べるとテロメラーゼ活性が低下していた。また新生児由来ヒト心臓内幹細胞は幼児由来ヒト心臓内幹細胞と比べてテロメア長が長かった。以上のことから、ヒト心臓内幹細胞は「前駆細胞」であり、生後も経時的に増殖・分化していると考えられる。

(2) αMHC プロモーターに GFP レポーター遺伝子を導入したヒト心臓内幹細胞と新生児ラット心筋細胞を共培養すると、新生児由来ヒト心臓内幹細胞の方が幼児由来よりも多く心筋様に分化していた。また Tube formation assay 用の gel でヒト心臓内幹細胞を培養すると、幼児由来ヒト心臓内幹細胞の方が新生児由来よりも多く管空を形成した。以上のことから新生児由来心臓内幹細胞は心筋分化に、幼児由来ヒト心臓内幹細胞は血管分化に容易であると考えられる。

(3) 上記(2)で判明したヒト心臓内幹細胞の役割変化を担う遺伝子群を同定するために DNA マイクロアレイを行った。すると新生児由来ヒト心臓内幹細胞は発生時期に心

臓形成において重要な遺伝子群が、幼児由来ヒト心臓内幹細胞では癌などで血管新生に重要な遺伝子群が多く発現していた。

(4) IGF-1R が新生児由来ヒト心臓内幹細胞で多く発現していることを確認。新生児ヒト心臓内幹細胞において siIGF-1R で IGF-1R をノックダウンすると、心筋分化効率が低下し血管分化効率が上昇することを確認。さらに上記(3)で認めた遺伝子群のうち、新生児由来ヒト心臓内幹細胞において IGF-1R をノックダウンすることで mRNA 発現量が変化する遺伝子 Tbx5 および HHIP を同定した。新生児ヒト心臓内幹細胞において siRNA で TBX5 をノックダウンすると心筋分化効率が低下し、HHIP をノックダウンすると血管分化効率が増加した。

以上のことから IGF-1R は加齢により減少し、IGF-1R の下流に存在する Tbx5 と HHIP がそれぞれ加齢に伴う心筋分化・血管分化の効率変化に重要な役割を果たしていることが示された。

本研究で用いたヒト心臓内幹細胞は、すでに心臓再生治療における細胞移植源として臨床試験で使用されている。そのヒト心臓内幹細胞の加齢による役割変化を明らかにしたことで、心筋分化効率を上げる選択肢が増える可能性があり、心臓再生治療の臨床応用につなが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3件)

- ① Ikeda H, Shiojima I, Oka T, Yoshida M, Maemura K, Walsh K, Igarashi T, Komuro I. Increased Akt-mTOR signaling in lung epithelium is associated with respiratory distress syndrome in mice. Mol Cell Biol. 査

読 有 , 31(5), 2011,
pp.1054-65. 10.1128/MCB.00732-10

- ② Akagi S, Nakamura K, Matsubara H, Fukushima Kusano K, Kataoka N, Oto T, Miyaji K, Miura A, Ogawa A, Yoshida M, Ueda-Ishibashi H, Yutani C, Ito H. Prostaglandin I(2) induces apoptosis via upregulation of Fas ligand in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. Int J Cardiol. 査 読 有 , doi: 10.1016/j.ijcard.2011.09.004. Epub 2011 Sep 28.

- ③ Kenki Enko, Kazufumi Nakamura, Kei Yunoki, Toru Miyoshi, Satoshi Akagi, Masashi Yoshida, Norihia Toh, Mutsuko Sangawa, Nobuhiro Nishii, Satoshi Nagase, Kunihisa Kohno, Hiroshi Morita, Kengo F. Kusano, Hiroshi Ito. Intermittent arm ischemia induces vasodilatation of the contralateral upper limb. J Physiol Sci. 査 読 有 , 61(6), 2011, pp.507-13. 10.1007/s12576-011-0172-9

[学会発表] (計3件)

- ① 吉田賢司, Transition in cardiogenic to angiogenic potential of human cardiac progenitor cells occurs with age, ISSCR 2012、2012年06月13日、横浜
- ② 吉田賢司, Hedgehog interacting protein controls age-dependent angiogenic activity in human cardiac progenitor cells through insulin-like growth

factor-1 receptor signaling, American Heart Association Scientific Session 2012、2012年11月03日、ロサンゼルス、カリフォルニア州、アメリカ合衆国

- ③ 吉田賢司, Both insulin-like growth factor-1 and -2 receptor control human cardiac progenitor proliferation and differentiation in children with congenital heart malformation, 2011 米国心臓協会学術集会、2011年11月15日、米国、オランダ

[その他]

ホームページ等

<http://cardio.icn.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 賢司 (YOSHIDA MASASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70532761