

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592067

研究課題名(和文)メカニカルストレスの変化に着目した新たな心筋再生療法

研究課題名(英文)Novel therapeutic strategy for heart failure focusing on mechanical stress

## 研究代表者

白澤 文吾 (SHIRASAWA, Bungo)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80444719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、補助人工心臓を植え込んだ重症心不全患者に対する細胞移植治療においてより高い細胞生着が得られる事実に着目し、メカニカルストレスの心筋幹細胞の動態に与える影響について検証した。進展刺激を与えたヒト心筋幹細胞では細胞生存性および増殖性が損なわれ、一方で、血管新生因子の産生は増加していた。またマウス異所性心移植モデルによるストレス軽減によって、梗塞心へ移植した心筋幹細胞の生着性増加と心筋再生が認められた。本研究の成果は、メカニカルストレスを軽減することで心筋細胞移植の効率が劇的に改善する可能性を示唆しており、新たな治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined whether mechanical stress affects a behavior of cardiac stem cells (CSCs), because of the fact that higher transplantation efficiency in heart failure patients with a left ventricular assist device. Cell viabilities and proliferation capacity were significantly decreased in stretch-induced human CSCs, while production of angiogenic factors were up-regulated. In addition, transplantation of CSCs into infarcted heart of haemodynamic unloading mouse models showed an increase of transplantation efficiency, resulting in heart regeneration. Taken together, our results indicate that inhibition of mechanical stress might improve an efficiency of cell-based therapy for severe heart failure.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：メカニカルストレス 進展刺激 心筋幹細胞 細胞移植治療

## 1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の「人口動態統計の概況」によると、平成 21 年の死亡総数のうち、心疾患による死者数は約 18 万人であり全体の 15.8% を占める。これは死亡総数に占める割合の第二位であり、最新の医療技術をもってしても依然として予後不良の状態が続いていると言わざるを得ない。

重症心不全に対する根本的治療法は心移植であるが、慢性的なドナー不足により現実的な選択肢とは言えない。この状況は、平成 20 年に臓器移植法が改正されてもほとんど変わりがなく、大きな課題である。一方、重症心不全に対する治療法として植え込み型補助人工心臓が保険適用されるようになり、患者にとっては朗報であると言える。しかし同時に、補助人工心臓植え込み患者数の今後の増加見込みは、すなわち、移植待機となる患者の増加を意味しており、ドナー心臓の需要と供給の不均一性に拍車をかけることとなる。

そうした中、国内外で補助人工心臓を装着した患者に対する細胞移植療法が相次いで実施され、心移植の代替治療法として期待されている。

## 2. 研究の目的

近年、本邦や米国において補助人工心臓装着患者に対する幹細胞や骨格筋芽細胞シートの移植による心筋再生療法が試みられ、心移植を補う新たな方策として注目を浴びている。しかしながら、補助人工心臓装着下の心筋において心筋再生療法の効果が促進されるメカニズムは定かではなく、そのメカニズム解明が進めばドナー心臓不足の改善に寄与するものと思われる。一般に、心筋の分化、成熟および再生にはメカニカルストレスが関与しているとされており、我々は補助人工心臓装着に伴う心臓のメカニカルストレスの変化が、心筋再生療法の効果促進のメカニズムの一つであると考えており、本研究では「心筋再生療法とメカニカルストレス」の関係性に注目して研究を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 心筋幹細胞の単離と維持

当院心臓外科において心臓手術を施行する患者に本研究の趣旨を十分説明し理解して頂いた上で、手術時に右房組織の一部を採取し研究に用いることに同意を得た。

開心術中に採取したヒト右房組織片を 1-2 mm<sup>3</sup> に細切し、コラゲナーゼ処理後にフィブロネクチンでコーティングした培養皿に静置した。培地には 10% ウシ胎児血清を含む IMDM を用い、二日に一度の頻度で培地交換することで約 1 週間維持した。組織片に由来する細胞を確認した後、70-80% コンフルエントに達するまで細胞を維持し、目的の細胞数に達した時点でトリプシンによる細胞の剥離および poly-D-lysine コートした培養皿へ

の再播種を行った。数日間培養すると、ヒト右心房由来細胞の中で、自発的に立体的なコロニーを形成する細胞が出現してくる。この細胞コロニーをタッピングにより剥離・回収し、再びフィブロネクチンでコーティングした培養皿に播種し、2 継代した細胞を心筋幹細胞として種々の実験に用いた (Li et al., *Stem Cells*. 2010: 参考文献 1)。

同様の手法を用いて、マウス心臓組織より心筋幹細胞を準備した。この際、全身で GFP を発現する GFP マウスより心臓を採取し、GFP 発現心筋幹細胞を調整した。

### (2) ヒト心筋幹細胞へのメカニカルストレス付加

ヒト右房より単離した心筋幹細胞をシリコン製の培養皿に播種 (1 x 10<sup>5</sup> cells/well) し、進展刺激装置 (ネッパジーン社製) を用いて進展刺激を与えた (60 回/分、20% の進展率)。

### (3) マウス異所性心移植モデルの作製

マウス (C57BL/6、10 週齢、オス) を麻酔・呼吸管理下で開胸し、冠動脈左前下行枝の結紮により心障害 (梗塞) モデルを作製する。結紮 60 分後に梗塞を施したマウスを「メカニカルストレス軽減群」と「対象群」の 2 群に分け、前者の場合は梗塞心を正常心臓を有する別のマウス腹腔内に移植する (Hamano et al., *Cell Transplantation*. 1996: 参考文献 2)。本モデルでは、腹腔内に移植した障害心はメカニカルストレスをほとんど受けずに拍動を続ける。両群ともに障害心梗塞部に心筋幹細胞を移植 (1 x 10<sup>6</sup> cells/heart) し、心筋再生治療を施す。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト心臓由来心筋幹細胞に対するメカニカルストレスの影響

ヒト心房組織により単離・培養した心筋幹細胞に *in vitro* ストレッチモデルを用いて進展ストレス (メカニカルストレス) をかけ、細胞生存性を検証した。その結果、進展ストレス 24 時間後、3 日後においていずれもメカニカルストレッチ群において有意な細胞数減少が認められた (図 1A)。この際、電気顕微鏡による形態変化を観察したところ、メカニカルストレッチ群においてより強い形態変化が認められた。これらの観察結果は、心筋幹細胞が外的なメカニカルストレスに対して反応性を示していることを表している。

続いて、メカニカルストレス条件下での細胞増殖能および細胞死について、Ki67 に対する免疫蛍光染色および TUNEL アッセイで検証した。先の細胞生存性の結果と一致するように、心筋幹細胞において有意なアポトーシス誘導が認められ、さらに細胞増殖能も低下していた (図 1B)。これらの結果を総合すると、メカニカルストレスは心筋幹細胞の動態に大きな影響を及ぼすことが示唆される。

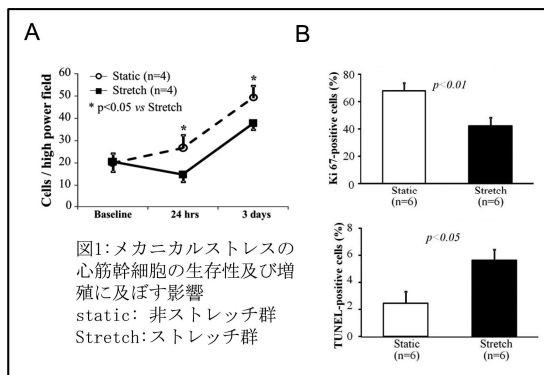


図1: メカニカルストレスの心筋幹細胞の生存性及び増殖に及ぼす影響  
static: 非ストレッチ群  
Stretch: ストレッチ群

## (2) メカニカルストレスによる液性因子発現への影響

次に、メカニカルストレスによる心筋幹細胞の液性因子産生能への影響を検証した。心筋幹細胞は、VEGF や bFGF などの血管新生促進因子を分泌することが知られている (Li et al., *Stem Cells*. 2010: 参考文献 1)。本研究では、メカニカルストレッチ 12 時間後に培養上清を回収し種々の細胞成長因子の産生量を非ストレッチ群と比較した。その結果、VEGF および bFGF レベルがストレッチ群において有意に増加していた。一方で、細胞生存性を高める因子である IGF-I や HGF レベルに変化はなかった (図 2)。

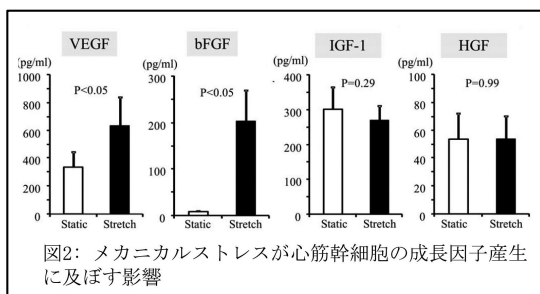


図2: メカニカルストレスが心筋幹細胞の成長因子産生に及ぼす影響

## (3) マウス異所性心移植モデルを用いたメカニカルストレスの心筋幹細胞への影響

これまでの研究で、メカニカルストレスが心筋幹細胞の動態に大きな影響を与えることを明らかにした。そこで、補助人工心臓の動物モデルであるマウス異所性心移植モデルを用いて、細胞移植治療におけるメカニカルストレスの影響について検証した。

メカニカルストレス軽減群においては、左室前壁厚の有意な肥厚および移植心筋幹細胞の高い生着率が認められた (図 3A, B)。こ

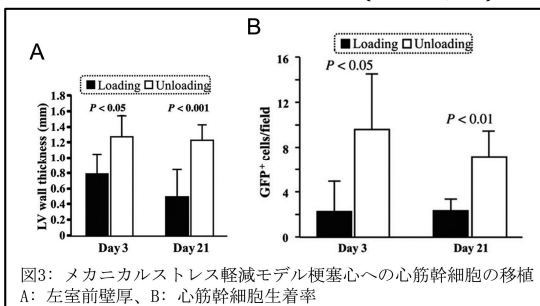


図3: メカニカルストレス軽減モデル梗塞心への心筋幹細胞の移植  
A: 左室前壁厚, B: 心筋幹細胞生着率

れらの結果は、メカニカルストレス軽減によって移植細胞の生存性が増し、結果として心

筋再生が誘導されたと予想される。この推察は、メカニカルストレス軽減群における Ki67 陽性細胞数の増加および TUNEL 陽性細胞数の減少 (図 4A, B) によっても裏付けられ、メカニカルストレスが細胞移植治療に大きな影響を及ぼしていることを示している。

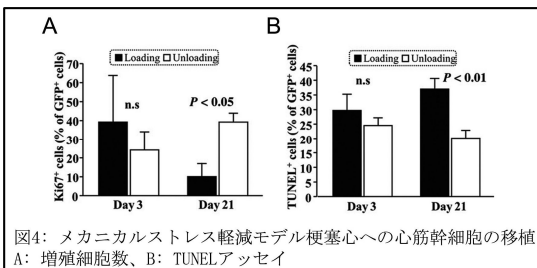


図4: メカニカルストレス軽減モデル梗塞心への心筋幹細胞の移植  
A: 増殖細胞数, B: TUNELアッセイ

## 【結論および考察】

本研究では、*in vitro* および *in vivo* の両側面からメカニカルストレスの心筋幹細胞動態に対する影響を検証し、特に動物モデルを用いた実験の成果は、補助人工心臓植え込み患者における細胞移植治療の高い効果のメカニズムの一端を示している極めて重要な結果である。

先に述べたように、重症心不全患者に対する細胞移植療法は心移植を補完する方法として期待されているが、移植細胞の生着性の低さをクリアしないことには臨床の標準治療法としては成り立たない。本研究では、不全心のメカニカルストレスを軽減することによって細胞移植効率が劇的に改善する可能性を示しており、今後の詳細な研究によって重症心不全患者に対する新たな治療法の開発につながると期待される。

## 【参考文献】

- Li TS, Cheng K, Lee ST, Matsushita S, Davis D, Malliaras K, Zhang Y, Matsushita N, Smith RR, Marbán E. Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair. *Stem Cells*. 2010; 28: 2088-2098.
- Hamano K, Rawsthorne MA, Bushell AR, Morris PJ, Wood KJ. Evidence that the continued presence of the organ graft and not peripheral donor microchimerism is essential for maintenance of tolerance to alloantigen

in vivo in anti-CD4 treated recipients.  
Transplantation. 1996. 62: 856-860.

#### 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: Tanaka Y, Mikamo A, Suzuki R, Kurazumi H, Kudo T, Takahashi M, Ikenaga S, Shirasawa B, Hamano K. Mortality and morbidity after total aortic arch replacement. *Ann Thorac Surg*. 2014. 97: 1569-1575. 査読有
- 2: Kurazumi H, Mikamo A, Kudo T, Suzuki R, Takahashi M, Shirasawa B, Zempo N, Hamano K. Aortic arch surgery in octogenarians: is it justified? *Eur J Cardiothorac Surg*. 2014. 46: 672-677. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

- 1: 藏澄宏之、美甘章仁、工藤智明、高橋雅弥、白澤文吾、濱野公一 「骨髄単核球を用いた心筋再生療法の現状」 第45回日本心臓血管外科学会総会 国立京都国際会議場 2015年2月16日(京都府・京都市)
- 2: Kurazumi H, Mikamo A, Kudo T, Suzuki R, Takahashi M, Shirasawa B, Hamano K. A new anastomotic option for severely calcified aortas: double-folded adventitial anastomosis. 28<sup>th</sup> European Association for Cardio-Thoracic Surgery Annual Meeting. 2014年10月12日 ミラノ市 イタリア
- 3: Kurazumi H, Mikamo A, Kudo T, Suzuki R, Takahashi M, Shirasawa B, Zempo N, Hamano K. Aortic arch surgery in octogenarians: Is it justified? 21<sup>st</sup> Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery. Kobe International Conference Center 2013年4月4日(兵庫県・神戸市)

- 4: 藏澄宏之、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 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
なし

#### 6. 研究組織

- (1)研究代表者  
白澤 文吾 (SHIRASAWA, Bungo)  
山口大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：8044719
- (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
- (3)研究分担者  
李 桃生 (TAO-SHENG, Li)  
長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授  
研究者番号：50379997