

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659381

研究課題名(和文) 内在性心筋幹/前駆細胞の分化誘導因子とニッチ構造の探索

研究課題名(英文) Research on differentiation factor and niche for cardiac stem/progenitor cells

研究代表者

永井 敏雄 (NAGAI, TOSHIO)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00334194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究期間内に、我々は新生心筋細胞を同定できる α -MHC MerCreMer/CAG-CAT-LacZマウスを用いて、心筋梗塞後の新生心筋細胞の一部は、細胞周期に入った内在性心筋幹/前駆細胞に由来する事を明らかにした。また、自己組織化ナノペプチド内で心筋前駆細胞を培養したグラフトを作成し、心筋梗塞後に α -MHC MerCreMer/CAG-CAT-LacZマウスに移植した。その結果、移植群において、心筋新生効果が高かった。次に、心筋組織切片からレーザーマイクロダイセクションにより心筋組織を採取し、LC-MS/MSを行い、心筋前駆細胞グラフト移植群で特異的に発現するいくつかのタンパクを同定した。

研究成果の概要(英文)：We generated α -MHC MerCreMer/CAG-CAT-LacZ mice to detect newly formed cardiomyocytes after myocardial infarction. We found that some of the new cardiomyocytes are derived from cardiac stem/progenitor cells after entering the cell cycle. Next we produced a three-dimensional thick scaffold, in which cardiac progenitor cells (CPC) were cultivated in combination with self-assembling peptide and transplanted CPC-scaffold on the surface of myocardial infarction area of α -MHC MerCreMer/CAG-CAT-LacZ mice. Transplantation of CPC-scaffold enhanced the formation of new cardiomyocytes. We dissected heart tissue sections by using a laser micro dissection system and then identified several proteins, which expressed exclusively in the transplanted heart.

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：分子心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

重症心不全の生存率は3年で約30%とその予後は極めて不良であり、心疾患は日本人の死亡原因の第2位を占めている。幹細胞を用いた再生治療は国内外を問わず新しい治療法として脚光を浴びており、特に、骨髄細胞、間葉系幹細胞、胚性幹(ES)細胞や誘導型万能(iPS)細胞は細胞移植治療の細胞ソースとして期待されている。しかし、近年の体性組織幹細胞による細胞移植治療の臨床試験では、心機能改善効果は報告間で一致を見なかった(N Engl J Med. 355:1274-7 2006, Circulation 117:1189-200 2008)。また、ES細胞やiPS細胞は残存する未分化細胞の残存、遺伝子導入を必要とする点など臨床応用には改善点がある。

申請者は、心筋細胞の分化機序を解明するために心筋に内在する幹/前駆細胞に着目し、Stem cell antigen-1(Sca-1)陽性細胞および心臓 Side Population(SP)細胞を単離し、オキシトシンにより自律拍動する心筋細胞に分化させることに成功した(J Biol Chem 279: 11384-91 2004, J Cell Biol 176:329-41 2007)。また、申請者はSca-1陽性心筋前駆細胞を移植すると、他の組織幹細胞を移植した場合に比較して優れた梗塞範囲縮小効果を有し、その機序として移植された心筋幹/前駆細胞の心筋組織への分化と、VCAM-1やVEGFなどのパラクライン因子による血管新生や抗アポトーシス作用が重要であることを明らかにした(J Clin Invest 119: 2204-2217 2009, J Mol Cell Cardiol 49:972-83 2010)。しかし、健常および病的な心臓において内在性心筋幹/前駆細胞から新生心筋細胞へ分化する動態を評価する方法は確立されておらず不明である。本研究テーマは、成体心臓の内在性心筋幹/前駆細胞の *in vivo* における増殖・分化の系譜を可視化して評価する点で独創的な研究である。本研究により、細胞移植により肺活化された内在性心筋幹/前駆細胞由来の新生心筋と、そのniche構造を特定でき、移植組織レベルでの遺伝子発現を解析することにより、心筋幹/前駆細胞の増殖・分化に必要な分子を同定できる。本研究の成果は、内在性心筋幹/前駆細胞分化誘導因子による新しい心筋再生治療法の確立の端緒となる。

2. 研究の目的

重症心不全に対する細胞移植治療が注目されているが、移植効果に内在性心筋幹/前駆細胞由来の新生心筋がどれほど寄与しているかは不明である。本研究では、1) 遺伝子改変マウスと核酸類似体による幹細胞標識法を用いて、内在性心筋幹/前駆細胞が増殖して成熟した心筋細胞へ分化する動態を評価する方法を確立する。次に、2) 心筋梗塞モデルマウスを用いて、細胞移植が実際に内在性心筋幹/前駆細胞由来の心筋新生を促進するか評価し、最後に、3) 心筋新生を促進する移植細胞由来のパラクライン因子と、新

生心筋のniche環境のkey moleculeを同定することを目的とする。本研究の成果は、内在性心筋幹/前駆細胞分化誘導因子による新しい心筋再生治療法の確立の端緒となる。

3. 研究の方法

(1) 細胞移植モデル

10-12週令のC57/BL/6Jマウスに50mg/kgのsodium pentobarbitalを腹腔内注射して人工呼吸器下に左前下行枝を結紮し急性心筋梗塞モデルを作成した。細胞外マトリックスの活性ペプチドモチーフを付与した自己組織化ナノペプチドゲル内で心筋前駆細胞を4週間三次元長期培養し、安定した心筋前駆細胞移植床を作成し、心膜腔内に移植した。

(2) 遺伝子改変マウス

ミオシン重鎖プロモータータモキシフェン誘導 Cre リコンビナーゼ発現マウス(Circ Res 89; 20-25: 2001)とCAG-CAT-LacZマウス(Biochem Biophys Res Commun 237; 318-324: 1997)を交配して-MHC MerCreMer/CAG-CAT-LacZマウスを作成した。戻し交配によりマウスの遺伝子背景はC57/BL/6Jとした。

(3) 核酸類似体による細胞標識方法

BrdUまたはEdU(50mg/kg, *i.p.*)を胎生期の細胞標識を目的として、妊娠16-18日のマウスに腹腔内注射した。心筋組織のBrdUは組織切片を10分間塩酸処理した後にBrdU抗体とMouse on Mouse Immunodetection kit(BMK-2200)を用いて染色した。EdUはClick-iT EdU Kit(Life Technologies)を用いて検出した。

(4) SP細胞単離および免疫染色

マウス心臓SP細胞は既報の方法で単離した(Methods Mol Biol. 1036;63-74: 2013)SP細胞の免疫染色は、CytoSpin Cytocentrifuge(Thermo Scientific)を用いてスライドグラスに接着後、4%パラフォルムアルデヒド内で10分間固定し、2%ロバ血清、2%牛血清アルブミン、0.2%Nonidet P-40(nacalai tesque)を含むPBS内で30分間ブロッキング処理後に行った。BrdU染色では標本を10分間塩酸処理した後に行った。

(5) 免疫組織染色

新鮮凍結切片は4%パラフォルムアルデヒド内で10分間固定し、2%ロバ血清、2%牛血清アルブミン、0.2%Nonidet P-40(nacalai tesque)を含むPBS内でブロッキング処理を30分間行った後に免疫染色を行った。ガラクトシダーゼの発現は免疫染色後の切片を、Xgal染色液(TaKaRa) 5mmol/L $K_3Fe(CN)_6$ 、5mmol/L $K_4Fe(CN)_6$ 、2mmol/L $MgCl_2$ 、0.01% sodium deoxycholate、0.01% NP40、20mmol/L Tris-HCl (pH7.3)を含むPBS内で20時間37℃の条件下で発色させた。

4. 研究成果

-MHC-MerCreMer/CAG-LacZ トランスジェニックマウスはタモキシフェン投与直後には alphaMHC promoter を介して、心筋細胞のほぼ 100% に beta-galactosidase が発現して X-gal 染色陽性となり、タモキシフェン投与後に認められる X-gal 染色陰性心筋細胞を新生心筋細胞として同定できる。妊娠中の親マウスに核酸類似体の BrdU を投与して仔の alphaMHC-MerCreMer/CAG-LacZ トランスジェニックマウスを標識し、12 週齢でタモキシフェン投与後に心筋梗塞を作成し、心筋梗塞後に EdU を投与して細胞周期に入った細胞を標識した。その結果、心筋梗塞境界部の新生心筋細胞に BrdU 陽性および EdU 陽性の心筋細胞が認められた。BrdU は細胞周期の遅い幹細胞由来の心筋細胞に相当し、心筋梗塞後には内在性心筋幹/前駆細胞の一部は細胞周期に入り、心筋細胞に分化することを示唆した。

RGD 配列を含むペプチドにより修飾された自己組織化ナノペプチドを用いた心筋前駆細胞 scaffold を心筋梗塞モデルマウスの心膜腔内に移植すると、非移植群に比較して梗塞部位に多くの血管新生が認められた。また、心筋前駆細胞 scaffold は移植後 4 週間後までに分解されるが、移植された red fluorescent protein 陽性心筋前駆細胞の生着が確認された。次に alphaMHC-MerCreMer/CAG-LacZ トランスジェニックマウスにタモキシフェン投与後に心筋梗塞を作成し、心筋前駆細胞 scaffold を移植した群と非移植群作成で新生心筋数を定量化したところ、細胞移植群では心筋新生が促進された。

心筋前駆細胞グラフト移植 4 週間後に心筋組織切片を作成して X-gal 染色により心筋新生効果を評価し、非移植対照群に比較して心筋新生効果が高い部位を確認した。次に、心筋前駆細胞グラフト移植群と非移植群の心筋組織切片からレーザーマイクロダイセクションにより心筋組織を採取した。採取した心筋組織をサンプル調整し、LC-MS/MS (ショットガン分析) を行い、測定データを解析して心筋前駆細胞グラフト移植群と非移植群で同定した蛋白を比較検討した。心筋前駆細胞グラフト移植群でのみ同定された蛋白には、代謝関連酵素、膜表面蛋白、細胞骨格関連蛋白が含まれていた。

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 4 件)

Nagai T, Matsuura K, Komuro I. Cardiac side population cells and Sca-1-positive cells. *Methods Mol Biol*. 査読無 1036, 2013, 63-74. DOI:10.1007/978-1-62703-511-8_5

Ozasa Y, Akazawa H, Qin Y, Tateno K, Ito K, Kudo-Sakamoto Y, Yano M, Yabumoto C, Naito AT, Oka T, Lee JK, Minamino T, Nagai T, Kobayashi Y, Komuro I. Notch activation mediates angiotensin II-induced vascular remodeling by promoting the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res*. 査読有, 36, 2013, 859-865. Doi:10.1038/hr.2013.52
Naito AT, Sumida T, Nomura S, Liu ML, Higo T, Nakagawa A, Okada K, Sakai T, Hashimoto A, Hara Y, Shimizu I, Zhu W, Toko H, Katada A, Akazawa H, Oka T, Lee JK, Minamino T, Nagai T, Walsh K, Kikuchi A, Matsumoto M, Botto M, Shiojima I, Komuro I. Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell*. 査読有 149:1298-313, 2012. Doi:10.1016/j.cell.

Nagai T, Komuro I. Gene and cytokine therapy for heart failure: molecular mechanisms in the improvement of cardiac function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 査読有 303:H501-12, 2012. Doi:10.1152/ajpheart.00130.

[学会発表](計 8 件)

李 鍾國 細胞動員の制御による心臓修復治療 第 13 回日本再生医療学会 2014 年 3 月 4-6 日 京都

永井敏雄 心筋再生治療の可能性 第 17 回日本心不全学会 2013 年 11 月 28-30 日 大宮

小室一成 心臓の再生治療の可能性 第 12 回日本再生医療学会 2013 年 3 月 21 日 横浜

Liu ML, Anti-inflammatory Peptides Secreted from Cardiac Progenitor Cells Ameliorates Cardiac Dysfunction after Myocardial Infarction. American Heart Association 2012 Scientific Session, 2012 年 11 月 3-7 日, Los Angeles USA

Kanda M, A Genetic Fate-Mapping Study Shows That Leukemia Inhibitory Factor Stimulates Cardiac Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Renewal After Myocardial Infarction. *Basic Cardiovascular Science* 2012 Scientific Sessions, 2012 年 7 月 22-26 日, New Orleans, USA

神田真人 Leukemia Inhibitory Factor (LIF) は心筋幹細胞の増殖をうながし、心筋梗塞後における心筋再生を促進する 第 33 回 日本炎症・再生医学会 2012 年 7 月 5-6 日, 福岡

Takahashi T, Brown adipose tissue derived-cells differentiate into cardiac conduction and pace-maker

cells in vitro and improve complete AV block in vivo. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting, 2012年6月13-16日, 横浜
神田真人 Leukemia Inhibitory Factor (LIF)は心筋幹細胞の増殖を介し、心筋梗塞後における心筋再生を促進する 第49回日本臨床分子医学会学術集会 YIA 2012年4月13-14日 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 敏雄 (NAGAI TOSHIO)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：00334194