様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月 １８ 日現在

機関番号：３４４１７
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５４６０９１７

研究課題名（和文）多能性ヒトMesoangioblastのoriginと効果的心筋分化誘導法の解明

研究課題名（英文）The induction of efficient cardiac differentiation of human multipotent mesoangioblasts

研究代表者
岩崎　真佳（IWASAKI, Masayoshi）

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：３０５４８７０６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：我々はごく最近mesoangioblast（MAB）が心臓カテーテル検査中にヘパリンによって末梢循環中へ動員される事を見いだした（論文作成中）。今回の研究の目的は①MABのoriginと生体内での分布を検討すること（ヒト、マウス）②cMABの効率の良い心筋分化誘導法を検討する事である。①に関しては、心臓カテーテル中に複数箇所での同時血液サンプリングの結果、cMABが心臓由来である可能性が濃厚となった。確証を得るため、海外・国内で共同研究（ヒト、マウス）を画策したが人事異動、突然の施設規定改変で中止となった。②に関してはiPSCsの心筋分化誘導時に酷似した状態まで誘導し得たが、拍動せず。

研究成果の概要（英文）：Very recently, we identified circulating mesoangioblasts (cMABs), a subset of mesenchymal stem cells that co-express cardiac mesodermal markers from the patients undergoing cardiac catheterization. Here, we explored #1: where cMABs come from and #2: how we can induce cardiac differentiation of cMAB efficiently.
#1. Fist, we examined patients undergoing cardiac catheterization. We simultaneously obtained blood samples from aortic sinus (Ao), coronary sinus (CS: drain of the blood perfusing heart) and right atrium (RA) and compared the number of obtained cMAB colonies among those three different points. We confirmed that the heart is predominant niche of human cMABs. For further confirmation, we planed 2 clinical and 1 experimental studies. However, these studies were stopped by unexpected situations. #2. We tested several medium and matrix. Finally cells (MABs) were quite similar to iPSCs after induction of cardiac differentiation, however we could not see beating MABs.

研究分野：循環器内科学

キーワード：幹細胞動員

１．研究開始当初の背景

心不全患者の予後はβ遮断剤の投与によりある程度改善されたものの、いまだ極めて不良であり、新しい治療法の開発は急務である。幹細胞・前駆細胞療法はひとつの有望な治療方法であると考えられ、新たなポテンシャルが高く、かつ腫瘍形成能を有さない細胞、そして臨床応用がより容易である細胞の発見は重要な課題の一つである。

２．研究の目的

われわれがCirculation Researchに報告したhuman multipotent circulating mesoangioblast (KoyanagiM*, Iwasaki M* (*: equally contributed) et al. Circ Res 106: 1290-302, 2010.)は末梢血中に存在し、骨髄細胞よりも高い増殖能、分化能を有していると考えられる。前年度までに（若手研究B）ヒトにおいて心臓カテーテル検査中にヘパリンが血漿HGF 濃度の上昇を介して容量依存性にcMAB を末梢血中へ動員する事を見いだした。今回の検討では①cMABのoriginと生体内での分布を検討すること（ヒト、マウス）② cMABの効率の良い心筋分化誘導法を検討する事が目的である。

３．研究の方法

（1）cMAB の origin と生体内での分布を検討すること（ヒト、マウス）
心臓カテーテル検査中に同時に複数箇所で血液サンプリングを行い検索を開始する。また、当初は国外施設との共同研究で性不一致心移植を行った患者においても血液サンプリングを行い、cMAB の niche としての心臓の役割を検討することを予定していた。

（2）cMAB の効率の良い心筋分化誘導法を検討する事
いろいろなメディウム、マトリックス、添加因子を検討する。

４．研究成果

もともと私たちは開心術中の患者血中から MAB を単離する事に成功した。そしてこれまでの私たちの研究でこの MAB の開心術中における循環血中への動員には hepatocyte growth factor (HGF)が強く関与している事がわかっている。その後、心臓カテーテル検査を行っている最中の患者での検討結果からヘパリンは容量依存性に血漿 HGF 濃度を上昇させ、再現性を持って MAB の末梢血中への動員を誘導するには 300 単位のヘパリン投与（開心術の際に用いられる投与量）が必要であることが示された。私たちとしては MAB の動員に開心術は必要なく、心臓カテーテルで十分であるという結果は喜ばしいものであったが、300 単位のヘパリン投与が必要であるということは決して喜ばしい事ではなかった。

そこで今回、25 年度には、ヘパリン投与量を減量する事は出来ないか？ということから検討を始める事にした。上述したように MAB の循環血中への動員には HGF が強く関与している事がわかっているので、まず始めに、私たちは開心術中の血漿 HGF 濃度とヘパリン投与後の血漿 HGF 濃度を比較検討した。すると、ヘパリン 100 単位投与後の血漿 HGF 濃度は開心術中の血漿 HGF 濃度とほぼ同等である事が判明した。これはヘパリン 100 単位（心臓カテーテル検査時の投与量）でも十分な MAB の動員が誘導可能である可能性を示唆する。この結果を得て、次に私たちは開心術時と心臓カテーテル検査時の手技の違いを比較検討し、心臓カテーテル検査時の手順を調整したところ 100 単位のヘパリン投与（心臓カテーテル検査時の投与量）でも 300 単位のヘパリン投与と同等もしくはそれ以上の MAB の動員が誘導可能であることが判明した。

26 年度以降は、その新しいプロトコールを使用し獲得できたヒト MAB を使用し、効率の良い心筋分化誘導法の検討を開始した。また、一方で心臓カテーテル中に血液サンプリングを同時に複数箇所で行う事で MAB の生体内での分布の検討を始めた。

（１） MAB の origin と生体内での分布を検討すること（ヒト、マウス）に関して

以前の私たちの開心術中の患者データからMABが心臓由来である可能性が示唆されていたため、今回の検討では、特に心臓に焦点をおいて検討を開始する事とした。実際には、心臓カテーテル検査中に大動脈弁レベルと冠静脈洞、そして右心房の３カ所において同時に血液サンプリングを行い、そこから得られた末梢血単核球分画の細胞を培養し、獲得できたMABのコロニーの数を比較検討した。この検討において、もし大動脈弁レベルと比較し冠静脈洞で得られたサンプルで有意なMABのコロニーの数の増加を認めれば、MABは心臓由来である可能性が非常に高くなる。逆に大動脈弁レベルと比較し右心房で得られたサンプルで有意なMABのコロニーの数の増加を認めれば、MABはその他の臓器由来である可能性が非常に高くなる。結果的に、大動脈弁レベルと比較し冠静脈洞で得られたサンプルで有意なMABのコロニーの数の増加を認めたが、一方で、大動脈弁レベルと比較し右心房で得られたサンプルで有意なMABのコロニーの数の増加を認めなかった事から、MABは心臓由来である可能性が非常に濃厚となった。

MABが心臓由来であるというより確実な証拠をヒトにおいて得るため、性不一致の心臓移植を受けた患者での心臓カテーテル中の血液サンプリングを行う事を考えた。獲得できたMABにおいてFISHを行い、性別を検討することでMABの由来を知る事ができる。実際には私の留学先であったドイツフランクフルト大学のStefanie Dimmeler教授の仲介で、ドイツ ギーセン大学との共同研究を画策し、倫理委員会をつかした後、研究が始動したが、担当医師（私のフランクフルト大学時代の研究同僚：Dr. Stefan Rupp）の急な退職と開業でプランは暗礁に乗り上げてしまった。そこで国内施設との共同研究を画策したが、その際には倫理委員会の許可を得る事ができず、ヒトにおける検討は断念した。

ヒトでの検討が難航する一方で、マウスでの検討の可能性が浮上した。MABが発現している細胞表面マーカーのリポーターマウス（論文未発表）を海外施設（ドイツ）が所有している事が判明した。共同研究を提案したところ、マウスを譲渡していただけることになったが、当施設の動物センターの規定変更により海外施設を含めた施設外からのマウスの搬入は特定の業者を除いて胚化が必須となった。この施設ルールの変更によって譲渡していただける予定だったマウスは譲渡できないことになってしまった（現在も当施設内で規定の改善を求めて討議中)。

よって、心臓カテーテル中の複数箇所での同時血液サンプリングの結果のみで論文を作成中である。

（２） MAB の効率の良い心筋分化誘導法の検討に関して

様々なマトリックス、薬剤を試み、現時点では induced pluripotent stem cells に心筋分化誘導を行った状態に酷似した状態まで MAB を誘導する事が出来ているが、MAB が自発的に拍動するまでにはいたっていない。

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）

〔学会発表〕（計　１件）
①発表者名：秦　嘉亮、岩崎　真佳、塩島　一朗　他
発表標題：Heparin induces the mobilization of heart-derived human multipotent circulating mesoangioblasts during cardiac catheterization.

学会名：第 78 回日本循環器学会学術集会

発表年月日 2014 年 3 月 21-23 日

発表場所：東京国際フォーラム（東京）

６．研究組織
(1)研究代表者
岩崎　真佳（IWASAKI Masayoshi）

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：30548706

(2)研究分担者
(　　　)

研究者番号：

(3)連携研究者
塩島　一朗（SHIOJIMA Ichiro）
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：90376377