

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461069

研究課題名(和文)心房利尿ペプチドを導入した自己心筋幹細胞を用いた心不全治療

研究課題名(英文) Novel strategy for heart failure treatment with recombinant atrial natriuretic peptide-induced cardiac progenitor cells

研究代表者

稲葉 博隆 (INABA, Hirotaka)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10511454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：心房利尿ホルモン(ANP)は心臓から分泌されるホルモンであり、合成ANPは心不全治療に使用される。しかしながらこの薬剤は静脈投与薬のみであるため長期使用は難しい。本研究はANPをヒト心房筋由来細胞に導入することにより、徐放的に効果を発揮させることを目的とした。心房筋由来細胞にANPを投与すると、通常酸素培養下では細胞増殖能が低下、成熟心筋は減少し、幹細胞の発現が上昇した。低酸素下では細胞死が抑制され線維化が減少し、また心筋や血管新生が誘導された。これらのことからANPは通常酸素では細胞を未分化の状態に保ち、低酸素においては心筋や血管に分化誘導させる方向に働くことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Atrial natriuretic peptide (ANP) is a hormone secreted by cardiomyocyte. Recombinant human ANP was used for chronic heart disease. However, the usage is limited only short term, since this drug is available only as an injection. The aim of this study is prolong the effect by induction ANP into atrium-derived culture cells to enhance the therapeutic effect for the ischemic heart disease.

When induction of ANP into cell medium at normoxia condition, the proliferation of the cells was reduced. The expression of stem cell marker was increase instead of mature cardiac marker was reduced. When induction of ANP at hypoxia condition, more cells survived compared with those in normal medium. In addition, the expression both of cardiac marker and vascular marker was increased, suggesting ANP has a role to induce differentiation of cardiac progenitor cells when the cells were exposed to hypoxia.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：心房利尿ペプチド 心筋幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、薬剤治療やカテーテル治療の進歩に伴う適応の拡大などから、外科的手術（冠動脈バイパス術：CABG）となる虚血性心疾患は急速に重症化しており、心筋障害がより進展した病態である虚血性僧帽弁閉鎖不全症に対する僧帽弁手術や、左室形成術などの複合手術が必要な CABG 症例が増加している。これらの疾患群は、術前から心機能が大幅に低下していることが多く、血行再建のみで良好な予後を得るのは難しいと考えられている。

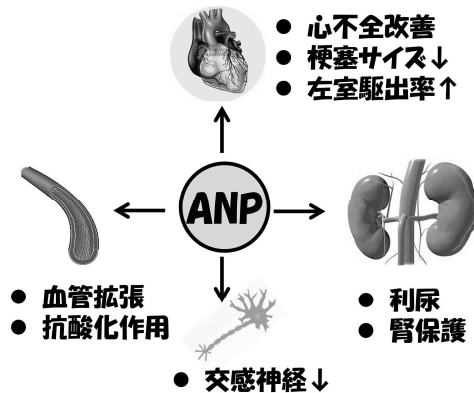
心筋幹細胞治療への期待と限界

一方、血行再建後のさらなる心機能改善のため近年自己心筋幹細胞を用いた細胞治療が注目を浴びている。最近には、共同研究者が所属していた研究室から血行再建における心筋幹細胞治療の臨床における安全性と有用性が示され（Makkar et al, Lancet 2012）今後の臨床応用に大きな期待が寄せられている。しかし同時に重症の心筋梗塞症例においては心筋幹細胞の投与のみでは不十分であることも示唆された。

ANP の多様な効果

1984 年に発見された心房由来の利尿ホルモンである ANP は、1995 年に注射剤（ハンブ®：一般名 カルペリチド）が発売され、以後臨床において幅広く使用されている。近年カルペリチドはその血管拡張作用、利尿作用に加え、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系抑制作用、交感神経系抑制作用なども持つことが示され、さらに最近では抗酸化作用も示唆されるなど、心筋保護作用、腎保護作用を含めた多彩な薬理作用を有することがわかってきた。実際、急性心筋梗塞症例における検討では、梗塞サイズが有意に縮小し、慢性期の左室駆出率が有意に改善されることが示されている。これらのことから日本循環器学会の急性心不全治療ガイドライン（2007）では、急性心原性肺水腫治療における Class IIa 推奨の薬剤に指定され、今後の

適応がさらに広がることが予想される。



このことから血行再建後（CABG 後）にさらにカルペリチドの投与を行うことにより、より効果的な心機能改善が期待される。しかしながらリモデリング抑制のためには長期の投与が必要であるが、カルペリチドには点滴静注薬しかなく、長期投与のためには入院の長期化が避けられない。当院での重症虚血性心疾患患者の術後在院日数は、複合手術を施行された症例でも平均 18.8 日であり、術後の社会復帰を考慮すると、この期間を超えた治療は外来で行う必要がある。実際に外来通院でのカルペリチド投与の試みも報告されているが、カルペリチドは循環動態に影響する薬剤であることから、点滴投与の間はモニター管理が必要である。さらに、カルペリチドの半減期が約 2 分であり、外来での短時間投与における効果についても疑問を投げかけざるを得ない。

2. 研究の目的

今回われわれは、このような患者に対し長期にわたり ANP を投与する方法として自己細胞の自家移植治療の可能性を考えた。すなわち ANP を分泌する状態に修飾された心房筋由来心筋幹細胞を自家移植することにより、ANP の長期持続投与を図ろうというものである。この治療法は心機能の低下した重症虚血性心疾患における、手術と再生治療のハイブリッド療法という治療戦略としての確立が期待される。本研究においては、培養した

ヒト由来の心房細胞に ANP を導入、その細胞の持つ性質がどう変化するかを検証する。カルペリチドが臨床に導入されてからその多様な薬理作用が次々に明らかにされている。しかしながら、同薬剤は持続点滴静注でのみ使用可能であるため、長期の持続投与の有効性についての検討はほとんどなされていない。本研究では、長期にわたる継続的な投与を本来の ANP 産生細胞である心房筋由来の心筋幹細胞の自家移植によって行うことを試みる。ANP は心不全など心筋が過伸展する際に分泌されるホルモンであり、その血中濃度と心不全の程度は相関することが知られている。しかしながら慢性心不全の症例では心房筋がホルモン分泌組織としての機能を失い、ANP が枯渇してしまうことがたびたび見受けられる。今回、ANP 分泌型心筋幹細胞を利用することにより、心房筋の ANP の産生能を再賦活化させられるのではないかと期待している。さらに、ANP 産生幹細胞投与を行うことにより、周囲へのパラクライン効果により、ANP の抗酸化作用・細胞の保護作用から、投与した幹細胞としても生存に有利な周辺環境になることが予想され、幹細胞の生着率の増加も見込まれる。結果的に、さらなる ANP が産生されることより全身的な効果(腎機能保護、交感神経抑制など)の増強などさまざまな相乗効果が期待される。また、長期に心筋保護効果のある ANP が体内で分泌されれば、RAA 系の阻害薬である ACE 阻害剤などとの相互作用で、心筋のリモデリング予防効果のさらなる増幅効果が期待される。

3. 研究の方法

まずヒト心房筋由来細胞を準備した。初回開心術症例において左心耳縫縮術時に切除される心臓組織から細胞を培養した。組織を心筋保護液に入れ、研究室に移送する。組織を一片 0.5mm 角になるようトリミングし、フィプロ

ネクチンにてコーティングした 100cm² 培養ディッシュに 100 個程度組織を並べていき培養を開始した。培養開始時には組織が浮遊しないよう培養液を 2ml のみくわえ、組織が乾燥しないよう 4 時間後にさらに 1ml 加える。翌日(24 時間後)培養液を交換する。その後は 3 日おきに交換しコンフルエントになるまで培養を行う。コンフルエントになったら細胞を剥離、セルストレーナーを用いて残った心筋組織を取り除き、細胞のみを 75cm² のフラスコ内に移動し培養する。心筋幹細胞マーカーである c-Kit 陽性細胞を FACS にてソートし、これをさらに培養した。

得られた細胞をディッシュにまき、これを 2 日間培養する。2 日目にヒトリコンビナント ANP(ハンブ®)を 1×10^{-9} (mol/L) から 1×10^{-5} (mol/L) の濃度に振り分け培地に混入した。混入前、2 日後および 5 日後にそれぞれ細胞を剥離し、細胞数をカウントするとともに RNA を抽出し 2step の RT-PCR を行い、細胞がどのように変化したかを観察した。

ついで細胞を低酸素インキュベーターに移送し低酸素(3%酸素)下で培養する。同様に 3 日間培養した後、細胞を剥離し細胞数をカウントするとともに、RNA 抽出後 RT-PCR を行い、細胞の変化を検討した。

4. 研究成果

ヒト心房筋由来細胞に含まれていた c-kit 陽性細胞は 1.5%であった。この細胞に通常酸素下にてハンブを投与し 3 日間培養を行うと、ハンブ 10^{-9} (mol/L) 投与では細胞数の変化は見られなかったが 10^{-8} (mol/L) 以上では濃度の上昇に伴い細胞数が減少した。3 日後における細胞数の変化率はそれぞれ、コントロール(CTL) = 3.6 倍, 10^{-9} = 2.7 倍, 10^{-6} = 1.6 倍であった。なお 10^{-5} mol/L 以上の濃度では 3 日目にハンブの結晶が認められたためこの濃度では不適である可能性が考えられ、除外した。次いで八

ンプ投与における遺伝子発現の変化を非投与群と比較検討を行った。ハンプ投与 (1×10^{-7} [mol/L]) によりトロポニン T は 0.32 倍、PECAM1 は 0.54 倍と減少した。一方で幹細胞マーカーである c-Kit の発現は 1.25 倍と上昇した。このことから ANP は細胞の分化・増殖を抑制し、むしろ未分化の状態に誘導させる働きがあることが示唆された。次いで、細胞を 3% の低酸素下で培養を行った。すべての群で細胞数は通常培養よりも減少したものの、その減少率はコントロールや低濃度ハンプ投与群に比べて高濃度ハンプ投与群で有意に低く (10^{-9} = 1.3 倍, 10^{-6} = 1.6)、低酸素に対して耐用があることが示唆された。興味深いことに高濃度ハンプ存在下においては、トロポニン T が 1.50 倍、ミオシン重鎖は 2.70 倍と心筋タンパクの発現が上昇し、同時に PECAM が 5.65 倍、VEGF-2 受容体の発現も 3.76 倍と上昇が認められた。一方で VEGF α の発現は 1.03 倍と有意な上昇は認めなかった。さらに線維化マーカーであるコラーゲンは 0.81、TGF- β 1、- β 2 もそれぞれ 0.52、0.56 と発現の低下を認め、抗線維化作用が示唆された。一方で抗炎症性サイトカインの発現を測定したところ、TNF α は 0.54 倍、IL-1 β は 0.41 倍と有意に減少していたものの、IL-6 は 2.19 倍とむしろコントロール群に比べて高値であった。現在は in vivo による検討が進行中である。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲葉 博隆 (INABA, Hirotaka)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：10511454

(2) 研究分担者

松下 訓 (MATSUSHITA, Satoshi)
順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20407315

(3) 連携研究者

天野 篤 (AMANO, Atsushi)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：70338440

山本 平 (YAMAMOTO, Taira)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：70401504

桑木 賢次 (KUWAKI, Kenji)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：90398313