

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861229

研究課題名(和文) 梗塞心筋における組織内環境の改善による自己再生能力の増強と細胞移植治療への応用

研究課題名(英文) Haemodynamic unloading increases the survival and affects the differentiation of cardiac stem cells after implantation into an infarcted heart

研究代表者

藏澄 宏之 (KURAZUMI, Hiroshi)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50645116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞治療は、障害を来した臓器に細胞を移植し臓器機能の回復を促す治療である。障害心筋に対する細胞治療には期待が寄せられているが、現在のところ治療効果が限られており治療効果の向上が望まれる。我々は、組織環境因子の制御が細胞治療の治療効果に影響していると考えており、本研究では、組織環境因子の制御と細胞治療との関係性について調査した。メカニカルストレスを軽減した心臓において、移植細胞が多く生着しており、幹細胞性も維持されていた。組織環境因子の制御が再生医療の治療効果に影響を及ぼすことが判明した。

研究成果の概要(英文)：It has been anticipated that stem cell therapy is capable of repairing an injured heart but is currently limited by its marginal efficacy. We believe that mechanical stress due to haemodynamic loading may negate the therapeutic potency of stem cells and therefore investigated how haemodynamic unloading affects the survival and differentiation of stem cells after implantation into an infarcted heart. Haemodynamic unloading favours the survival/engraftment of donor stem cells and affects their differentiation after implantation into an infarcted heart. Although further studies in a large animal model are required to investigate the functional benefits of haemodynamic unloading on stem cell therapy, we may temporarily unload the damaged heart to enhance cell engraftment and then load the heart again to induce the differentiation of stem cells.

研究分野：再生医療

キーワード：心筋再生

1. 研究開始当初の背景

現在の再生医療は、再生の源となる様々な細胞(ドナー細胞)を移植し障害臓器を再生させる「外因性再生」が主流である。将来的にはES細胞やiPS細胞を用いた臓器再生治療が難治性疾患の有効な治療法になることが期待されており、既に膵島細胞移植による糖尿病治療や骨髄由来幹細胞移植による心不全治療など、一部の外因性再生治療法は臨床試験の段階に入っている。当教室も、これまで胎児心筋細胞、骨髄幹細胞、心筋幹細胞などを用いた心筋再生に関する基礎および臨床研究に従事してきた(Circulation. 2003;108:1760-5. Circulation. 2005;111:2438-45. Stem Cells. 2007;25:911-7)。

外因性再生において、障害臓器に移植されたドナー細胞の生存・増殖・成熟などの効率はその成否を左右する。ところが、ドナー細胞の組織での生存率は極めて低く、移植後4日目には0.5%以下とも報告されている(J Mol Cell Cardiol. 2008;45:554-66)。生着率不十分の原因として、「ドナー細胞の機能低下」(J Thorac Cardiovasc Surg. 2010;139:459-65. Circulation 2009;120:S255-61)や、「障害臓器における組織の破壊・炎症などによる内的環境の変化」が関与している可能性があり、我々は虚血組織中に上昇する炎症性因子が骨髄幹細胞の生存と分化に影響することを証明してきた(Circ J. 2008;72:2075-2080)。

近年、心臓や脳を含めたほとんどの臓器に組織特異的な幹細胞が残されており、組織障害に際して分化・増殖して自己再生を行うことが明らかになった(Nature. 2005;433:647-53. New Engl J Med. 2001;1344:1750-7)。このように、臓器には自己再生能力(「内因性再生」)が保持されている。

しかし、実際の臨床現場においては重篤な心不全や肝不全などに陥った患者が多く存在し、自然治癒することは極めて稀である。内因性再生が不十分である原因として、加齢などによる臓器特異的幹細胞の機能低下だけでなく、臓器の内的環境の悪化が幹細胞機能の抑制を含めた臓器自体の自己再生能力を障害していると考えられる。このメカニズムを解明することで、内因性再生の効果的な誘導を行うことができると思われる。しかし、これまでの再生医療は自己再生能力を生かす内因性再生にあまり注目されておらず、細胞移植による外因性再生と比べて研究が遅れているのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は、臓器の自己再生能力を生かした内因性再生に着目した、新たな細胞治療を開発することを目的としている。組織内環境因子の制御により内部環境を整えることで、自己

再生能力の底上げを行うとともに移植細胞の機能・動態を活性化することで、より高い治療効果が得られると考える。

3. 研究の方法

本研究では、梗塞心筋組織内の環境を心筋幹細胞およびドナー細胞の生存・増殖・分化に適したものにすることで、外因性再生治療の治療効果を改善することを目的とする。異所性心移植マウスモデルを用いてメカニカルストレスの軽減による内因性再生の促進に関わる新規環境因子の同定を行う。この結果に基づき、その因子の添加あるいは阻害が心筋細胞・心筋幹細胞に及ぼす影響を検証する。最終的には、新規に発見された内因性再生促進因子と細胞移植とを組み合わせ、その効果を評価する。

(1)メカニカルストレスを軽減した心筋梗塞モデルの作成

C57BL/6 マウスを用い、冠動脈左前下行枝の結紮により障害心臓(心筋梗塞)モデルを作製する。冠動脈結紮の60分後に、障害心臓をドナー心臓として摘出し、別の正常なマウスの腹腔内に移植する。移植された障害心臓はメカニカルストレスをほとんど受けることなく、冠動脈からの血流供給を受けながら心拍動を続ける(Unloading 心臓)。冠動脈結紮の60分後に Sham 開腹を行い、心臓はそのままとし、通常メカニカルストレスの下に心拍動を続ける>Loading 心臓)ものを対照群とする。

(2)モデル作製後7, 21日目に心臓の線維化組織面積、心筋細胞増殖とアポトーシス、心筋幹細胞の数を組織染色で調べるとともに、群間での比較によりメカニカルストレス軽減による内因性心筋再生効果を評価する。

(3)心筋組織における遺伝子の発現変化をマイクロアレイで調べる。発現に変化が見られた分子の内、特に変化が著しかったものについてWestern blotting あるいはRT-PCRで分析し、内因性心筋再生を促す新規分子を同定する。

(4)新規に同定された内因性再生を促す新規分子が外因性再生におよぼす影響を調査し、新規に発見された内因性再生促進因子と細胞移植とを組み合わせ、その効果を評価する。

4. 研究成果

Unloading 心臓と>Loading 心臓を比較した結果、Unloading 心臓は>Loading 心臓と比べ、心筋梗塞面積が減り、心室壁厚が保たれていることが判明した。心筋細胞のアポトーシスはUnloading 心臓において減少していた。そのため、メカニカルストレスの軽減は自己の心筋再生に対して有意に働くことが示された。

心筋組織における遺伝子の発現変化を調べた結果、新規分子の特定には至らなかった。

そのためメカニカルストレスの軽減という組織環境因子の制御が心筋再生に好影響をあたえるという結果をもとに、unloading 心臓に対して細胞治療を行い、メカニカルストレスの軽減が外因性再生（細胞治療）に影響を及ぼすか否かを検討した。

実験は以下の内容で行った。
C57BL/6 マウスで心筋梗塞モデルを作製し、GFP マウス由来の心筋幹細胞をドナー細胞として移植する。

(1)以下の2群を作製した：
Loading心臓にドナー細胞(計 1×10^5 個)を4箇所注入する。

Unloading心臓にドナー細胞(計 1×10^5 個)を4箇所注入する。

(2)治療後3, 21日目に、障害心臓を摘出し、以下の検討により外因性心筋再生治療の効果を比較検討した。

移植したドナー細胞の生存。

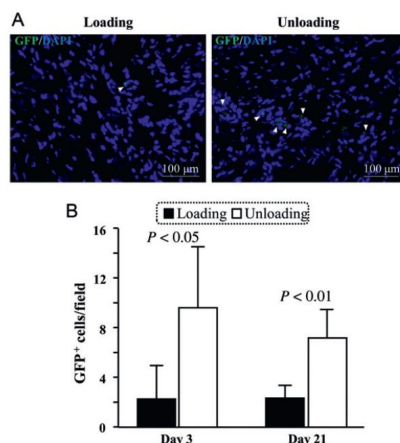
障害心臓の線維化組織面積。

心筋細胞増殖 (Ki67)とアポトーシス (TUNEL)。

心筋組織内の Sca-1, c-kit 陽性幹細胞の数(組織学解析)。

マウスにおける unloading 心臓に細胞治療を行った結果、unloading 心臓は loading 心臓に比べ、GFP 陽性細胞が多く生存しており、移植細胞が多く生着していることが判明した(図1)。Unloading 心臓における障害心臓の線維化面積は、loading 心臓に比べ有意に小さかった(図2)。

(図1：生着細胞数)

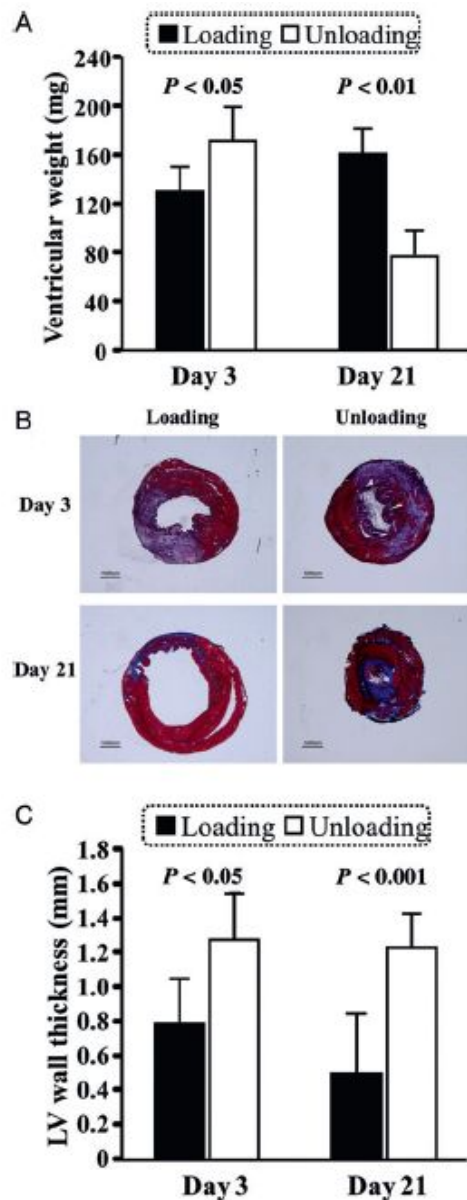


また、心筋細胞増殖に関する検討では、unloading 心臓は loading 心臓に比べ Ki67 陽性細胞が多く存在しており、unloading 心臓は心筋細胞増殖において有利であることが判明した(図3)。

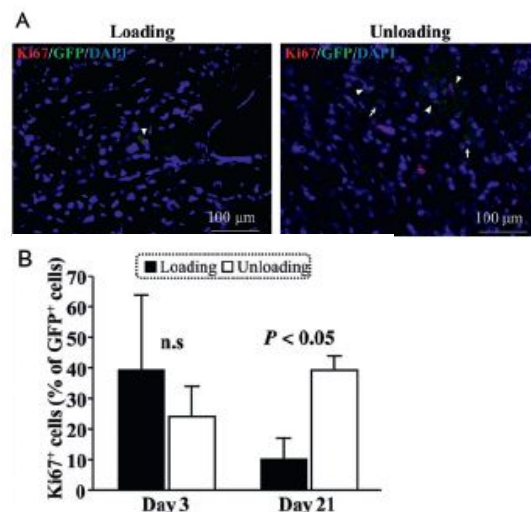
アポトーシスに関する検討では、unloading 心臓は loading 心臓に比べ TUNEL 陽性細胞が少なく、unloading 心臓にはアポトーシス細胞の減少がもたらされることが判明した(図

4)。

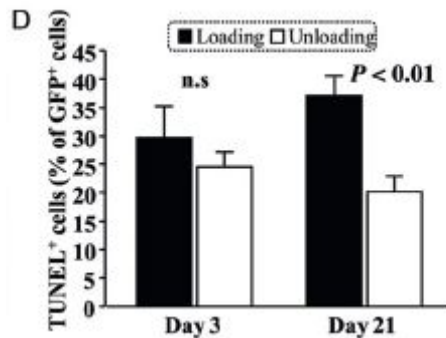
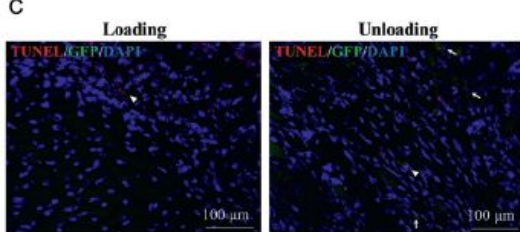
(図2：左室の形態学的変化と線維化面積)



(図3：Ki67 陽性細胞数)



(図4: TUNEL 陽性細胞数)



また、unloading 心臓は loading 心臓に比べ、幹細胞マーカーを発現している移植細胞が多く、メカニカルストレスが軽減された unloading 心臓は、移植細胞の幹細胞性の維持に有意であることが明らかとなった。

以上の結果より、メカニカルストレスを軽減するという細胞環境因子の制御は内因性再生のみでなく、外因性再生(細胞治療)においても影響を及ぼすことが示唆された。

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 2 件)

Haemodynamic unloading increases the survival and affects the differentiation of cardiac stem cells after implantation into an infarcted heart.

Kurazumi H, Li TS, Takemoto Y, Suzuki R, Mikamo A, Guo CY, Murata T, Hamano K. Eur J Cardiothorac Surg. 2014;45(6):976-82. 査読有
Doi:10.1093/ejcts/ezt629

Aortic arch surgery in octogenarians: is it justified?

Kurazumi H, Mikamo A, Kudo T, Suzuki R, Takahashi M, Sirasawa B, Zempo N, Hamano K. Eur J Cardiothorac Surg. 2014;46(4):672-7. 査読有
Doi:10.1093/ejcts/ezu056

[学会発表](計 0 件)

[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

藏澄 宏之 (KURAZUMI, Hiroshi)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 15645116

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし