

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461089

研究課題名(和文) 心臓の自己再生能力を賦活化させる試み

研究課題名(英文) Enhancement of self-maintain ability of the heart

研究代表者

松下 訓 (Matsushita, Satoshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20407315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：心臓はわずかながら再生能力がある臓器とみなされている。これまでの報告や我々の検証から、心臓の再生には心筋幹細胞による機序と胎生期転写因子の再活性の2つの因子があることが示唆されている。本研究ではこれらの因子がどの程度心筋の再生に関与している可能性があるのか、またそれらの機序が活性化される引き金となる因子を、マウスおよびヒトの心筋試料を用いて検索したところ、心筋傷害によってこれらの因子が活性化されたが、心機能の回復には不十分であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The heart has an ability for self-renewal. It has been suggested that at least there are two factors, cardiac stem cells and activation of cardiac-specific transcription factor(s) are associated with the mechanism. In this study, we determined how deeply these mechanism affected to the renewal by using rodent heart and human tissue samples.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：心筋再生 心筋幹細胞 心臓転写因子

### 1. 研究開始当初の背景

以前より心筋には幹細胞が存在する可能性が示されていたが、2003年に心臓組織からの幹細胞培養法が報告されこれにより生体組織からでも比較的容易に心筋幹細胞が培養可能となった。一方でこの細胞は骨髄などの多臓器由来のものが炎症などによって遊走されたものであり“心筋幹細胞”としての位置づけに疑問が投げかけられていたが、研究代表者らなどの検討においてこれらの細胞は心臓由来の幹細胞であることが示され、心臓にも臓器再生能が潜在的に存在することが強く示唆された。この幹細胞は心臓を構成する主な細胞、すなわち心筋、血管および内皮細胞への分化能を持つことが示され、傷害心筋に対する新たな細胞ソースとして注目されている。実際にこの細胞を用いた幹細胞治療は、ラット・マウスなどを用いた小動物からブタモデルを用いた大動物における検討を経て、海外2施設において虚血性心疾患患者に対する臨床試験も行われ、その安全性と有効性が示されており新たな幹細胞治療の細胞ソースとして大きな期待をされている。しかしながらこれらの検討の結果、特に重症心筋傷害例などでは、心筋幹細胞治療の効果が予想より低いことが示されており、いかにその治療効率を改善させるかが今後の研究の課題となっている。

心臓組織から培養される細胞群(Outgrowth細胞)のうち、心筋幹細胞のマーカーといわれるc-Kit陽性を示す細胞は、動物種や報告により異なるものの約1-15%と少ないことが知られている。これまでの検討においては心筋幹細胞はこのc-Kit陽性細胞を選択的に投与した方が治療効果が優れるということが示唆されており、いかに高率にc-Kit陽性細胞を得られるかが治療効果の改善を目指す見地から非常に重要な情報となる。これに加えて我々は発生学的見地から心筋自己再生のメカニズムに注目している。すなわちもし心筋に自己再生能が存在するのであれば、それには胎生期に心臓の発生をつかさどる心筋特異的転写因子が関与しているのではないかと考えている。これまでの我々の検討において、これらの転写因子のうち2つの因子の関与を考えている。興味深いことに免疫染色の結果では心筋幹細胞のマーカーであるc-Kitと、これらの2つの因子はほとんど共局在していないことが示された。このことは、心筋再生には心筋幹細胞によるものに加えて、胎生期転写因子の少なくとも2つの異なるメカニズムがあることを示唆している。このように複数の心筋再生メカニズムが潜在的に示唆されているにもかかわらず、実臨床においては心筋梗塞など傷害を受けた心臓が経時的に自己修復し機能が回復することはなく、むしろリモデリングなどから心機能は増悪し最終的に心不全に陥ることも稀ではない。すなわちこれらの自己修復メカニズムは自然の状態においては不完全

であると考えられた。

### 2. 研究の目的

この研究は、心筋傷害時にこれらの2つの因子がどのような発現パターンを示しているのかを解明するとともに、幹細胞マーカーとしてのc-Kitが傷害心の回復にどのように寄与するのかをc-Kit陰性細胞と比較検討することにより有効な心筋再生治療の確立を目指すものである。

まずは動物を用いた傷害心筋モデルを作成、組織傷害においてどの時期において最も組織修復因子の発現上昇がみられるのか、またどの因子が上昇した低下する因子が何なのかを解析、組織修復に影響する因子の発現パターンを解明する。

さらに何が最も効率の良い心筋幹細胞なのか、c-Kit陽性細胞の役割はc-Kit陰性細胞と比較してどのような特性を持つのかを解明するため、ラット組織からOutgrowth細胞を培養、これらをフローサイトメトリーを用いてc-Kit陽性細胞と陰性細胞とに分け、それぞれの細胞の役割をin vitroおよびin vivoで検討する。

次いで心筋幹細胞のマーカーであるc-Kit陽性細胞が実際のヒト症例においてその発現にどのような患者背景における差異があるのか、心筋傷害症例において幹細胞発現がどの程度上昇するか、また年齢や性別などに影響されるかなどを検討する。さらに術前内服薬などによって幹細胞の発現にどの程度差異が生じるかなどを検討する。また培養で用いた組織を同時に組織解析を行うことにより、心筋幹細胞の発現に影響する組織因子を検討する。これに加えて、心臓転写因子の発現が同様に心筋傷害や患者背景・内服薬や疾患とどのように関連するのか、また心筋幹細胞との発現との関連性はどうかになっているかを検証、組織修復因子が実際の心臓でどのように影響されるのかを解明する。

### 3. 研究の方法

マウスにおける検討：8週齢のSD雄性マウスを麻酔下に挿管する。左開胸にて心臓を露出し冠動脈左前下行枝を7-0結紮糸で結紮し心筋梗塞を作成する。心筋梗塞作成後2日目、7日目、14日目に心臓を取り出しRNAを抽出、RT-PCRにて遺伝子の発現をシャム手術群と比較検討した。

次いでGFP陽性ラットの心臓から心筋幹細胞培養を行った。麻酔下において心臓をヘパリン加生理食塩水で灌流、次いで心臓を摘出し心房心筋組織を一片0.5mm角になるよう細かく刻み、フィブロネクチンでコートした10cm培養ディッシュに約0.5cm間隔で組織片を並べた。培養後4週間後に細胞を剥離しさらに継代をして十分な細胞を得たのちにc-Kit抗体を用いてフローサイトメトリーにてc-Kit陽性細胞および陰性細胞を分離した。それぞれの細胞をさらに2週間培養した後

に6穴の培養ディッシュに継代した。細胞を低酸素培養器にいれ、3日間の低酸素培養(1%酸素)を行った。培養中は1日ごとに培地を採取し、培地に含まれるサイトカインをELISAにて測定するとともに培養3日目に細胞を剥離、RT-PCRおよびTUNEL染色にて細胞の質を評価するとともにアポトーシスを定量評価した。次いでラットの急性心筋梗塞モデルを用いてそれぞれの細胞(c-Kit陽性および陰性細胞)が実際の傷害心筋においてどの程度効果を及ぼすかを検討した。8週の雄性SDラットの冠動脈を結紮し心筋梗塞を作成、次いでc-Kit陽性細胞またはc-Kit陰性細胞をそれぞれ $1.0 \times 10^5$ ずつ4カ所に分けて投与した。コントロール群として細胞を含まない基質を同量(50 $\mu$ L)投与した。手術当日にマイクロCTを用いて心機能を測定、ベースラインとしそれぞれ4週間まで心機能の測定を行った。4週間後に心機能を測定した後、心臓をヘパリン加生食で洗浄した後摘出、RT-PCR、ウェスタンブロットおよび組織染色用の試料とし、血管新生因子の発現、アポトーシスの程度および心筋への分化度を心筋マーカーおよび内皮マーカー(トロポニンT、PECAM-1)を用いて検証した。

次いでヒト組織における検討を行った。当科では心臓手術の際にはほぼ全例、血栓予防のため左心耳を結紮・切離している。このうち術前より研究に使用の同意が得られた症例を対象とした。得られた左心耳を心筋保護液に浸し研究室に移送、組織よりRNAを抽出しRT-PCRにて遺伝子発現の解析を行った。培養を開始する。もし同一患者で異なる採取部位から組織が得られた場合は、部位別にディッシュを分けて培養する。培養開始後28日目にトリプシンを用いて細胞を剥離、得られた細胞数を数えこれを記録する。次に細胞の一部でフローサイトメトリー解析を行う。幹細胞マーカーである抗c-Kit抗体を用いて含まれる幹細胞の割合を測定、細胞数と掛け合わせるにより重さあたりの組織から得られる幹細胞数を定量化、患者背景や疾患および採取部位により幹細胞の発現量に差が生じるかを検討した。

#### 4. 研究成果

マウスの検討においてその発現が上昇したものは2種類、低下したものは4種類、変化なしが7種類だった。上昇したもののうちHAND1は2日目にその発現のピークを迎え( $2.8 \pm 1.4$ -fold), islet1 ( $4.2 \pm 2.1$ -fold)およびc-Kit ( $1.8 \pm 1.4$ -fold)は7日目がピークであった。低下したものはそれぞれHAND2 ( $0.31 \pm 0.08$ -fold), TBX5 ( $0.36 \pm 0.13$ -fold), MEF2c ( $0.19 \pm 0.02$ -fold), GATA4 ( $0.31 \pm 0.08$ -fold)であった。また有意な変化をしなかったものはIrx ( $1.1 \pm 0.5$ -fold), NKx2.5 ( $0.7 \pm 0.1$ -fold), TBX18 ( $0.9 \pm 0.2$ -fold), TBX20 ( $0.5 \pm 0.3$ -fold)であった。

培養開始時においてはc-Kit陽性群で血管新生因子であるVEGF mRNAおよびANGPTL2 mRNAの発現は高い傾向が認められたが有意差はなかった(VEGF: c-kit+ =  $1.8 \pm 1.0$ -fold vs. c-kit-;  $p = 0.10$ , ANGPTL2: c-kit+ =  $1.6 \pm 1.0$ -fold vs. c-kit-;  $p = 0.20$ )。次いで低酸素培養3日後に行ったRT-PCRの解析においてはc-Kit陽性細胞群ではVEGFおよびANGPTL2の発現がc-Kit陰性細胞群に比べて上昇していた(VEGF: c-kit+ =  $2.6 \pm 1.0$ -fold vs. c-kit- =  $1.3 \pm 0.8$ -fold;  $p < 0.05$ , ANGPTL2: c-kit+ =  $2.9 \pm 0.6$ -fold vs. c-kit- =  $0.8 \pm 0.1$ -fold;  $p < 0.01$ )。一方で培地に含まれるサイトカインのうちVEGFおよびANGPTL2は、培養開始時においてすでにc-Kit陽性群で有意に高い傾向がみられた(c-kit+: day 0 =  $118.1 \pm 124.9$  pg/mL vs. day 3 =  $1636.5 \pm 319.3$  pg/mL;  $p < 0.01$ , c-kit-: day 0 =  $330.1 \pm 151.3$  pg/mL vs. day 3 =  $2189.1 \pm 380.0$  pg/mL;  $p < 0.01$ )。これらの発現は低酸素において両群とも上昇し、c-Kit陽性群においてその上昇の程度は高かった(day 0 =  $6.5 \pm 7.9$  pg/mL vs. day 3 =  $65.5 \pm 10.8$  pg/mL;  $p < 0.01$ , (day 0 =  $7.3 \pm 5.19$  pg/mL vs. day 3 =  $20.0 \pm 11.6$  pg/mL,  $p = 0.93$ )。低酸素3日目においては細胞数も両群ともに低下したがc-Kit陽性群では3日目に残存した細胞数は有意に多かった(c-kit- =  $37.3\% \pm 11.7\%$ , c-kit+ =  $22.1\% \pm 12.0\%$ ,  $p < 0.01$ , ratio to day 0)。ウェスタンブロット解析においてはcleaved caspase-3の発現がc-Kit陰性群で有意に高く、よりアポトーシスが進行していることを示唆していた。ラットの心筋梗塞モデルの検討においてはベースラインでそれぞれの左室駆出率に有意差はなかったが、(control =  $16.2 \pm 3.0\%$ , c-kit- =  $16.6 \pm 3.4\%$ , c-kit+ =  $16.8 \pm 2.9\%$ ;  $p = 0.86$  in control vs. c-kit-;  $p = 0.78$  in control vs. c-kit+; and  $p = 0.81$  in c-kit- vs. c-kit+), 1週間後(control =  $19.0 \pm 4.5\%$  vs. c-kit- =  $21.9 \pm 4.1\%$  vs. c-kit+ =  $24.8 \pm 8.2\%$ ), 4週間後(control =  $15.8 \pm 3.4\%$ , c-kit- =  $22.9 \pm 3.2\%$ , and c-kit+ =  $29.7 \pm 2.3\%$ ;  $p < 0.01$  in control vs. c-kit-,  $p < 0.01$  in control vs. c-kit+, and  $p < 0.01$  in c-kit- vs. c-kit+)においてはc-Kit陽性群、陰性群ともコントロール群に比べて心機能は高く、どちらの細胞においても新機能の改善効果を認めた。一方で投与細胞(GFP陽性細胞)とPECAM-1の共局在はc-Kit陽性細胞群のみで認められたが限局的であった。

次いでヒト左心耳に含まれる胎生期特異的心臓転写因子のmRNA量を測定した。319例を対象に虚血性心疾患(IHD)と非虚血性(NIHD)に分類、それぞれの群における転写因子の発現を比較した。IHDは102例、NIHD 217例であった。女性の割合はIHDが12%に対し、NIHDが40%とNIHDで有意に多かった。心機能はLVDD、LVDs、LVEFともに差を認め

なかった。術前 NYHA に差はなく、血清 BNP 値は IHD : 227.1 pg/mL、NIHD : 163.7 pg/mL と NIHD で高い傾向が認められたものの有意差は認めなかった。また IHD 群で糖尿病、脂質異常症、高血圧が有意に多く合併しておりスタチンおよびカルシウム拮抗薬の内服も多かった。ベータブロッカーおよび ARB の内服の割合に有意差は認めなかった。組織解析では IHD でそれぞれ GATA4、ISL1、HAND1、MEF2c、TBX18、TBX20 の発現が有意に低下、もしくは減少している傾向が認められた。一方でアポトーシス関連因子である Caspase-3 は NIHD で有意に高く、さらに炎症性サイトカインのうち IL-6 の発現が NIHD で有意に高値であった。TNF、IL-1 の発現に差は認めなかった。また心臓から培養された c-Kit 陽性細胞は右心耳からのものが最も含有量が高く (1.76 ± 1.58/mg)、次いで左心耳からのものであり (1.21 ± 1.01/mg)、左室心筋からのものが最も少なかった (0.57 ± 0.62/mg)。また c-Kit 陽性細胞の発現量に影響する患者背景因子を検索したところ、術前の BNP 高値が関連因子として抽出され心筋傷害の際に c-Kit 陽性細胞が増加することが示唆されたが、その発現量は low-BNP 群 = 0.15 ± 0.08 に対し high BNP 群 = 0.25 ± 0.33 と有意差は得られたものの限局的であった。また心房細動を合併している症例では c-Kit の発現が有意に低下した。 (0.15 ± 0.12 vs. 0.13 ± 0.18, p < 0.01)。

#### 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. Shinohara D, Matsushita S, Yamamoto T, Inaba H, Kuwaki K, Shimada A, Amano A. Reduction of c-kit positive cardiac stem cells in patients with atrial fibrillation. J Cardiol. 2016 Aug 4;
2. Matsushita S, Minematsu K, Yamamoto T, Inaba H, Kuwaki K, Shimada A, Yokoyama Y, Amano A. Factors for c-kit expression in cardiac outgrowth cells and human heart tissue. Int Heart J. 2017, [In press]

[学会発表](計 2 件)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 件)

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

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松下 訓 (MATSUTHIA, Satoshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20407315

##### (2) 研究分担者

五十嵐 庸 (IGARASHI, Mamoru)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00277815

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )