慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ヒト間葉系幹細胞の水溶性スタチンによる活性化–心臓再生医療での役割
Sub Title	Pretreatment of human mesenchymal stem cells with HMG-CoA reductase inhibitor improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation
Author	鶴田, ひかる(Tsuruta, Hikaru)
Publisher	
Publication year	2012
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2011.)
JaLC DOI	
Abstract	インビトロ心筋誘導アッセイシステムを用いたヒト骨髄間葉系細胞のスタチン前処置下共培養実験において、心筋誘導効率の改善を認めた。スタチンがAkt活性化作用を有する事から、Aktの阻害剤であるwortmanninを投与した共培養実験を行い、スタチン投与群による心筋誘導改善効果が抑制されることを証明した。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2009～2010 課題番号：21790158 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21790158seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2009～2010
課題番号：21790158
研究課題名（和文）ヒト間葉系幹細胞の水溶性スタチンによる活性化-心臓再生医療での役割
研究課題名（英文）Pretreatment of human mesenchymal stem cells with HMG-CoA reductase inhibitor improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation

研究代表者
鶴田　ひかる　(TSURUTA HIKARU)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：70338044

研究成果の概要（和文）：インビトロ心筋誘導アッセイシステムを用いたヒト骨髄間葉系細胞のスタチン前処置下共培養実験において、心筋誘導効率の改善を認めた。スタチンが Akt 活性化作用を有する事から、Akt の阻害剤である wortmannin を投与した共培養実験を行い、スタチン投与群による心筋誘導改善効果が抑制されることを証明した。

研究成果の概要（英文）：In this study, our challenge was to improve the efficacy of mesenchymal stem cell (MSC)transplantation in vivo by pretreatment of MSCs with HMG-CoA reductase inhibitor. After cardiomyogenic induction in vitro, preteatment with HMG-CoA reductase inhibitor significantly increased the cardio-myogenic transdifferentiation efficiency (CTE), which was calculated by immunocytochemistry using anti-cardiac troponin-I antibody. CTE was reduced by pretreatment with HMG-CoA reductase inhibitor and wortmannin, inhibitor of Akt.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総　計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学
キーワード：骨髄間葉系細胞、スタチン、心筋誘導

1．研究開始当初の背景

欧米で先に行われた重症心不全に対する骨髄細胞移植治療の臨床試験において、その効果は極めて低い事が相次いで示された。その後、骨髄細胞の中でも骨髄間葉系細胞のみが心筋分化能力を有することが示されたが、分化効率は低く、再生医療の効率としては不十分である事が明らかになった。骨髄間葉系細胞移植の安全性は示されたが、今後の臨床応用には、心筋分化の機序解明と分化効率改善を図る必要がある。心筋分化機序を考える上で、細胞死や増殖に関与する Akt の下流に存在する GSK 3β とその標的蛋白である βcatenin は、細胞の分化に関わる Wnt signaling における重要な因子であることが知られている。今回、スタチン(HMG-CoA 阻害薬)が Akt 活性化作用を有する事に着目した。

スタチンは endothelial progenitor cells(EPCs)への良好な作用から、ヨーロッパで行われた大規模臨床試験 TOPCARE -AMI でスタチン前処置 EPCs を移植し良好な結果を得ているが、EPCs の心筋への分化は否定的であるため、その効果は血管再生による効果と考えられている。別の研究で AKT 遺伝子導入、強発現させた骨髄間葉系幹細胞の移植により心筋梗塞領域縮小と心機能の著明な改善、及び心筋分化の改善を認めた事から、スタチンによって AKT の活性化を行う事で遺伝子導入等の操作を行わずに同等の効果を期待出来るのではないかと考察した。

２．研究の目的

ヒト間葉系幹細胞による再生医療の効果を改善する目的で、「ヒト間葉系幹細胞を生体外でスタチンの存在下の培養で分化能向上を生じさせた後、ヒト再生医療に臨床応用する」と言う全体構想の中で、スタチン前処理したヒト間葉系幹細胞が心臓再生医療有効である事を示す前臨床研究を行う事を目的とする。

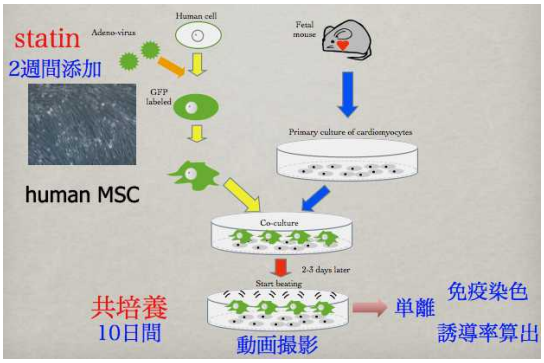
３．研究の方法

(1)スタチンによる易心筋誘導化の検証と機序解明

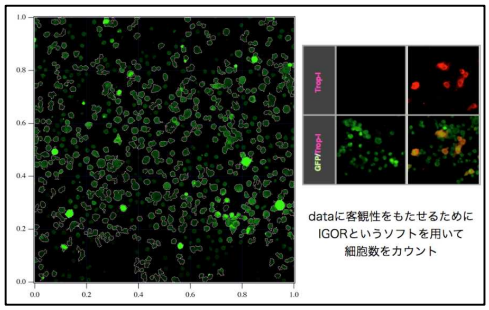
特許技術インビトロ心筋誘導アッセイシステム（国内 2005-015539/ 国際 2006-078034）を用いて、 マウス胎児心筋細胞とスタチン前処理を施行したヒト間葉系細胞の共培養実験を行い、心筋誘導効率の改善効果を検証する。(図 1)

アデノウィルスを用いて EGFP 遺伝子を導入したヒト骨髄間葉系細胞を、マウス培養心筋細胞上に播種し、EGFP 蛍光を持つヒト間葉系細胞が収縮を開始するのを確認、共培養１週間後に細胞をトリプシン処理にて単離してスメア標本を作製し、免疫染色を施行した。EGFP 陽性細胞中に心臓特異的トロポニン -I 染色陽性の細胞を、共焦点レーザ顕微鏡で観察し、核(DAPI 染色)を有しトロポニン -I 陽性細胞で染色パターンが核を避けてドーナツ状に染色されている物を特異的染色としてカウントし、心筋誘導効率を算出した。計測は、独自に開発した計測用ソフト(IGOR)上で行い、客観的評価をおこなう。 (図 2)

また、心筋誘導効率の改善が認められる細胞でのみ増加している遺伝子を１０数種類選択し、さらにリアルタイム PCR を用いて定量的に評価し、心筋誘導にどの遺伝子が関与しているかを推測する。



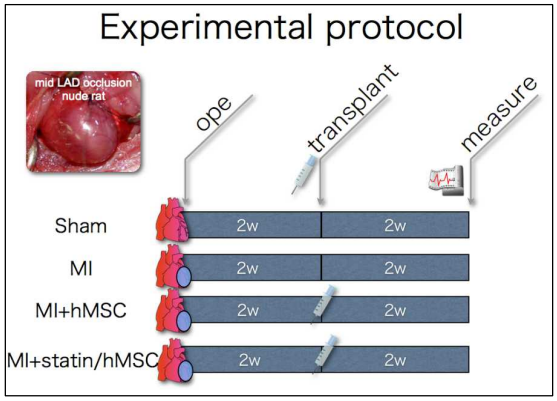
<図１ 共培養実験のプロトコール>



＜図 2＞

(2)ヒト骨髄間葉系幹細胞に対する水溶性スタチンの効果・生体位心での検討

拒絶反応の少ないヌードラットを用い、吸入深麻酔下に左側開胸・前壁冠動脈を結紮、心筋梗塞作製後へ閉胸し、心筋梗塞が完成する２週間後に心臓超音波検査による左心機能評価後に開胸、スタチン処理・非処理群で無作為割当した骨髄間葉系幹細胞を移植する。スタチンは単独で左心室リモデリング抑制による心機能改善作用があるため、生体に投与しない。４週間後に、再度心臓超音波検査による左心機能評価、左心室内圧測定、心筋梗塞領域（マッソントリクロム染色）の計測・新生血管数(CD34 染色)計測、EGFP 陽性細胞及びその細胞の心筋への分化を心臓特異的トロポニン -I 染色によって、免疫組織化学的に検証する。(図 3)



＜図 3＞

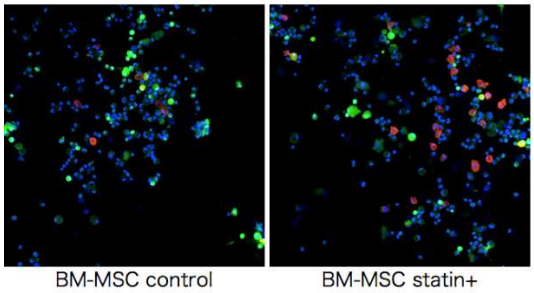
４．研究成果

(1)スタチンによる心筋誘導効率へ及ぼす影響と作用機序

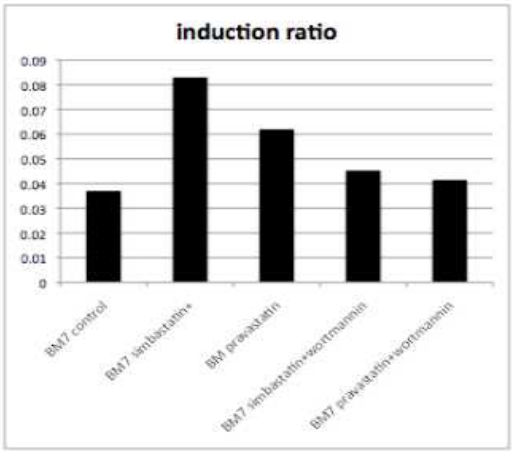
アデノウィルスを用いて EGFP 遺伝子を導入したヒト骨髄間葉系細胞を、培養液にスタチンを添加した群と添加しないコントロール群とに分け、マウス培養心筋細胞上に播種し、共培養を行った。EGFP 蛍光を持つヒト間

葉系細胞が収縮を開始するのを確認、共培養１週間後に細胞を単離してスメア標本を作製し、免疫染色を施行し、心筋誘導効率を算出した。(図 4)　用いるヒト骨髄間葉系細胞の継代回数による多少の差異はあるが、ヒト骨髄間葉系細胞単独での心筋誘導率は 1-3%であったが、スタチン前処理を行ったヒト骨髄間葉系細胞群では約 8%の心筋誘導率を認め、有意な心筋誘導率改善効果を認めた。この作用は水溶性スタチン、脂溶性スタチンともに認められ、Akt の阻害剤である wortmannin を前処理した共培養実験では、wortmannin 前処理したスタチン投与群において心筋誘導改善効果の抑制が確認された。(図 5)

これらの結果から、スタチンにより、ヒト骨髄間葉系細胞の心筋誘導効率の改善効果が得られ、その機序に Akt pathway を介した心筋誘導が生じている可能性が示唆された。

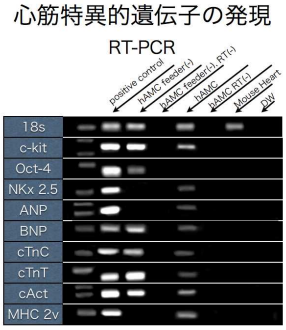


<図4>



<図5>

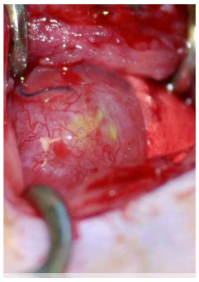
心筋誘導効率の変化と発現遺伝子の関係については、心筋誘導効率の改善が認められる細胞でのみ増加している遺伝子をリアルタイムPCRにより評価を行い、共培養により、発現していた幹細胞マーカーのOCT4が消え、心筋特異的遺伝子NKX2.5が発現する事を、以前に当研究室にて確認、報告している。(図6)



＜図6＞

(2)ヒト骨髄間葉系幹細胞に対する水溶性スタチンの効果・生体位心での検討

ヒト骨髄間葉系幹細胞および羊膜間葉系幹細胞に対する水溶性スタチンの効果・生体位心での検討について、心筋梗塞モデルを作成し、スタチン前処理した間葉系細胞の移植を試みた。ヌードラットをイソフルレン吸入深麻酔下に左側開胸・前壁冠動脈を5-0フローリン針で結紮して心筋梗塞作製後閉胸し、2週間後に骨髄間葉系幹細胞を水溶性スタチン処理群・非処理群（コントロール）に無作為割当し再度開胸、単離心筋細胞を心筋梗塞周辺に31Gハミルトンシリンジにて細胞移植を行った。(図7)４週間後に、EGFP陽性細胞及びその細胞の心筋への分化を心臓特異的トロポニン-I染色によって、免疫組織化学的に検証した。(図8)



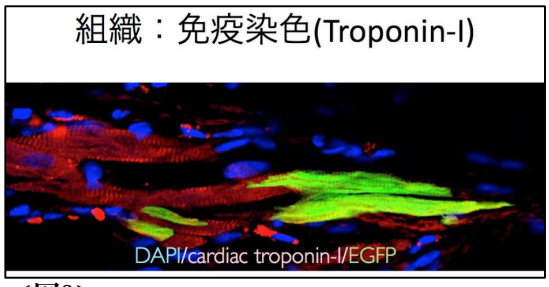
human marrow-derived mesenchymal stem cell (hMSC) injection

- 心筋梗塞作製２週間後
- trypsinで単離し、1-2x10^{6}個の細胞を心筋梗塞領域に移植
- GFPにて着色

<図7>

(1) の実験後に、アデノウイルスのロット変更のため、EGFP遺伝子導入の条件調整（アデノウイルスによる細胞傷害と観察に適した蛍光強度の調整）に多大な時間を要し、培養細胞とアッセイ系の安定化を図るのに難渋した。コントロール群の心筋梗塞モデルは得られ、左心機能評価、左心室内圧測定、心筋梗塞領域（マッソントリクロム染色）の計測・新生血管数(CD34染色)計測、EGFP陽性細胞計測を行ったが、現在、スタチン群の心筋梗塞モデルの作成を行っており、生体におけるスタチン処理を添加した骨髄間葉系細胞

移植の効果判定について検討している。



＜図8＞

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) Numasawa Y, Miyoshi S, Tsuruta H, Umezawa Y. Treatment of human mesenchymal stem cells with angiotensin receptor blocker improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation and improved cardiac function via angiogenesis
Stem cells: 29.1405-1414, 2011.(査読あり)

(2) Shimura D, Miyoshi S, Tsuruta H, Umezawa Y. Pretreatment of human mesenchymal stem cells with pioglitazone improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation and cardiac function.
Stem cells: 29.357-66, 2011(査読あり)

〔学会発表〕（計 1 件）

(1) Tsuji H, Miyoshi S, Tsuruta H, Umezawa Y.
IL-10 Significantly Improved Efficiency of Immunological Tolerance and Cardiomyogenic Transdifferentiation from Human Amniotic Membrane-derived Mesenchymal Stem Cell in vivo (日本循環器学会　平成 22 年 3 月 5～7 日、京都国際会議場)

６．研究組織
(1)研究代表者

鶴田　ひかる(TSURUTA HIKARU)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：70338044