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

Title	アンギオテンシン受容体阻害薬による活性化ヒト間葉系幹細胞による心臓再生医療
Sub Title	Cardiac regeneration therapy with human mesenchymal stem cells activated with angiotensin receptor blockers
Author	沼澤, 洋平(Numasawa, Yohei)
Publisher	
Publication year	2014
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2013.)
JaLC DOI	
Abstract	ヒト骨髄間葉系幹細胞は心臓再生医療における細胞ソースの一つであるが、心筋細胞への分化誘導効率が低いために実臨床における効果は小さい。臨床試験で心臓を含む数々の臓器保護作用が報告されているアンギオテンシン受容体拮抗薬(ARB)を用いて間葉系幹細胞の心筋細胞への分化誘導効率を改善させる事が可能かどうか検証した。in vitroおよびin vivoにおいてヒト骨髄間葉系幹細胞をARBを添加した培地で培養してから心筋細胞へ分化誘導させる事で、心筋細胞への分化誘導効率が改善する事が判明した。本研究の結果からARBにて前処置した間葉系幹細胞は心臓再生医療における有用な細胞ソースとなりうる事が示唆された。 Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell might not be a good cardiac stem cell source, because of its low cardiomyogenic transdifferentiation efficiency. We hypothesized that angiotensin receptor blockers might improve cardiomyogenic transdifferentiation efficiency of mesenchymal stem cell because they have protective effects for many human organs including heart. Pretreatment of mesenchymal stem cells with angiotensin receptor blockers significantly increased the cardiomyogenic transdifferentiation efficiency in vitro and in vivo. The pretreatment of mesenchymal stem cells with angiotensin receptor blockers improved cardiomyogenic transdifferentiation efficiency, and might increase the efficacy of mesenchymal stem cell transplantation in cardiac stem cell therapy.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2011～2013 課題番号：23790197 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_23790197seika

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、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ５ 月 ２４ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2013
課題番号：２３７９０１９７

研究課題名（和文）アンギオテンシン受容体阻害薬による活性化ヒト間葉系幹細胞による心臓再生医療

研究課題名（英文）Cardiac regeneration therapy with human mesenchymal stem cells activated with angiotensin receptor blockers

研究代表者
沼澤　洋平（Numasawa, Yohei）

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：６０４１４０５９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,400,000円、（間接経費）　1,020,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト骨髄間葉系幹細胞は心臓再生医療における細胞ソースの一つであるが、心筋細胞への分化誘導効率が低いために実臨床における効果は小さい。臨床試験で心臓を含む数々の臓器保護作用が報告されているアンギオテンシン受容体拮抗薬（ARB）を用いて間葉系幹細胞の心筋細胞への分化誘導効率を改善させる事が可能かどうか検証した。in vitroおよびin vivoにおいてヒト骨髄間葉系幹細胞をARBを添加した培地で培養してから心筋細胞へ分化誘導させる事で、心筋細胞への分化誘導効率が改善する事が判明した。本研究の結果からARBにて前処置した間葉系幹細胞は心臓再生医療における有用な細胞ソースとなりうる事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell might not be a good cardiac stem cell source, because of its low cardiomyogenic transdifferentiation efficiency. We hypothesized that angiotensin receptor blockers might improve cardiomyogenic transdifferentiation efficiency of mesenchymal stem cell because they have protective effects for many human organs including heart. Pretreatment of mesenchymal stem cells with angiotensin receptor blockers significantly increased the cardiomyogenic transdifferentiation efficiency in vitro and in vivo. The pretreatment of mesenchymal stem cells with angiotensin receptor blockers improved cardiomyogenic transdifferentiation efficiency, and might increase the efficacy of mesenchymal stem cell transplantation in cardiac stem cell therapy.

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：間葉系幹細胞　アンギオテンシン

１．　研究開始当初の背景

Induced pluripotent stem cell (iPS細胞，*Yamanaka,Nature, 2007*)を再生医療の切り札として世界中が注目している。胚性幹細胞に近い分化能力を持ちながら、拒絶反応が無いという利点を持つ。しかし、臨床応用には多くの解決すべき重大な問題があり、今すぐ利用出来る細胞ソースとは言い難い。一方で骨髄間葉系幹細胞(*Makino, J Clin Invest, 1999*)は、心筋への分化能力を有した体性幹細胞であり、既に臨床の現場で試験的に再生医療の細胞ソースとして利用されている。確かに少ないながらも一定の効果があるが、デフォルト状態でのヒト骨髄間葉系幹細胞の心筋誘導効率は極めて低く(～0.3%前後:*Takeda,J Gene Med, 2004*)、再生医療の効果自体も期待はずれに低かった。そのため多くの研究者は失望し、間葉系幹細胞から新しい細胞ソース iPS 研究に移行していった。

私の所属する研究室は、以前よりヒト間葉系幹細胞の研究を盛んに行っていた。中でも最近、ヒト骨髄以外の間葉系幹細胞(月経血・子宮内膜(*Hida, StemCells, 2008*)・胎盤(*Okamoto, Exp Cell Res, 2007*)・臍帯血(*Nishiyama, Stem Cells, 2007*)・羊膜(*Tsuji, Circulation, 2008*)）で骨髄の10-900倍近い心筋誘導効率を有する細胞が存在する事を報告して来た。ヒト間葉系幹細胞を in vitro で心筋に誘導するためには、マウス心筋培養細胞との共培養が必須である。私はこれらの結果をふまえて、「ヒト骨髄間葉系細胞の心筋分化効率の決定的低さが、ヒト細胞に普遍的な特徴では無い」と考え、ヒト骨髄間葉系幹細胞の心筋誘導効率を改善する手だてが無いかを調べることにした。そして前述の易心筋誘導特性を持つ間葉系細胞が、若い新陳代謝の盛んな臓器に集中している事に注目した。逆に、体性幹細胞の一種である血管内皮前駆細胞は、高齢者や糖尿病患者等ではその数や機能が低下している(*Heiss, J Am College Cardiol, 2005/ Fadini, J Am College Cardiol, 2005*)。このように年齢とともに幹細胞の能力が低下してゆく現象は、若年者が出生後も暫く臓器を成長させていく過程で、体性幹細胞が関連している可能性があり容易に推測出来る。 また血液中の血管血管内皮前駆細胞の数が低い患者では心血管イベントと心血管死が多い事が報告され(*Werner, NEJM, 2005*)、皮肉な事に幹細胞治療が必要な重篤な患者ほど、体性幹細胞の能力が低下している。私はこれらから類推して「多くの大規模臨床試験で心血管イベントを減少させる薬剤が、ヒト骨髄間葉系幹細胞のポテンシャルを改善し、心筋誘導効率を改善するのでは無いか」と予想した。その中でも、アンチエージングとしても期待されるアンギオテンシン受容体阻害薬（ARB）に注目して研究を行った。肝臓で生成されたアンギオテンシノーゲンは、腎臓由来レニン活性によりアンギオテンシン-I となる。アンギオテンシン-I は組織中でのアンギオテンシン変換酵素(ACE)・キマーゼ活性によって、最も生理活性の高いアンギオテンシン-II に変換される。 なお、共培養環境では、大量のアンギオテンシン-II が存在しているし、間葉系幹細胞自体がアンギオテンシン-II を生成している事も判明していた。この様なアンギオテンシン刺激に満ちた環境で、ARB が間葉系幹細胞の心筋分化誘導にどのような影響を及ぼすのかを解析する事とした。

２．研究の目的

「ヒト間葉系幹細胞による心臓再生医療の効果を改善するために、ヒト間葉系幹細胞を生体外で ARBでの若返りによる分化能向上を

生じさせることで臨床再生医療の効果を増進する」と言う全体構想の中で、本研究はARBを添加して培養したヒト間葉系幹細胞が心臓再生医療において有効である事を示す事を目的とした前臨床研究である。ARB以外にもレニンアンギオテンシン系に作用する薬剤としてACE阻害薬、レニン阻害薬などのレニンアンギオテンシン系薬剤を用いることで、心筋分化誘導におけるレニンアンギオテンシン系の影響についての詳細なメカニズムを明らかにし、臨床応用に向けた基盤作りを目的とする。またin vitroにおける研究のみならず、ヌードラット心筋梗塞モデルを用いたin vivoでの実験も行い、臨床応用の実現へ向けた具体的な方法を模索することを目的とする。

３．研究の方法

ヒト間葉系幹細胞において、in vitro/ in vivo 双方で、ARB の心筋誘導効率の改善効果を確認する。まずin vitro ではヒト間葉系幹細胞と胎児マウス培養心筋細胞との共培養を行い、心筋細胞を誘導する。その過程においてARB をはじめレニンアンギオテンシン系に関連する薬剤がどのように影響するか確認する。ARB は主にアンギオテンシン受容体サブタイプ1(AT1R)を阻害する事でその効果を発現すると考えられているが、薬剤の中にはAT2R の阻害も含まれているものもある。そこで、AT2R の選択的阻害薬であるPD123319 を投与して心筋誘導効率が改善するか否かを観察する事で、この作用がどちらのレセプターを介する作用であるかを同定する事が出来る。ARB は同時に核内受容体として知られるperoxisome proliferators-activated receptor-γ(PPAR-γ)活性化作用が少なからず有ると言われている。別実験で我々はPPAR-γにも同様に心筋誘導効率改善作用がある事を突き止めている。そのため、ARB の作用がPPAR-γ受容体選択的阻害薬であるGW9662 によって消失するか否かを観察する。

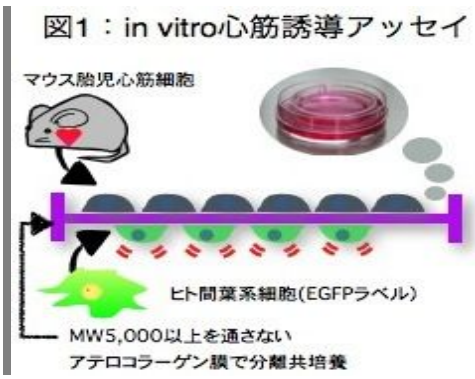
in vivoではARB を添加して培養したヒト骨髄間葉系幹細胞をヌードラット心筋梗塞モデルに移植し、その効果を確認する。拒絶反応の少ないNude Rat で慢性心筋梗塞モデルを作製し、ARB 非処理ヒト骨髄間様系幹細胞と、ARB 処理ヒト骨髄間葉系幹細胞群に分ける。心筋梗塞作製２週間後に開胸し心筋梗塞巣へ細胞を移植する。移植後２週間及び４週間で心機能改善効果を、心電図、血圧、左心室収縮期圧、拡張末期圧、心臓超音波検査、血液ガス所見、BNP 採血などを行い２群間で比較する。さらに得られた心筋組織から心筋梗塞部位・梗塞周囲・正常領域の免疫組織学的検討を行い、骨髄間葉系幹細胞由来心筋細胞の有無、血管新生の程度などを確認する。

これらの研究を通じてARB の心筋誘導効率改善のメカニズムを解析し、その結果から心筋誘導法の最適化を行う。

４．研究成果

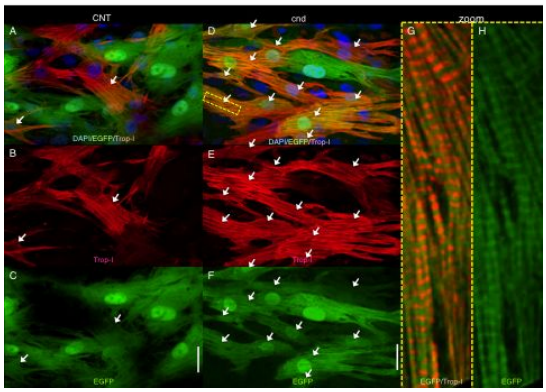
(1)ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の心筋分化誘導実験系の確立

ヒト間葉系幹細胞と胎児マウス培養心筋細胞との共培養を行い、心筋細胞へ分化誘導する事に成功した。



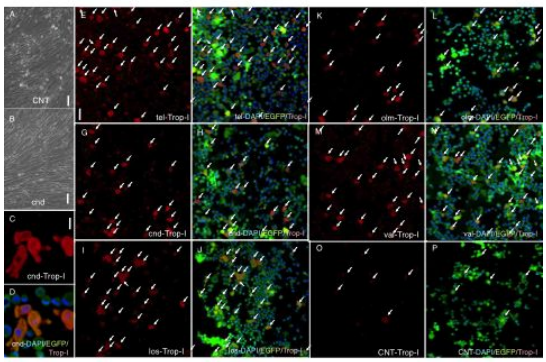
ヒト骨髄間葉系幹細胞を EGFP でラベルし、共培養下で分化誘導させた後、免疫染色を行い、EGFP 陽性ヒト骨髄間葉系細胞が心筋細胞特有のトロポニンＩで染色される事を確認した。同様に顕微鏡にて心筋の横紋筋構造も確認した。

最終的に細胞を単離し、EGFP 陽性細胞におけるトロポニン陽性細胞の割合を心筋分化誘導率として算出する実験系を確立した。

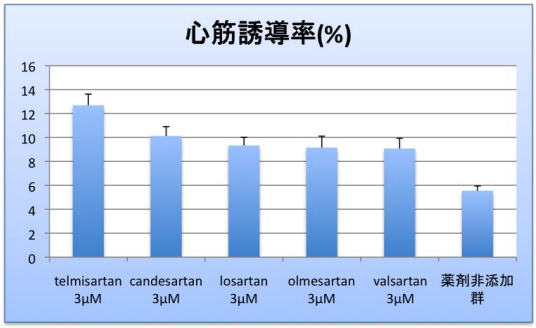


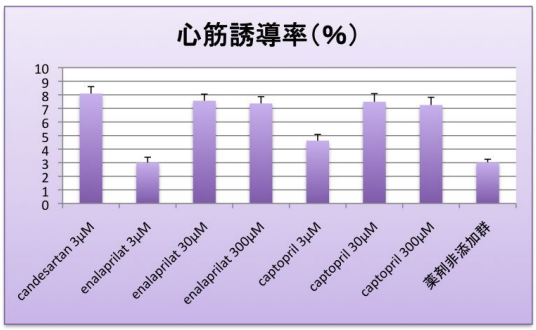
(2)レニンアンギオテンシン系薬剤の心筋分化に対する影響

ヒト間葉系幹細胞における心筋への分化誘導過程においてレニンアンギオテンシン系の薬剤が positive に影響する事を解明した。ヒト間葉系幹細胞と胎児マウス培養心筋細胞との共培養を行う際に、間葉系幹細胞を各種 ARB（テルミサルタン、カンデサルタン、ロサルタン、オルメサルタン、バルサルタン）を加えた培地にて前処置を行う事で、心筋分化誘導効率が 2～5 倍程度改善する事を免疫組織学的に確認した。

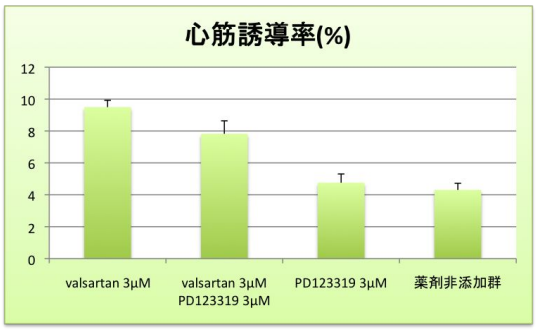


ARB と同系統の薬剤である ACE 阻害薬（エナラプリル、カプトプリル）の前投与でも ARB より高濃度で添加する事で同様の心筋分化誘導効率改善作用がある事が判明した。

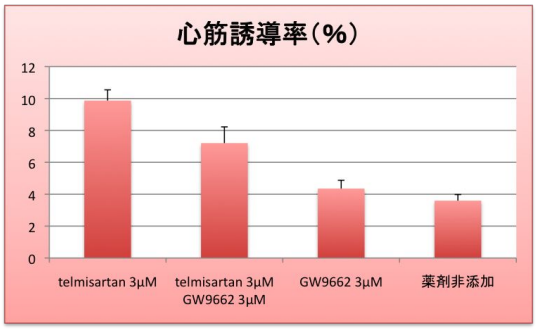




次にレセプターに注目し、AT1R ブロッカーである ARB と AT2R ブロッカーである PD123319 の前投与を行い、比較した。AT2R ブロッカーの前投与では間葉系幹細胞の心筋分化誘導効率は改善せず、この効果は AT1R を介して起きている現象であることが示唆された。

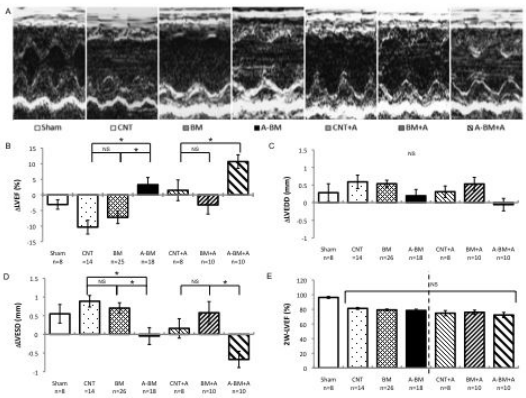


さらに ARB の中で PPAR-γ活性化作用のあるテルミサルタンと PPAR-γ選択的阻害薬である GW9662 を同時に前投与して同様の実験を行った。GW9662 により一部心筋誘導効率改善作用が抑制されたがコントロール群と比較すると有意差を持って誘導効率が改善しており、PPAR-γを介さない ARB 独自の作用機序の存在が示唆された。

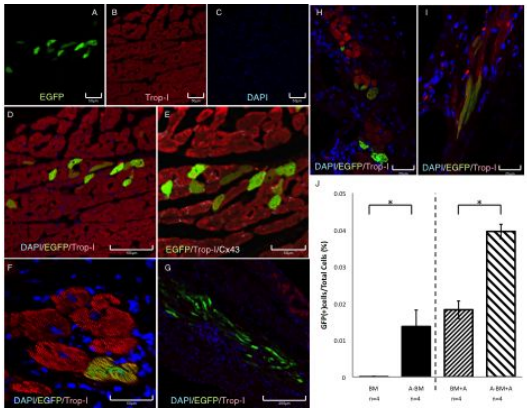


(3)ラット心筋梗塞モデルへの移植

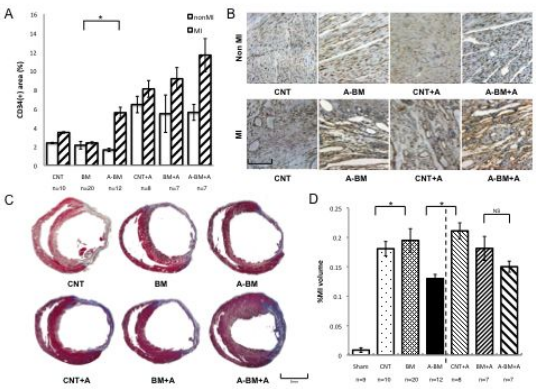
In vivo では ARB を添加して培養したヒト骨髄間葉系幹細胞をヌードラット心筋梗塞モデルに移植し、その効果を確認した。ARB 非処理ヒト骨髄間葉系幹細胞と ARB 処理ヒト骨髄間葉系幹細胞移植群に分け、心筋梗塞作成 2 週間後に開胸し、心筋梗塞巣へ細胞を移植した。移植後 2 週間及び 4 週間で ARB 処理ヒト骨髄間葉系幹細胞移植群にて心機能改善効果を確認した。



さらに得られた心筋組織から心筋梗塞部位、梗塞周囲、正常領域の免疫組織学的検討を行ったところ、ARB 処理ヒト骨髄間葉系幹細胞移植群の心筋梗塞周囲での EGFP 陽性移植細胞がより数多く生着していることを確認した。



また、ARB 処理ヒト骨髄間葉系幹細胞移植群の心筋梗塞巣は非 ARB 処理ヒト骨髄間葉系幹細胞移植群と比較して有意に縮小傾向にある事が判明した。さらなる組織学的検討により ARB 処理ヒト骨髄間葉系幹細胞移植群の心筋梗塞周囲には血管新生マーカーである CD34 陽性領域が拡大しており、血管新生機構が有意に働いていることが判明した。以上よりこの移植後心機能改善には血管新生機構が関与していることを確認した。



以上の結果より骨髄間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導過程においてレニンアンギオテンシン系が深く関与している事をつきとめた。これらの研究結果は今後の実臨床への応用の基盤となる事が期待される。

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１件）

Numasawa Y, Kimura T, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Tsuji H, Tsuruta H, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A. Treatment of human mesenchymal stem cells with angiotensin receptor blocker improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation and improved cardiac function via angiogenesis. Stem Cells. 2011 Sep;29(9):1405-14.査読あり doi: 10.1002/stem.691.

〔学会発表〕（計１件）

Yohei Numasawa, Shunichiro Miyoshi, Takehiro Kimura, Nobuhiro Nishiyama, Hiroko Tsuji, Naoko Hida, Daisuke Shinmura, Hikaru Tsuruta, Kaoru Segawa, Yuiko Tsukada, Makoto Handa, Akihiro Umezawa, Satoshi Ogawa, Angiotensin Receptor Blockers Improved Cardiomyogenic Transdifferentiation Efficacy of Human Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells in Vitro, 第75回日本循環器学会総会, 2011/8/4, パシフィコ横浜

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計０件）

○取得状況（計０件）

〔その他〕特になし

６．研究組織

(1)研究代表者

沼澤　洋平（Numasawa Yohei）
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号：60414059