

Autologous preconditioned mesenchymal stem cell sheets improve left ventricular function in a rabbit old myocardial infarction model

(ウサギ陳旧性心筋梗塞モデルに対する低酸素プレコンディショニング自己間葉系幹細胞シートの移植効果)

氏名 田中 裕也

所属 山口大学大学院医学系研究科
応用医工学系専攻 器官制御医科学領域
器官病態外科学（外科学第一）

平成 28 年 12 月

目次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	4
3. 目的	5
4. 方法	6-8
5. 結果	9-17
6. 考察	18-19
7. 結語	20
8. 謝辞	21
9. 参考文献	22-24

1. 要旨

細胞移植療法は末期心不全に対する治療法として期待されている。虚血性心疾患は心不全の主要な原因であるが、重度な虚血が存在する場合、心筋内投与といった従来の移植方法では細胞生着率が低く十分な治療効果が得られていない。近年、細胞生着率を高める移植方法として「細胞シート技術」が開発され注目を浴びている。一方、当科ではこれまでに移植細胞の機能を高める方法として「低酸素プレコンディショニング法」を考案し報告してきた。そこで我々は、これら2つのアプローチを組み合わせることで、細胞移植療法の治療効果を相乗的に高めることが出来るのではないかと考え本研究を行った。まず、ウサギから骨髄間葉系幹細胞を分離し細胞シートを作成した。同シートに低酸素プレコンディショニングを行ったところ、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の産生が有意な増加が認められた。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた tube formation assay では、低酸素処理した細胞シートの上清を用いた場合に有意な tube 形成が観察され、低酸素刺激により骨髄細胞シートの血管新生能が増強することが示された。ウサギ陳旧性心筋梗塞モデルに対する自己骨髄細胞シート移植実験では、低酸素処理した細胞シートを移植した群は通常シート移植群と比べ左心機能が有意に改善した。さらに、シート移植 4 週後に摘出したウサギ心臓の組織学的評価では、低酸素シート群における梗塞範囲の有意な縮小および梗塞辺縁部血管数の有意な増加が認められた。以上の結果より、細胞シート技術と低酸素プレコンディショニング法の併用療法は、重症虚血性心疾患に対する有効な治療戦略になると考える。

2. 研究の背景

末期心不全に対する最も有用な治療は心臓移植であるが、慢性的なドナー不足や拒絶反応といった問題が存在している。また、補助人工心臓という選択肢もあるが、デバイス性能の問題等で十分な治療成績が得られているとは言い難い。近年、第3の治療選択肢として細胞移植療法が試みられている。細胞療法に用いられる細胞種には、骨髄細胞、筋芽細胞、心臓由来細胞といった種々の細胞が報告されている [1-3]。特に骨髄間葉系幹細胞 (Bone Marrow Mesenchymal stem cell : BM-MSC) は、種々な成長因子をバランス良く分泌するため有用な細胞種として注目されている [4]。実際、心不全動物モデルを用いた BM-MSC の移植実験では劇的な心機能改善効果が示されている [5-7]。それらの非臨床試験の結果を踏まえ、TAC-HFT [8] や POEIDON [9] 等の虚血性心疾患患者に対する臨床研究が行われた。しかしながら、過剰リモデリングの抑制効果や局所の収縮能改善効果という一定の効果は示されたが、劇的な心機能改善効果とまでとはいかず、現在のところ標準治療にはなり得ていない。治療効果が不十分な原因として、これまでも様々な細胞種で言われてきた虚血心における“移植細胞の低い生着率”や“成長因子の分泌不足”といったことが挙げられている [10]。すなわち、重症虚血心に対する細胞移植療法を成功に導くには、細胞種の選択もさることながら、細胞生着率や再生誘導能を向上させる何らかの方策が必要であると言える。

近年、新たな細胞移植方法として細胞シート技術が開発され注目を浴びている [11]。同法を用いれば、細胞外マトリックスや細胞間接着を保持したまま細胞を移植することができるため、虚血組織においても移植細胞の高い生着率が得られると期待される。実際、心不全動物モデルにおける細胞シート移植は、従来の心筋内投与や冠動脈内投与と比べて有意な心機能改善効果が得られることが報告されている [12-14]。細胞移植療法の主な治療効果は、移植細胞から分泌される細胞成長因子やサイトカインによるパラクライン効果によるものであり、移植細胞の長期生着により不全心の血管新生や心筋再生、線維化抑制などが生じると考えられている [12, 13]。

これまでに当科では、細胞機能を高める方法として“低酸素プレコンディショニング法”を考案し報告してきた [15-19]。同法は、移植前の細胞を一時的に低酸素に暴露させるだけで、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) 産生能の亢進、酸化ストレス抵抗性の増強、接着分子の発現亢進等の効果が得られるというものであり、低酸素処理した細胞は虚血組織における劇的な血管新生を誘導する。

そこで我々は、細胞シート技術と低酸素プレコンディショニング法を組み合わせること (細胞シートの低酸素プレコンディショニング) で治療効果が相乗的に増強すると仮説を立て、これまでに、マウス陳旧性心筋梗塞モデルに対する心臓由来細胞シート移植実験において、低酸素シート群で血管新生の促進、線維化の抑制、心収縮能の改善といった効果を証明してきた [20]。本研究では、実用性を考慮しより高い治療効果が期待され高い汎用性を有する骨髄間葉系幹細胞シートを用いて、“細胞シートの低酸素プレコンディショニング”の心不全治療における有用性について検討を行った。また本研究では、中型動物モデルを用いて研究を行い、本治療法の早期臨床応用の可能性を検討した。

3. 目的

骨髄間葉系幹細胞シートに低酸素プレコンディショニング法を施すことにより細胞シート機能が
増強されるか否か、また、ウサギ陳旧性心筋梗塞モデルに対する細胞シート自家移植実験を行うこ
とにより心機能回復が誘導されるか否か、について検討し、“細胞シートの低酸素プレコンディショ
ニング”が実臨床で有用な治療方法となり得るかを考察することである。

4. 方法

4-1 : 実験動物

雄のニュージーランドホワイトラビット (2.5-3.5kg, KBT オリエンタル社) を使用した。本研究における全ての動物実験は山口大学動物実験委員会の承認およびヘルシンキ宣言に従って行われた。

4-2 : BM-MSC の分離

ケタミン 1mg/kg とキシラジン 3mg/kg をウサギの耳介静脈から投与し麻酔した。腸骨を穿刺し 3ml の骨髓を採取した [21]。10% FBS (fetal Bovine Serum)、1% penicillin-streptomycin となるように調整した DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) 培地で骨髓液を懸濁した。懸濁液を 100 μ m 孔のフィルターで濾過し、3 枚の 10cm ディッシュに播種し、37°C、20%酸素下で培養した。MSC の接着能を利用して細胞を分離した。4 日後に培養液を交換し、非接着細胞を除去した。以後は 2 日毎に培養液の交換を行い、80-90%コンフルエントに達したところでトリプシン処理により細胞を剥離し、新しい培養皿へ継代した。各種実験には、2~3 継代目の細胞を使用した。

4-3 : BM-MSC の骨・軟骨・脂肪への分化能

BM-MSC は骨・軟骨・脂肪へ分化する特性がある [22]。同細胞が分離されていることを確かめるため、各種誘導培地を用いて 3 系統への分化を誘導した。骨分化誘導 14 日後に ALP assay kit (タカラバイオ) を用いた細胞内の ALP 活性の評価、脂肪分化誘導 14 日後にオイルレッド O 染色による中性脂肪沈着の評価、軟骨分化誘導 21 日後に酸性ムコ多糖測定キット (コスモバイオ) による酸性ムコ多糖量の評価をそれぞれ行った。

4-4 : BM-MSC シート作成と低酸素プレコンディショニング

6 well の温度応答性培養皿 (UpCell®; CellSeed) に 3 継代目の BM-MSC を 6×10^5 個/well となるように播種し、normoxia 条件下 (37°C, 20% O₂, 5% CO₂) で数日間培養した。その後、培養皿を hypoxia 条件下 (33°C, 2% O₂, 5% CO₂) で培養し、in vitro および in vivo 実験を行った。温度応答性培養皿を 20-22°C の状態で静置すると、細胞が培養皿から剥離しシート状構造物として細胞を回収することができる。これをウサギ骨髓由来間葉系幹細胞シート (BM-MSC シート) とする。

4-5 : 酵素結合免疫吸着法 (ELISA) による VEGF 産生能の評価

BM-MSC シートを normoxia と hypoxia の条件でそれぞれ培養し、0 時間、24 時間、48 時間、72 時間時点で培養上清を回収した。培養上清中の VEGF 濃度は、ELISA キット (R&D systems) を用いてキット添付マニュアルに従い測定した。

4-6 : ウェスタンブロット法によるカスパーゼ 7 の解析

BM-MSC シートを normoxia と hypoxia の条件でそれぞれ培養し、0 時間、24 時間、48 時間、72

時間時点で、全細胞からのタンパク質(10-30 µg)を抽出した。1次抗体として、抗カスパーゼ7抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗β-actin ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いた。HRP 標識された2次抗体 (DAKO) を反応させ、chemiluminescence western blot detection system (GE Healthcare) を用いて検出した。

4-7 : TUNEL 法によるアポトーシス検出

Terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TDT)-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling (TUNEL) 法を用いて細胞アポトーシスを検出した。BM-MSC シートを normoxia と hypoxia の条件でそれぞれ培養した。4%パラホルムアルデヒド (Wako) で固定した細胞シートを PBS で洗浄し、さらに 0.1% Triton-X/Protein blocking solution (Dako-Japan) で透過処理した。TUNEL アッセイは In Situ Cell Death Detection Kit (Roche) を用いプロトコールに従って行った。6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いて細胞核を染色したのち、蛍光顕微鏡 (BZ-9000 Generation II system; Keyence) を用いて細胞を観察した。

4-8 : Tube formation assay を用いた血管新生誘導能の評価

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human umbilical endothelial cell: HUVEC) を EGM2 培地 (Lonza) で培養した。HUVEC をトリプシン処理し、10%FBS/DMEM 培地で懸濁した。Matrigel (Corning) でコーティングした 96 ウェル培養皿に 2×10^4 個/ウェル (75 µl) となるように播種した。続いて、BM-MSC シートの培養上清 (normoxia と hypoxia) を 75 µl ずつ加え懸濁した。また、コントロールとして未使用の 10%/DMEM 培地を 75µl ずつ加えた。9 時間の通常培養後に Angiogenesis Analyzer for ImageJ software (National Institutes of Health) を用いて評価した [23]。

4-9 : スクラッチアッセイによる細胞遊走能評価

心線維芽細胞をウサギの心臓より分離し [23]、10% FBS、1% penicillin/streptomycin、1% 非必須アミノ酸 (Thermo Fisher Scientific) 入りの IMDM (Iscove's modified Dulbecco's Medium, Thermo Fisher Scientific) で培養した。12 ウェルのプレートに心線維芽細胞をコンフルエントとなるように播種した。1000 µl 用のピペットチップでウェルをスクラッチし細胞間隙を作成した。PBS で洗浄後、BM-MSC シートの培養上清 (normoxia と hypoxia)、コントロールとして未使用培地を加え 12 時間培養した。0 時間後、12 時間後の状態を撮影し、BZ-X analyzer software (Keyence) で細胞の遊走した面積を算出した。

4-10 : ウサギ陳旧性心筋梗塞モデルの作製と細胞シート移植

ウサギ耳介静脈に 24G 留置針でルート確保後、ケタミン 1mg/kg とキシラジン 3mg/kg を静脈内投与し麻酔した。内径 3mm のチューブ気管内挿管し、酸素 1L/分、笑気 1L/分で人工呼吸管理とした(呼吸回数 30 回、1 回換気量 20ml/kg)。ケタミンとキシラジンを一定間隔で投与し麻酔を維持しながらウサギを仰臥位とし、消毒後に清潔布をかけた。第 4 肋間で左開胸後、5-0 プロリン (Ethicon) で前下行枝を結紮し心筋梗塞を作成した。術前と術後に抗生剤(ゲンタマイシン 2.5mg/kg)を投与した [21]。4 週間後に心臓エコー検査を行

い、左室駆出率 (LVEF) が 40~60% となったものに細胞シートを移植することとした。同様の方法で開胸し、セプラフィルム (Sanofi US) に付着させた BM-MSC シートを梗塞部に移植した [20]。シート移植 4 週後にウサギを犠牲死させ心臓を摘出した。

4-11 : 心臓エコー検査

心筋梗塞作成 4 週後とシート移植 4 週後に心臓エコー検査を行った。ペントバルビタール 20 mg/kg で静脈麻酔し、Vivid i (GE Medical Systems) を用いて左室駆出率 (LVEF) と左室内径短絡率 (LVFS) を計測した。

4-12 : 組織学的検査

摘出した心臓は 10%ホルマリンで 1 晩固定した。パラフィンで包埋し、3 μ m 厚のスライドを作成した。梗塞部の線維化を評価するためにマッソン・トリクローム染色を行った。BZ-II analyzer (Keyence) を用いて各群の梗塞範囲を計測した。また、DyeLight 488 標識トマトレクチ (Vector Laboratories) を用いて血管内皮を染色し、梗塞辺縁部の血管密度を測定した (無作為 10 視野)。

4-13 : 統計学的分析

全てのデータを平均値 \pm 標準偏差で表記した。2 群間の統計学的な比較は Student's t-test で評価した。 $p < 0.05$ もしくは $p < 0.01$ をもって統計学的に有意差ありとした。統計学的解析は全て、STATA software (Lightstone Corp) を用いた。

5. 結果

5-1 : BM-MSC の分離と 3 系統への分化

BM-MSC を同細胞の接着能を利用し分離した [22]。骨髓採取 4 日後には MSC と思われる紡錘形の細胞が観察された。2 週間後には同細胞は 80-90%コンフルエントに達した (図 1A)。同細胞はウサギ BM-MSC のマーカーとされる CD44 が陽性であった (図 1B)。BM-MSC は骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を有するとされていることから、細胞の分離精製度を確かめるため各種誘導培地を用いて 3 系統への分化を誘導した。骨分化誘導 21 日後、細胞内 ALP 活性はコントロールと比し有意に上昇しており骨分化能を有することが示された (図 1C)。また、脂肪分化誘導 14 日後のオイルレッド染色では脂肪滴の沈着が確認された (図 1D)。軟骨分化 21 日後に酸性ムコ多糖量の測定を行ったところコントロールと比し有意な上昇を認めた (図 1E)。これらの結果より、分離した細胞は BM-MSC であると確認した。

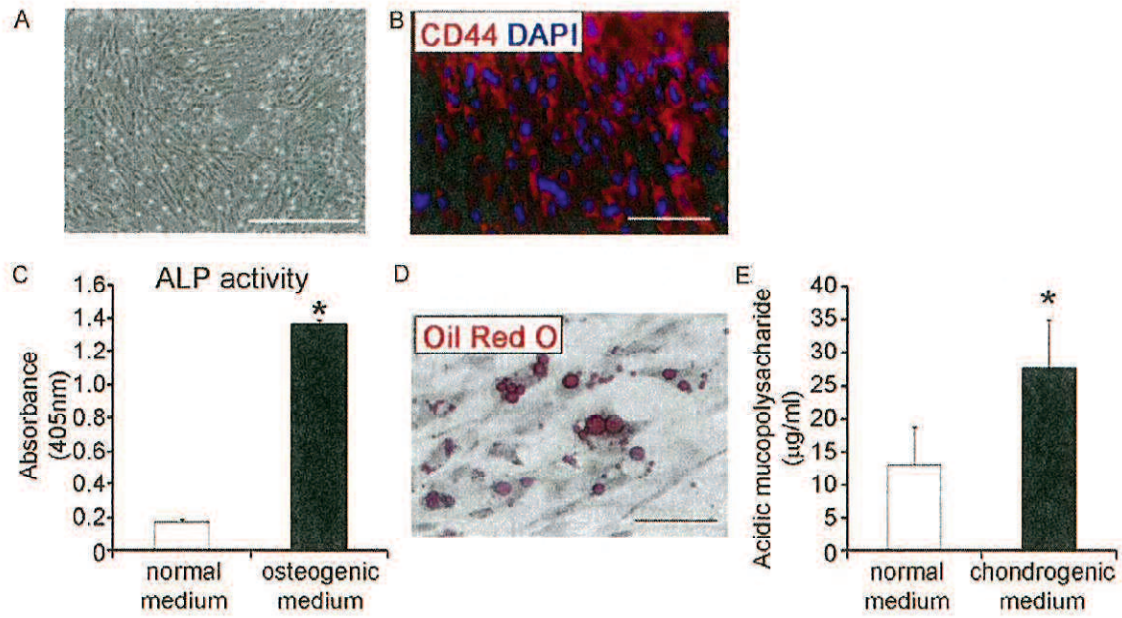


図 1. 骨髄間葉系幹細胞 (BM-MSC) の分離と 3 系統への分化

(A) 骨髄採取 2 週後に線維芽細胞様の細胞が観察された (スケールバーは 500 µm を表す)。(B) ウサギ BM-MSC のマーカーである CD44 の発現がみられた。(C) 細胞内 ALP 活性が上昇しており骨分化が示された (n=9 ずつ)。(D) オイルレッド染色にて脂肪滴の沈着がみられ、脂肪分化が示された (スケールバーは 100 µm を表す)。(E) 軟骨のマーカーである酸性ムコ多糖の上昇がみられ、軟骨分化が示された (n=5 ずつ)。

5-2：低酸素プレコンディショニングはBM-MSCシートからのVEGF分泌を促進させる

我々は以前、骨髄細胞（MSC等を含む雑多な細胞群）に24時間の低酸素プレコンディショニングを行いVEGFの発現が上昇することを報告している[26]。本研究では、低酸素プレコンディショニングが骨髄細胞と同様にBM-MSCシートの機能を増強させ得るか検討した。温度応答性培養皿を用いてBM-MSCシートを作成し、低酸素条件（2% O₂）で培養した。24時間後、48時間後、72時間後に培養上清を回収し、ELISAによりVEGF濃度を測定した。

骨髄細胞に対する過去の検討では、24時間の低酸素処理でVEGF発現のピークを迎えていたが、BM-MSCシートでは48時間の低酸素培養で最もVEGF濃度が上昇した(図2A)。この結果から、細胞種類や細胞構成に応じて適切な低酸素プレコンディショニング条件が異なると考えられた。また、カスパーゼ7とTUNEL染色の結果から、低酸素プレコンディショニングによりアポトーシスは誘導されないことが示された(図2B、2C)。これらの結果より、BM-MSCシートの低酸素プレコンディショニングは48時間行うこととした。

続いて、低酸素プレコンディショニングによりBM-MSCの血管新生能が増強されるのかを検証した。HUVECとBM-MSC培養上清を用いたtube formation assayでは、hypoxiaの培養上清を用いることで有意にtube formationが促進された(図3A)。これらの結果より、低酸素プレコンディショニングはBM-MSCシートからのVEGF分泌を促進することで、血管新生能を増強させることが示唆された。

さらに、低酸素プレコンディショニングがBM-MSCの抗線維化作用を増強させるか検証した。心線維芽細胞とBM-MSCの培養上清を用いたスクラッチアッセイでは、hypoxiaの培養上清を用いた場合、心線維芽細胞の遊走能が有意に抑制された(図3B)。つまり、低酸素プレコンディショニングは、BM-MSCシートの血管新生作用、抗線維化作用を共に増強させると考えられた。

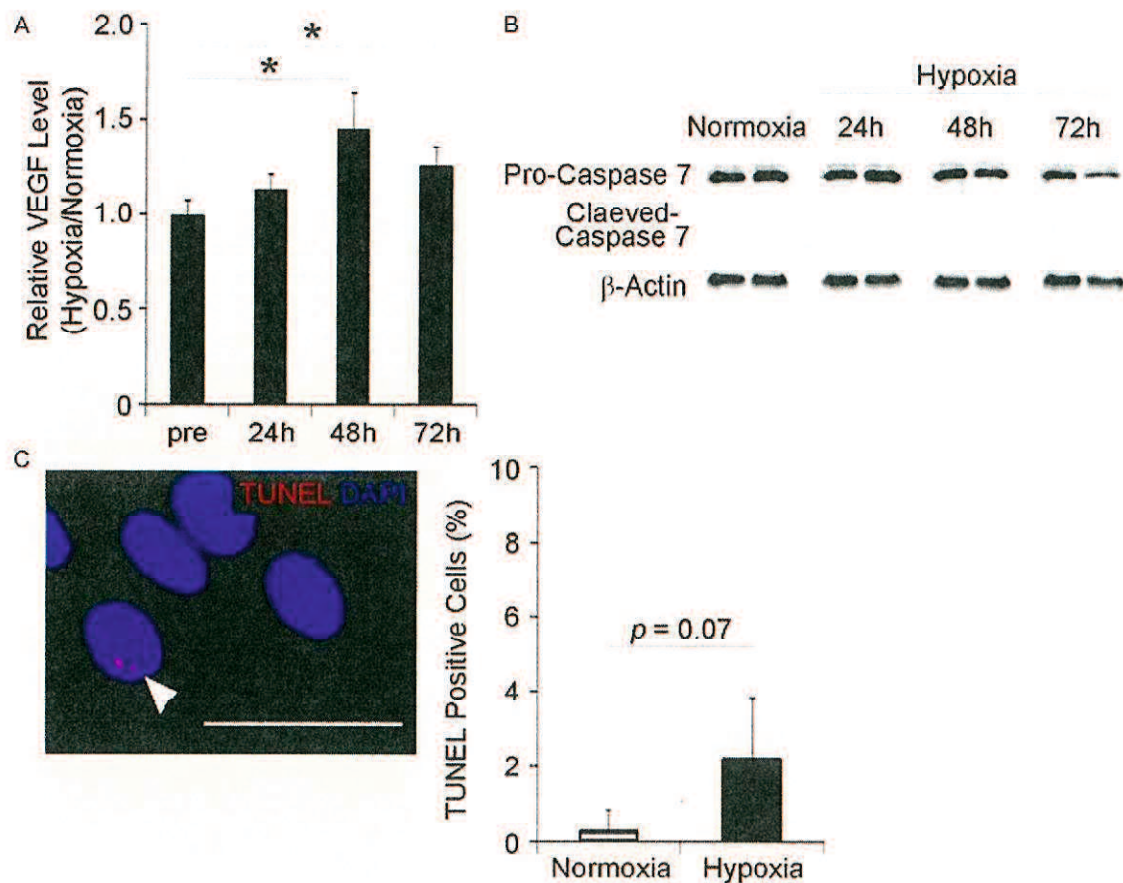


図 2. 低酸素プレコンディショニングは BM-MSC シートからの VEGF 分泌を促進した。

(A) ウサギ BM-MSC シートを低酸素条件 (2%O₂) で培養し、0 時間、24 時間、48 時間、72 時間で培養上清を回収した (n=5 ずつ)。ELISA により培養上清中の VEGF 濃度を測定した (* は $p < 0.05$)。低酸素条件で 48 時間培養した場合、最も VEGF が分泌された。(B) BM-MSC シートは normoxia 培養でも hypoxia 培養でも活性化カスパーゼ 7 は検出されなかった。つまり、低酸素プレコンディショニングによりアポトーシスを誘導されなかった。(C) normoxia 培養、hypoxia 培養で TUNEL 陽性細胞数に有意な差は見られなかった (n=4 ずつ、スケールバーは 50 μ m を表す)。

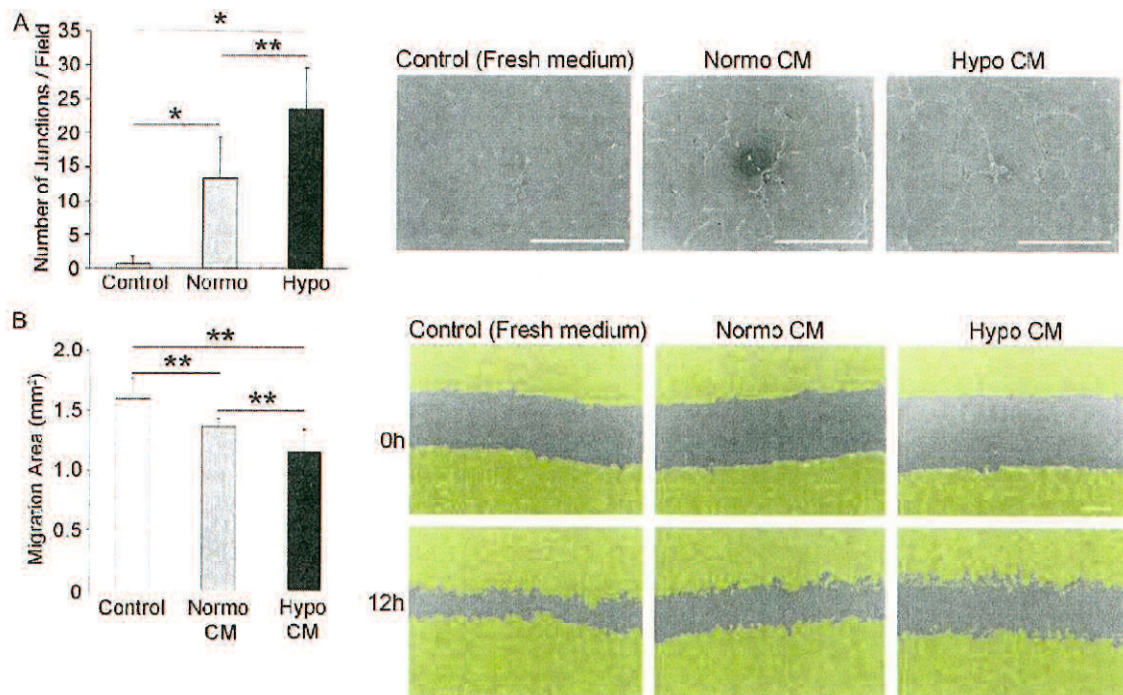


図 3. 低酸素プレコンディショニングは BM-MSC シートの血管新生作用、抗線維化作用を増強した。

(A) ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を BM-MSC シートの培養上清、または未使用の培地で培養した。10 倍視野で tube の交点数を測定した。培養上清を用いると管腔形成は有意に増加し、hypoxia の培養上清ではその効果は顕著であった (n=3 ずつ、スケールバーは 50 μm を表す)。(B) スクラッチアッセイを用いて低酸素プレコンディショニングシートの抗線維化作用を検証した。コンフルエントの心線維芽細胞をスクラッチし約 1.2mm の間隙を作成した。その後、BM-MSC シートの培養上清を用いて 12 時間培養した。細胞遊走した面積を算出し各群間で比較した (黄色部分が細胞、n=6 ずつ、スケールバーは 500 μm を表す)。BM-MSC 培養上清を用いると心線維芽細胞の遊走が抑制され、hypoxia の培養上清ではその効果がより顕著であった。* は $p < 0.01$ 、** は $p < 0.05$ を表す。

5-3 : 低酸素プレコンディショニングシートの移植は梗塞心の心機能を回復する

低酸素プレコンディショニングシートの治療効果を検証するために、ウサギ陳旧性心筋梗塞モデルに対する移植実験を行った。BM-MSC シートを移植 48 時間前から低酸素条件で培養し(図 4A)、セプラフィルムと共にシートを梗塞部に移植した(図 4B)。また、シート移植前と移植 28 日後に心臓エコー検査を行い LVEF と LVFS を計測した(図 4B)。コントロールと比べ、BM-MSC シート移植により LVEF と LVFS が有意に改善した(図 4C)。さらに、hypoxia シート群は normoxia シート群と比べ LVEF と LVFS が有意に改善した。これにより、低酸素プレコンディショニングが BM-MSC シートの治療効果を高めることが示された。

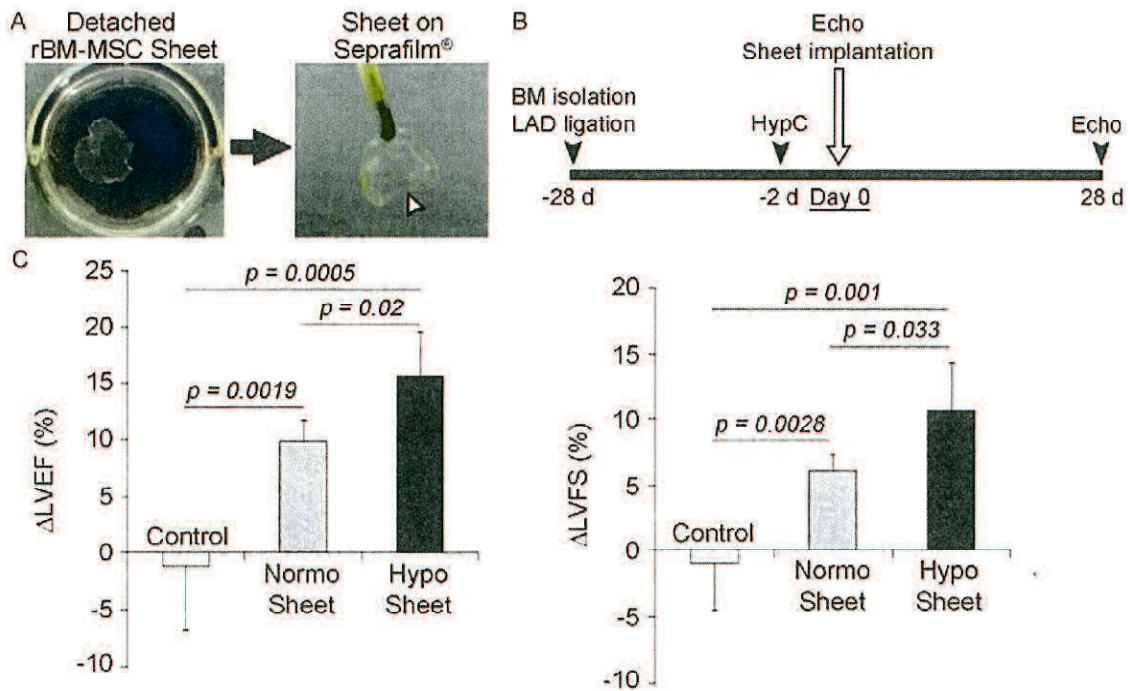


図 4. ウサギ陈旧性心筋梗塞モデルへの BM-MSC シート移植。

(A) 温度応答性培養皿を 20℃以下にすることでウサギ BM-MSC がシート状に回収された。セプトラフィルムに細胞シートを付着させ心臓に移植した。(B) シート移植のプロトコール。(C) 低酸素プレコンディショニングシートの移植により心機能は有意に改善した。シート移植前とシート移植 4 週後に心臓エコーを行い、LVEF と LVFS の変化量を算出した (n=5 ずつ)。

5-4 : 低酸素プレコンディショニングシートの移植は梗塞範囲を減少させ血管新生を誘導する

シート移植 4 週後に心臓を摘出し組織学的評価を行った。左室の梗塞範囲を検証するためマッソン・トリクローム染色を行った。シート移植群ではコントロールと比べ有意に梗塞範囲が縮小していた(図 5A)。さらに、hypoxia シート群は normoxia シート群と比べ、梗塞範囲が有意に縮小していた。また、シート移植による血管新生作用を検証するため、梗塞辺縁部における血管数を測定した。コントロールと比べ normoxia シート群では血管密度が有意に高値であった。さらに、hypoxia シート群は normoxia シート群と比べ、血管密度が有意に高値であった(図 5B)。Tube formation assay の結果と同様に (図 3A)、in vivo でも低酸素プレコンディショニングシートの血管新生作用が示された。

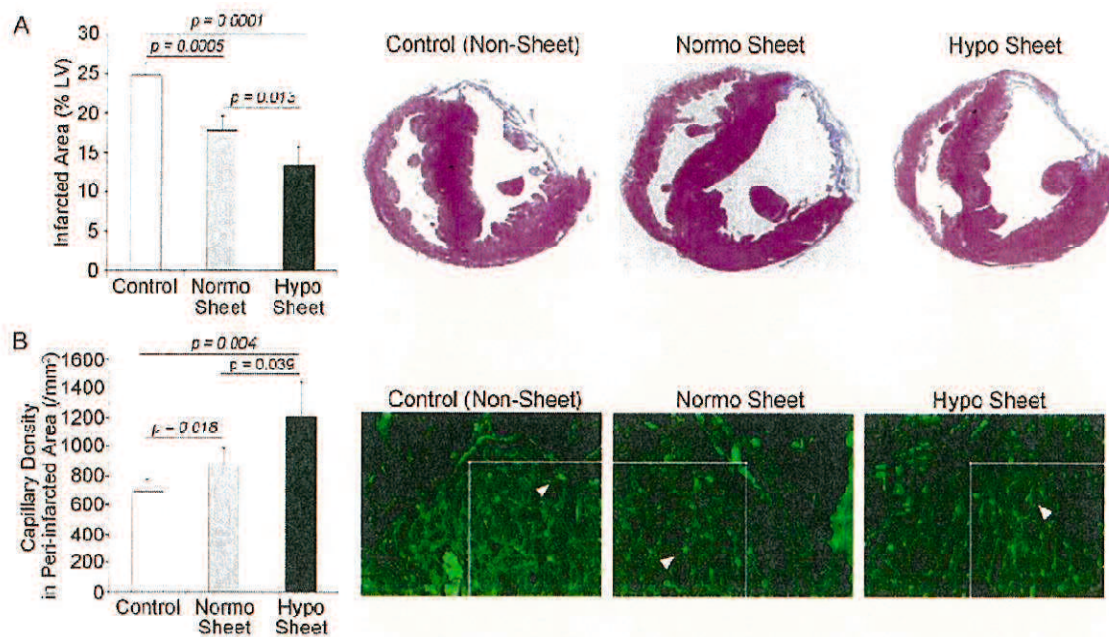


図 5. 低酸素プレコンディショニングシート移植は梗塞範囲を減少させ血管新生を促進した。

(A) 摘出心のマッソン・トリクローム染色。Hypoxia シート移植群では normoxia シート移植群とコントロールに比し有意に梗塞範囲が少なかった (n=5 ずつ)。(B) レクチン染色にて梗塞辺縁部における血管密度を測定した (緑：レクチン、白正方形：一辺 200 μm)。Hypoxia シート移植群では血管数が有意に高値であった (n=5 ずつ)。

6. 考察

これまでに我々は、心臓由来細胞シートに対する低酸素プレコンディショニングの有用性およびマウス心筋梗塞モデルに対する同シートの治療効果を実証し報告してきた [20]。しかし本法を実臨床に応用するためには、より大きな動物で検証する必要がある。そのため本研究では、中型動物の陳旧性心筋梗塞モデルにおける自己細胞シート移植の治療効果を検討することとした。

本研究で用いた BM-MSC は、VEGF、PDGF (Platelet Derived Growth Factor)、SDF (stromal cell-derived factor)、MMPs (matrix metalloproteinases) 等の様々な細胞成長因子を分泌することが出来る。これらの因子は、血管新生、細胞外マトリックスのリモデリング、幹細胞の動員等を促進する効果があり、同細胞の移植療法は虚血性心疾患治療に大きな可能性を秘めている [27、28]。本研究では、ウサギ BM-MSC シートにおいても低酸素プレコンディショニング法が有効であるか否かを確認したが、(マウス心臓由来細胞シートを用いたこれまでの結果と同様に、) 低酸素刺激により VEGF の分泌が亢進されることが認められた。このことは、小動物のみならずより大型の動物、また細胞種を問わず “細胞シートの低酸素プレコンディショニング” が普遍的に有効であることを示唆している。また、細胞シートの VEGF 分泌を高める別の方法として、ウイルスベクターによる過剰発現系が報告されている [29]。この報告においても、心筋梗塞モデルに対する VEGF 過剰発現細胞シート移植が高い治療効果を発揮することが示されており、我々の結果と照らし合わせてみても、移植細胞シートにおける VEGF 産生亢進が治療効果を増強されることは確実である。しかし、ウイルスベクターを用いた細胞シートの機能賦活化は、腫瘍化やアレルギー反応の惹起などのリスクがあるためできれば避けたい方策である。対して我々の考案した低酸素プレコンディショニング法は、細胞に重大な障害を与えることもなく、腫瘍化などのリスクも低い。また、通常の培養装置があればどの施設でも簡便に行うことが可能な技術であり、実用化へ向けた極めて汎用性の高い方法と言える。また本研究で行った細胞シート自家移植実験では、“血管新生の促進”に加えて“線維化の抑制”が認められており、単に VEGF 産生亢進による血管新生誘導だけでなく、より多様な機能増強が誘導されている可能性がある。すなわち、低酸素プレコンディショニングは細胞シート治療の極めて有用なツールになると考えられる。

その一方で、低酸素プレコンディショニングによるウサギ BM-MSC の機能増強の分子メカニズムの理解が不十分であるという課題もある。本研究では、低酸素プレコンディショニングにより、ウサギ BM-MSC シート内の細胞外シグナル調節キナーゼ (Extracellular Signal-regulated Kinase : Erk) 経路が活性化されることを見出している (データ未掲載)。Erk 経路は、低酸素条件下において HIF (hypoxia-inducible factor、低酸素誘導因子) を介した VEGF 誘導に関与していると報告されており [30]、BM-MSC シートにおける Erk 経路を介した血管新生誘導効果の向上が推察される。しかし、ヒト心臓細胞由来シートを用いた我々のこれまでの研究では、低酸素プレコンディショニングにより細胞シート内の PI3K (phosphoinositide 3-kinase) / Akt 経路が活性化されており、本研究で得られた結果との相違が認められる [20]。この点については、ウサギ BM-MSC シートでは低酸素プレコ

ンディショニングによる Akt リン酸化の亢進は見られないという興味深い結果を得ている（データ未掲載）。つまり、低酸素条件下での VEGF 発現亢進には、細胞種によって異なった経路が関与していることが示唆される。すなわち、細胞シートの低酸素プレコンディショニングにおける分子メカニズムの解明には更なる検証が必要であると考えられた。

また本研究では、低酸素プレコンディショニングによる BM-MSC シートの梗塞心における抗線維化作用の増強が確認された。最近の報告では、MSC を低酸素状態にするとレプチンが誘導され、その結果 Smad2 や MRTF-A (Myocardin-related Transcription Factor-A) 関連シグナルが阻害されることで抗線維化作用が増強されることが明らかにされた [1、31]。本研究ではレプチンに注目した検討は行っていないが、BM-MSC シートによる抗線維化の作用機序の有望な候補機序と考えており今後の検討課題である。また、抗線維化作用を有する別の候補因子として TGF- β (Transforming Growth Factor- β) のアンタゴニストであるエンドグリンも知られている。エンドグリンのプロモーター領域には低酸素応答性領域 (HIF-responsible element) に存在していると報告されており、低酸素に伴い直接発現が調節される候補分子の一つである [32]。しかしながら、本研究で行ったプレ実験においては、低酸素プレコンディショニングによるウサギ BM-MSC シートでのエンドグリン発現亢進は認められなかった（データ未掲載）。他の転写因子との相互作用など複雑な調節機構が予想されるが、少なくとも機能賦活化したウサギ BM-MSC シートの抗線維化作用においてエンドグリンは積極的な関与はないのかもしれない。この点についても今後詳細に検討する必要がある。

本研究により、自己細胞シートの低酸素プレコンディショニングの実用性が中型動物において認められたことで、本法の実臨床利用の可能性が示された。しかし臨床応用を考えた場合には、自家細胞シート移植の実用性が高い一方で、“技術面”、“費用面”、“移植のタイミング”など解決すべき課題は多い。例えば、自己 BM-MSC シートの調整には数週間を要するため、急性期の患者には使用することが出来ない。心筋梗塞患者を対象に BM-MSC の冠動脈内投与が行われた POSEIDON 試験では他家移植の安全性が示されていることから [6]、今後、BM-MSC バンクが設立されるなどしてシート調整期間を大幅に短縮させることが可能になれば、低酸素プレコンディショニングにより機能賦活化した BM-MSC シートの心不全治療への応用も現実味を帯びる。

7. 結語

細胞シートに対する低酸素プレコンディショニングは、骨髄由来間葉系幹細胞シートに対しても有効であり、中型動物を用いた効果実証試験においても高い治療効果が認められた。すなわち本研究成果は、低酸素プレコンディショニングにより機能賦活化した BM-MSC シート移植は陳旧性心筋梗塞に対する有望な治療法の 1 つとなり得ることを示した。

8. 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました山口大学大学院 器官病態外科学講座（第一外科）、濱野公一教授に深謝申し上げます。

また、実験のご指導を頂きました、細山徹先生（山口大学大学院 器官病態外科学講座）、西本新先生（山口大学大学院 器官病態外科学講座）、上野耕司先生（山口大学大学院 器官病態外科学講座）に感謝申し上げます。

9. 参考文献

- [1] Cheng K, Blusztajn A, Shen D, Li TS, Sun B, Galang G, Zarembinski TI, Prestwich GD, Marban E, Smith RR and Marban L. Functional performance of human cardiosphere-derived cells delivered in an in situ polymerizable hyaluronan-gelatin hydrogel. *Biomaterials* 2012; 33: 5317-5324.
- [2] Hagege AA, Marolleau JP, Vilquin JT, Alheritiere A, Peyrard S, Duboc D, Abergel E, Messas E, Mousseaux E, Schwartz K, Desnos M and Menasche P. Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation* 2006; 114: 108-113.
- [3] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A and Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705.
- [4] Williams AR and Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res* 2011; 109: 923-940.
- [5] Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, Coulter SC, Lin J, Ober J, Vaughn WK, Branco RV, Oliveira EM, He R, Geng YJ, Willerson JT and Perin EC. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 2005; 111: 150-156.
- [6] Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF and Martin BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1919-1925.
- [7] Price MJ, Chou CC, Frantzen M, Miyamoto T, Kar S, Lee S, Shah PK, Martin BJ, Lill M, Forrester JS, Chen PS and Makkar RR. Intravenous mesenchymal stem cell therapy early after reperfused acute myocardial infarction improves left ventricular function and alters electrophysiologic properties. *Int J Cardiol* 2006; 111: 231-239.
- [8] Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, Tracy M, Ghersin E, Johnston PV, Brinker JA, Breton E, Davis-Sproul J, Schulman IH, Byrnes J, Mendizabal AM, Lowery MH, Rouy D, Altman P, Wong Po Foo C, Ruiz P, Amador A, Da Silva J, McNiece IK, Heldman AW, George R and Lardo A. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA* 2012; 308: 2369-2379.
- [9] Heldman AW, DiFede DL, Fishman JE, Zambrano JP, Trachtenberg BH, Karantalis V, Mushtaq M, Williams AR, Suncion VY, McNiece IK, Ghersin E, Soto V, Lopera G, Miki R, Willens H, Hendel R, Mitrani R, Pattany P, Feigenbaum G, Oskouei B, Byrnes J, Lowery MH, Sierra J, Pujol MV, Delgado C, Gonzalez PJ, Rodriguez JE, Bagno LL, Rouy D, Altman P, Foo CW, da Silva J, Anderson E, Schwarz R, Mendizabal A and Hare JM. Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear

- bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial. *JAMA* 2014; 311: 62-73.
- [10] Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu M, Cheng L, Palasis M and Wilensky RL. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006; 27: 1114-1122.
- [11] Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, Kikuchi A, Umezumi M and Okano T. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 2002; 90: e40.
- [12] Memon IA, Sawa Y, Fukushima N, Matsumiya G, Miyagawa S, Taketani S, Sakakida SK, Kondoh H, Aleshin AN, Shimizu T, Okano T and Matsuda H. Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130: 1333-1341.
- [13] Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S and Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 2006; 12: 459-465.
- [14] Zakharova L, Mastroeni D, Mutlu N, Molina M, Goldman S, Diethrich E and Gaballa MA. Transplantation of cardiac progenitor cell sheet onto infarcted heart promotes cardiogenesis and improves function. *Cardiovasc Res* 2010; 87: 40-49.
- [15] Akita T, Murohara T, Ikeda H, Sasaki K, Shimada T, Egami K and Imaizumi T. Hypoxic preconditioning augments efficacy of human endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Lab Invest* 2003; 83: 65-73.
- [16] Kubo M, Li TS, Kamota T, Ohshima M, Qin SL and Hamano K. Increased expression of CXCR4 and integrin alphaM in hypoxia-preconditioned cells contributes to improved cell retention and angiogenic potency. *J Cell Physiol* 2009; 220: 508-514.
- [17] Kubo M, Li TS, Suzuki R, Shirasawa B, Morikage N, Ohshima M, Qin SL and Hamano K. Hypoxic preconditioning increases survival and angiogenic potency of peripheral blood mononuclear cells via oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294: H590-595.
- [18] Kudo T, Hosoyama T, Samura M, Katsura S, Nishimoto A, Kugimiya N, Fujii Y, Li TS and Hamano K. Hypoxic preconditioning reinforces cellular functions of autologous peripheral blood-derived cells in rabbit hindlimb ischemia model. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 444: 370-375.
- [19] Kudo T, Kubo M, Katsura S, Nishimoto A, Ueno K, Samura M, Fujii Y, Hosoyama T and Hamano K. Hypoxically preconditioned human peripheral blood mononuclear cells improve blood flow in hindlimb ischemia xenograft model. *Am J Transl Res* 2014; 6: 570-579.
- [20] Hosoyama T, Samura M, Kudo T, Nishimoto A, Ueno K, Murata T, Ohama T, Sato K, Mikamo A, Yoshimura K, Li TS and Hamano K. Cardiosphere-derived cell sheet primed with hypoxia improves left ventricular function of chronically infarcted heart. *Am J Transl Res* 2015; 7: 2738-2751.
- [21] Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J and Imaizumi T. Augmentation of

- postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 2001; 103: 897-903.
- [22] Qu Z, Xu H, Tian Y and Jiang X. Atorvastatin improves microenvironment to enhance the beneficial effects of BMSCs therapy in a rabbit model of acute myocardial infarction. *Cell Physiol Biochem* 2013; 32: 380-389.
- [23] Arnaoutova I, George J, Kleinman HK and Benton G. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis* 2009; 12: 267-274.
- [24] Hutchinson KR, Lord CK, West TA and Stewart JA, Jr. Cardiac fibroblast-dependent extracellular matrix accumulation is associated with diastolic stiffness in type 2 diabetes. *PLoS One* 2013; 8: e72080.
- [25] Lee BH, Kim WH, Choi MJ, Rho JR and Kim WG. Chronic heart failure model in rabbits based on the concept of the bifurcation/trifurcation coronary artery branching pattern. *Artif Organs* 2002; 26: 360-365.
- [26] Li TS, Hamano K, Suzuki K, Ito H, Zempo N and Matsuzaki M. Improved angiogenic potency by implantation of ex vivo hypoxia prestimulated bone marrow cells in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H468-473.
- [27] Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S and Epstein SE. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004; 94: 678-685.
- [28] Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S and Epstein SE. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 2004; 109: 1543-1549.
- [29] Yeh TS, Fang YH, Lu CH, Chiu SC, Yeh CL, Yen TC, Parfyonova Y and Hu YC. Baculovirus-transduced, VEGF-expressing adipose-derived stem cell sheet for the treatment of myocardium infarction. *Biomaterials* 2014; 35: 174-184.
- [30] Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Zhou XM, Foster D, Brugge JS and Sukhatme VP. Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature* 1995; 375: 577-581.
- [31] Hu X, Wu R, Jiang Z, Wang L, Chen P, Zhang L, Yang L, Wu Y, Chen H, Chen H, Xu Y, Zhou Y, Huang X, Webster KA, Yu H and Wang J. Leptin signaling is required for augmented therapeutic properties of mesenchymal stem cells conferred by hypoxia preconditioning. *Stem Cells* 2014; 32: 2702-2713.
- [32] Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C and Bernabeu C. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* 2002; 277: 43799-43808.