

**Influence of aging on the quantity and quality of human
cardiac stem cells**

(加齢がヒト心筋幹細胞の量と質に与える影響)

氏名 中村 玉美

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 11 月

目次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	4
3. 目的	5
4. 方法	6
5. 結果	10
6. 考察	24
7. 結語	27
8. 謝辞	28
9. 参考文献	29

1. 要旨

加齢は様々な組織幹細胞の細胞老化を引き起こし、再生能を低下させることが知られている。そこでわれわれは、2歳から83歳までの心臓手術患者26名から得られたヒト心筋幹細胞を用いて、加齢がヒト心筋幹細胞の量と質に与える影響を検討した。まず心臓手術時に採取した右房組織の一部から、心筋幹細胞の一種である Cardiosphere-derived cell (CDC) を分離・培養した。そして CDC の細胞老化と DNA 障害の程度、および細胞機能（増殖能、成長因子発現量、血管新生能）について検討した。まず増殖能は年齢との間に明らかな関連はなく、全ての検体から実験に必要な十分量の CDC が培養可能であった。細胞老化のマーカーである senescence-associated β -galactosidase 染色陽性率と、DNA 障害のマーカーである γ H2AX 陽性率については、65歳以上の患者由来 CDC で高い傾向がみられた。また心筋再生の主要なメカニズムであるパラクライン効果を担う VEGF、HGF、IGF-1、SDF-1、TGF- β の発現量は各検体で様々であり、加齢に伴う減少はみられなかった。In vitro 血管新生アッセイにおいても、加齢による血管新生能低下はみられなかった。以上から加齢がヒト心筋幹細胞の量と質に与える影響は、非常に限定的であることが明らかとなった。これは将来自家心筋幹細胞移植を臨床応用する際に、高齢心不全患者でも移植治療の適応となりうることを示す重要な結果である。

2. 研究の背景

内科的治療困難な重症心不全患者に対する心臓移植は、深刻なドナー不足や65歳未満という適応年齢から、その恩恵にあずかる患者はごくわずかである。そのような状況下で心臓移植に代わる有望な治療法として、細胞移植治療が注目されている。近年、成人の心臓にも心筋幹細胞が存在し、心筋再生、血管再生が起こっていることが明らかとなった [1-3]。現在、心筋幹細胞は心筋再生治療においてきわめて有望な細胞ソースと考えられており、少量の心筋組織から大量の心筋幹細胞およびその支持細胞 (Cardiosphere-derived cell: CDC) を培養する方法が確立している [2-5]。このような心筋幹細胞研究の進歩により、他家移植でみられる拒絶反応や倫理問題などが回避可能な、自己心筋幹細胞を用いた移植治療が実現可能となった。ヒトで行われた初めての CDC 自家移植の臨床試験である CADUCEUS (CARDiosphere-Derived aUtologous Stem Cells to Reverse Ventricular dysfunction) トライアルはすでに終了し、その安全性が確認されている [6, 7]。

一方、加齢に伴い組織幹細胞が細胞老化を起こし、その結果組織再生能が低下することが知られている [8]。例えば骨髄幹細胞は、加齢により血管新生能が低下する [9]。心筋幹細胞における細胞老化についてはいくつかの研究があり、加齢マウスや高齢ヒト由来の c-kit 陽性心筋幹細胞は細胞老化を起こしていることが報告されている [10, 11]。CDC については、加齢マウス由来 CDC は細胞老化をきたしており、増殖能、分化能、幹細胞マーカーの発現が低下するとの報告がある [12]。しかしながら加齢が心筋幹細胞に与える影響については、未だ十分に解明されているとは言い難い。近年、高齢心不全患者は年々増加傾向であり [13]、CDC 自家移植の臨床応用へ向け、加齢が CDC に与える影響を検討することは必要不可欠である。

今回、われわれは様々な年齢の患者由来 CDC を用い、加齢が細胞老化や成長因子産生等の細胞機能に与える影響を検討した。本研究は心筋幹細胞移植の臨床応用の際に、有用な情報をもたらすと考えられる。

3. 目的

加齢がヒト心筋幹細胞の細胞老化および細胞機能に与える影響を明らかにし、65歳以上の高齢患者をドナーとする心筋幹細胞においても、移植治療効果が保たれているか否かを検討すること。

4. 方法

ヒト臨床検体採取および CDC の分離培養

2014年6月から2015年3月の間に山口大学医学部附属病院・第一外科および県内関連病院で心臓手術を施行された患者のうち、心臓組織の採取および使用について同意が得られた26名を対象とした。これらの臨床検体は山口大学のガイドライン、ヘルシンキ宣言に従って取り扱った。臨床検体は、心臓手術の際の人工心肺装着時に、右房組織を一部切除して得た。

CDC の分離・培養はこれまで報告された方法を一部改変して行った [3, 5]。図1に示すように、採取した心筋組織を細かく刻み、25 μ g/ml のフィブロネクチン (Corning 社) でコーティングしたディッシュ上に置き、10% FBS、1% penicillin-streptomycin を含む IMDM 培地で培養した。約20日後に explant-derived cells を回収して、30mg/ml の poly-2-hydroxyethyl methacrylate (Sigma-Aldrich 社) でコーティングしたフラスコに継代し、cardiosphere 用培地で浮遊培養を行った [3]。浮遊培養によって得られた cardiosphere を回収し、フィブロネクチンコーティングしたディッシュに再度播種して cardiosphere-derived cells (CDC) を得た。以下の実験のうち、特に記載の無いもの以外は全て P2 (2 継代目の細胞) で行った。

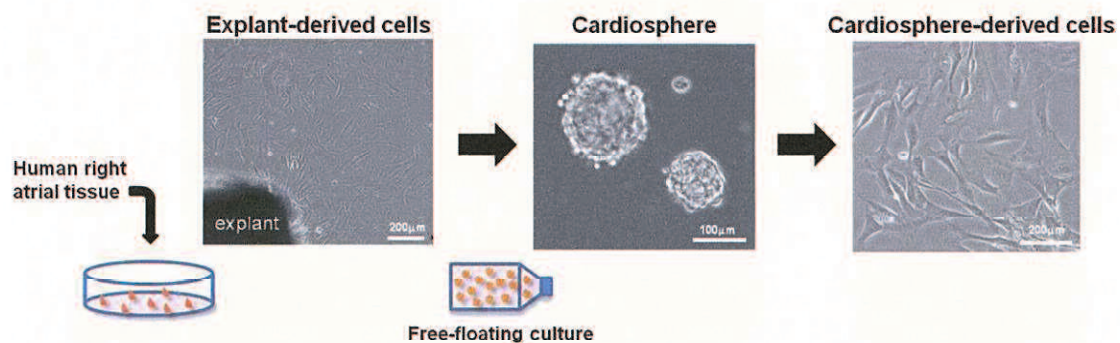


図1. CDC の分離・培養

細胞増殖能

細胞増殖の指標として、細胞倍加時間 (Population doubling time: PDT) を用いた。PDT は次の式で算出した [14]。

$$PDT = CT / \log(N/N_0) \times 3.31 \quad CT: \text{培養時間、} N: P1 \text{ の細胞数、} N_0: P0 \text{ の細胞数}$$

トリパンブルーで死細胞を染色した後、生細胞数について血球計測板を用いてカウントした。

Senescence-associated β -galactosidase 染色 (SA- β -gal 染色)

CDC をフィブロネクチンコーティングしたディッシュで培養し、Senescence Detection Kit (Bio Vision 社) を用いて SA- β -gal 染色を行った。アッセイは添付されているプロトコールに従って行った。SA- β -gal 染色陽性細胞は、光学顕微鏡下にカウントした。

フローサイトメトリー

CDC を TrypLE™ Express (Thermo Fisher Scientific 社) で処理して回収した後、PE 標識マウス抗ヒト CD105 抗体 (#12-1057-42、eBioscience 社) または FITC 標識マウス抗ヒト CD90 抗体 (#11-0909-42、eBioscience 社) を 30 分間反応させた。CD105 と CD90 発現率を Cytomic FC500 (Beckman Coulter 社) で測定した。

免疫細胞染色

CDC を 24 ウェルプレートで 3 日間培養した後、4% Paraformaldehyde で固定した。ブロッキングは Protein Block Serum-Free Ready-to-Use (DAKO 社) を用いて 1 時間行った。一次抗体としてラビットモノクローナル抗リン酸化ヒストン H2AX 抗体 (Ser 139, #9718, 1:400、Cell Signaling Technology 社) を 1 時間反応させた。二次抗体として Dylight550 標識ゴート抗ラビット IgG 抗体 (ab96884, 1:500、Abcam 社) を 1 時間反応させた。三次抗体として、Alexa Fluor 488 標識ラビットモノクローナル抗 Ki67 抗体 (ab197234, 1:100、Abcam 社) を 1 時間反応させた後、核を DAPI で染色した。観察はオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X710 (Keyence 社) を用いて行った。DNA 障害の検討は、CDC を核内の γ H2AX foci 数ごとに分類し (核内 γ H2AX foci 数=1 個、2 個、3 個または 4 個以上)、陽性細胞数をカウントした。また細胞老化の検討は、 γ H2AX 陽性 Ki67 陰性細胞をカウントした。実験は検体 #1 から #25 までを使用した (#26 は欠損値)。

酵素結合免疫吸着法 (ELISA)

CDC を 24 ウェルプレートで 3 日間培養して上清を回収し、VEGF、HGF、IGF-1、SDF-1、TGF- β 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 (R&D System 社)、insulin-like growth factor binding protein7 (IGFBP7、Abnova 社) の産生量を ELISA で測定した。アッセイは添付されているプロトコールに従って行った。

リアルタイム RT-PCR

CDC から RNeasy Mini Kit (Qiagen 社) を用いて、添付されているプロトコールに従って全 RNA を抽出し、PrimeScript® RT Master Mix (TaKaRa 社) を用いて逆転写反応を行った。逆転写反応により合成した cDNA を鋳型とし、QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen 社) を用い、Light Cycler (Roche Applied Science 社) でリアルタイム RT-PCR を行った。用いたプライマーの配列を表 1 に示す。

GAPDH の発現量に対する上記遺伝子の発現量比を $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法を用いて算出した。

遺伝子	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	文献
Ki-67	GAGGTGTGCAGAAAATCCAAA	CTGTCCCTATGACTTCTGGTTGT	(15)
p53	GCAGCGCCTCACAACCTCCG	TGATTCCACACCCCCGCCCCG	(16)
p16	AGCATGGAGCCTTCGGCTGA	CCATCATCATGACCTGGATCG	(16)
p21	CACCGAGACACCACTGGAGG	GAGAAGATCAGCCGGCGTTT	(17)
VEGF	AGCCTTGCCTTGCTGCTCTA	GTGCTGGCCTTGGTGAGG	(18)
HGF	CTGGTTCCCTTCAATAGCA	CTCCAGGGCTGACATTTGAT	(19)
IGF-1	TCTGCACGAGTTACCTGTTA	CAATCTACCAACTCCAGGAC	(20)
SDF-1	AGAGCCAACGTCAAGCATCT	CTTTAGCTTCGGGTCAATGC	(21)
TGF- β	CAACGAAATCTATGACAAGTTCAAGCAG	CTTCTCGGAGCTCTGATGTG	(22)
GAPDH	GTGGACCTGACCTGCCGTCT	GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT	(23)

表 1. リアルタイム RT-PCR に用いたプライマー配列

Tube formation assay

これまでに報告されているプロトコールに従って行った [24, 25]。マトリゲル (Corning 社) を入れた 96 ウェルプレートに CDC を 2×10^4 個/ウェル播種し、6 時間後に形成された管腔様構造の全長 (total tube length) を計測した。計測は ImageJ の Angiogenesis Analyzer (National Institutes of Health) を用いて行った。

Scratch assay

これまでに報告されているプロトコールに従って行った [26]。24 ウェルプレートで CDC を培養してコンフルエント状態にした後、1000 μ L のピペットチップ先端で細胞を直線状に剥離した。観察はオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X710 (Keyence 社) を用い

て行った。培養開始時と12時間後の直線の面積をBZ-X Analyzer software (Keyence 社) で計測し、細胞剥離部の面積減少率 (Wound closure rate) を求めた。実験は検体#3、#7、#9、#10、#16、#17、#18、#21 を用いた。

統計学的分析

2 群間の検定は、正規性および等分散性の検定を行った後、Student's t-test あるいは Man-Whitney test を行った。また、年齢と各パラメーターで相関分析を行った。 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。統計学的解析は全て、STATA version 12.0 software (StataCorp 社) を用いて行った。

5. 結果

CDC の増殖能と細胞表面マーカーの検討

26人の様々な背景因子を持つ心臓手術患者の右房組織を採取した。WHOの定義に則り、高齢群を65歳以上、非高齢群を65歳未満とした。表2に示すように、患者年齢は2歳から83歳（中央値72.5歳）で、高齢群は16人（61.5%）であった。CDCの増殖能を検討するため、Population doubling time (PDT)を各CDCで算出した。PDTは各CDCで様々であり、高齢群と非高齢群間で有意差はなかった（ $P=0.24$ 、図2）。また年齢に関わらず、いずれの検体からも実験に必要な十分量のCDCを培養可能であった。

次に、CDCの細胞表面マーカーを検討した。間葉系幹細胞の細胞表面マーカーであるCD90とCD105[27]をフローサイトメトリーで検討した。これまでの報告と同様[28]、CD105の発現は90.7%から99%と一様に高発現し（図3b）、CD90は14.4%から79%と発現率に幅がみられた（図3a）。CD90陽性率については2群間で有意差はなかった（ $P=0.65$ 、図3a）。CD105陽性率については非高齢群で有意に高かったものの、いずれも90%以上と高発現していた（ $P=0.0002$ 、図3b）。

Case	Age (yrs)	Sex	Diagnosis	NYHA	EF (%)	HT	DM	DL	coronary disease
#1	2	M	Atrial septal defect	—	76	No	No	No	No
#2	5	M	Atrial septal defect	I	82	No	No	No	No
#3	10	F	Atrial septal defect	I	80	No	No	No	No
#4	18	M	Atrial septal defect	I	84	No	No	No	No
#5	32	M	Aortic regurgitation	II	45	No	No	No	No
#6	38	M	Aortic regurgitation	I	61	Yes	Yes	Yes	No
#7	43	M	Lone atrial fibrillation, Left atrial thrombus	I	70	Yes	No	No	No
#8	53	M	Aortic stenosis	II	74	No	No	No	No
#9	58	M	Endocardial cushion defect	II	55	Yes	No	Yes	Yes
#10	64	F	Mitral regurgitation, Tricuspid regurgitation, Atrial fibrillation	III	74	Yes	No	No	No
#11	65	F	Aortic regurgitation	II	45	Yes	No	Yes	No
#12	72	M	Prosthetic aortic valve dysfunction	II	75	Yes	No	No	No
#13	72	M	Mitral regurgitation, Tricuspid regurgitation, Atrial fibrillation	II	80	Yes	No	No	No
#14	73	F	Chronic type A aortic dissection	I	83	Yes	Yes	Yes	Yes
#15	73	F	Mitral regurgitation, Tricuspid regurgitation, Aortic regurgitation	I	80	Yes	No	Yes	No
#16	75	M	Aortic stenosis	I	60	No	No	No	No
#17	76	F	Mitral regurgitation	I	75	Yes	No	No	No
#18	76	M	Thoracic aortic aneurysm	I	70	No	No	No	No
#19	77	M	Aortic stenosis	II	52	Yes	Yes	No	No
#20	78	F	Aortic stenosis	II	77	Yes	Yes	Yes	Yes
#21	79	M	Thoracic aortic aneurysm	I	70	Yes	No	Yes	Yes
#22	79	M	Thoracic aortic aneurysm	I	68	Yes	No	Yes	No
#23	81	F	Aortic stenosis	II	80	Yes	No	Yes	No
#24	83	M	Thoracic aortic aneurysm, Aortic regurgitation	I	75	No	No	No	No
#25	83	F	Aortic stenosis	II	70	Yes	No	Yes	No
#26	83	F	Aortic stenosis	II	40	Yes	No	Yes	No

NYHA: New York Heart Association functional class, EF: ejection fraction, HT: hypertension, DM: diabetes, DL: dyslipidemia

表2. 臨床検体を採取した心臓手術患者の背景因子

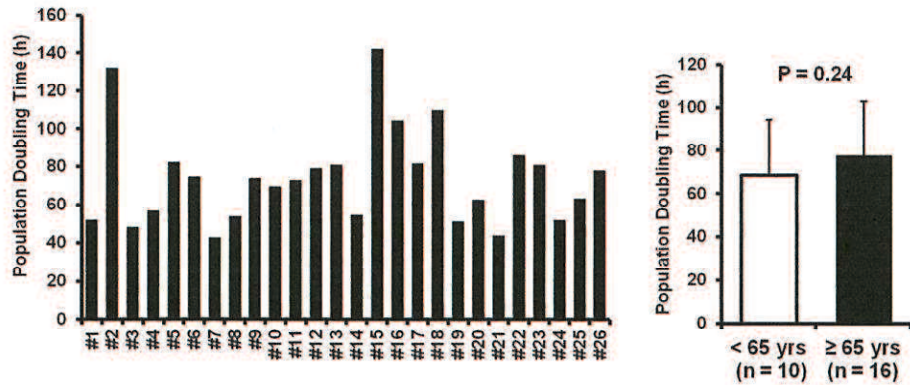


図 2. CDC の増殖能

各 CDC の増殖能を評価し、高齢群と非高齢群で比較した。増殖能は P0 と P1 の細胞数を用いて、Population doubling time で評価した。

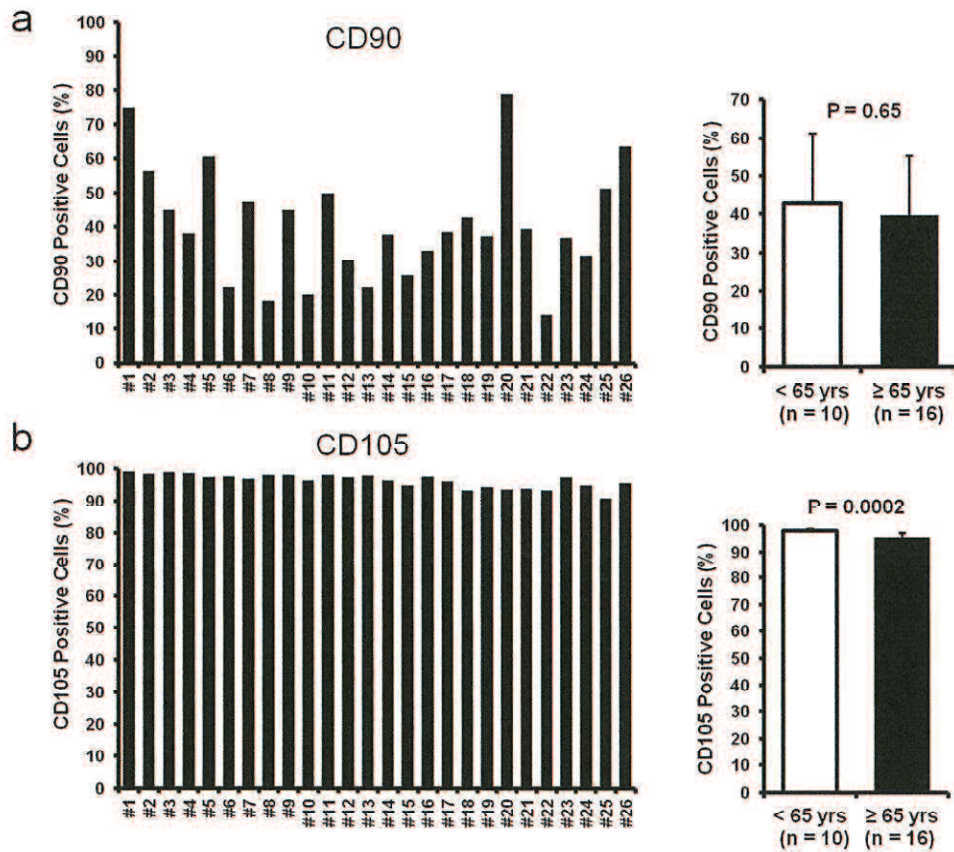


図 3. CDC における間葉系幹細胞マーカーの発現

各 CDC の CD90 発現率 (a) と CD105 発現率 (b) をフローサイトメトリーで解析した。それぞれ高齢群と非高齢群で発現率を比較した。

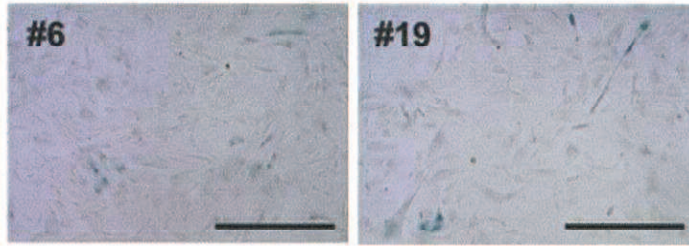
加齢により CDC 内における老化細胞はわずかに増加傾向となる

加齢により CDC 内に老化細胞が増加しているか否かを確認するため、細胞老化マーカーとして知られている [29]、senescence-associated β -gal (SA- β -gal) と細胞周期制御因子 (p53, p16, p21) の mRNA 発現量を検討した。SA- β -gal 染色陽性率は 2.9% から 17.9% (平均 9.6%) で、大部分の細胞は老化形質を示していなかった (図 4)。SA- β -gal 染色陽性率は 2 群間で有意差は無かったものの、高齢群でやや高い傾向であった (図 4b, c)。一方、細胞周期制御因子の発現については、高齢群での増加はみられなかった (図 4c-e)。

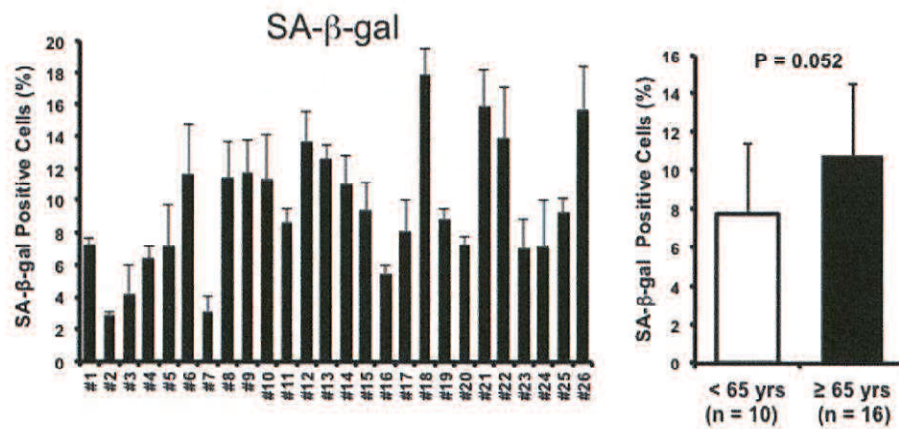
次に DNA 障害のマーカーである γ H2AX の発現率を検討した。 γ H2AX 発現率は高齢群でやや高い傾向であったが (図 5b, d)、核内 γ H2AX の foci 数 (DNA 損傷時に核内で形成される斑点) については年齢との関連はみられなかった (図 5b)。また老化細胞は γ H2AX 陽性かつ Ki67 陰性を示すことが報告されており [30]、各検体の γ H2AX 陽性 Ki67 陰性細胞を計測した。 γ H2AX 陽性 Ki67 陰性細胞数についても、高齢群で多い傾向となった (図 5c, d)。これらの結果から、加齢により CDC 内の老化細胞がわずかに増加傾向となることがわかった。

また、老化細胞は senescence-associated secretory phenotype (SASP) とよばれる形質を獲得し、様々な炎症性サイトカインや成長因子などの分泌性タンパク質 (SASP 因子) を高発現することが知られている [29]。各 CDC において SASP 因子である IL-1 β 、IL-6、IL-8、IGFBP7 の発現を検討した。それぞれの分泌量は高齢群と非高齢群の間でいずれも有意差は認められなかった (図 6a-d)。

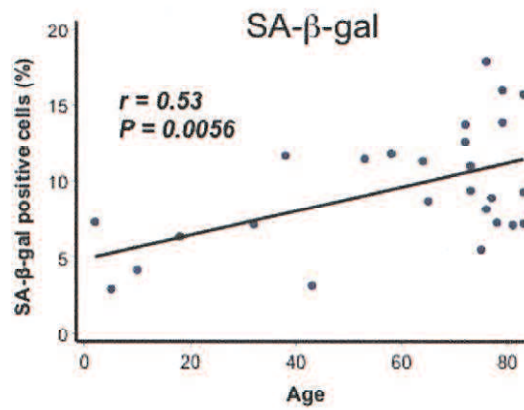
a



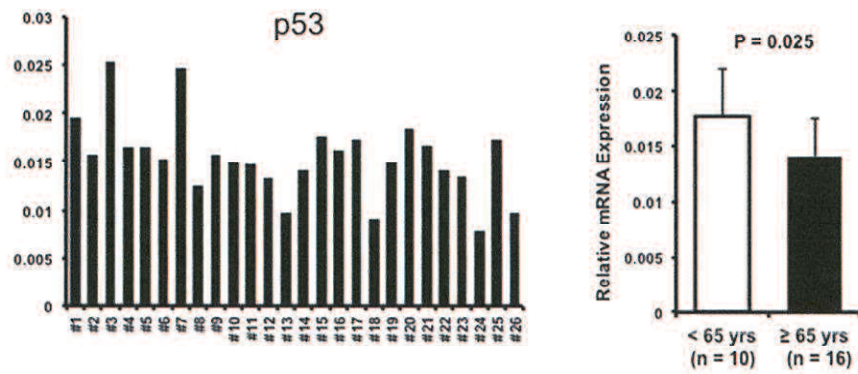
b



c



d



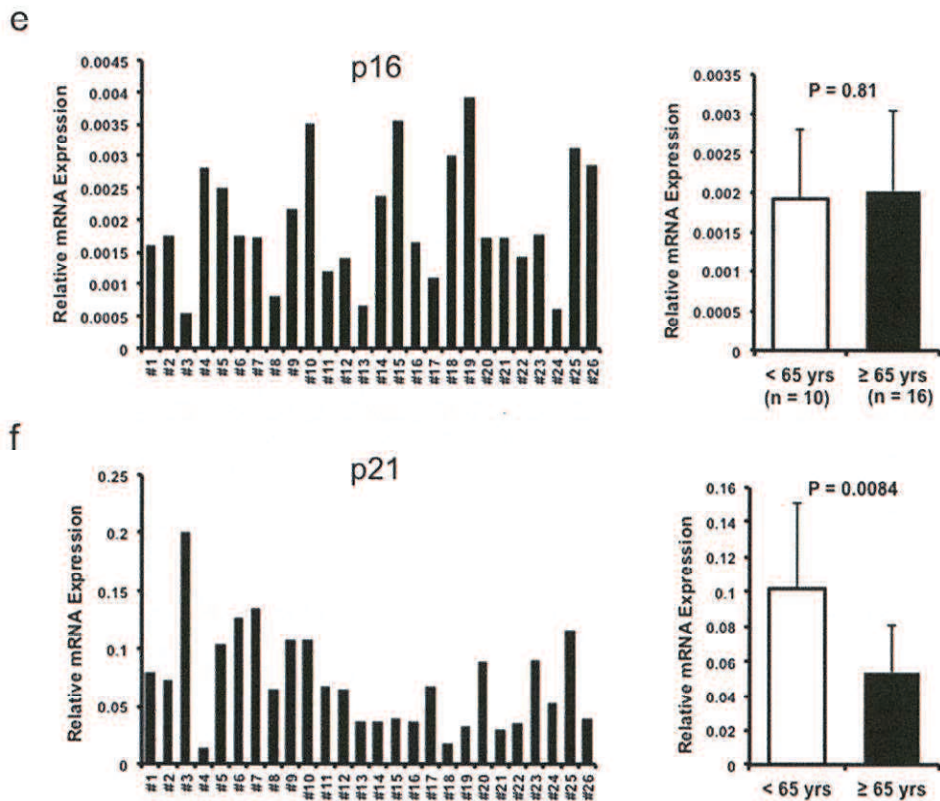
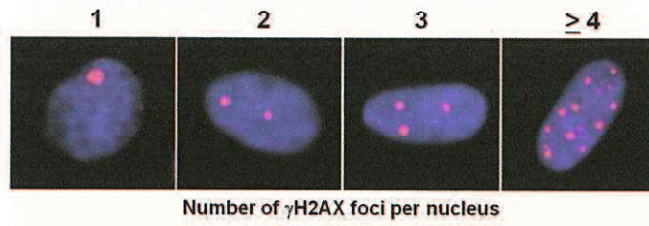


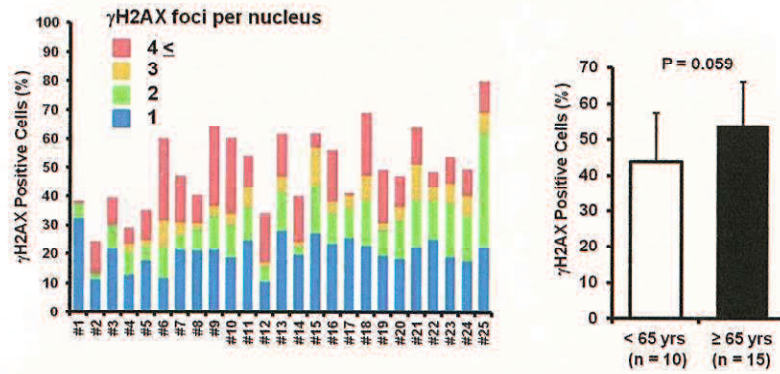
図4. 各 CDC における老化関連マーカーの発現

(a) CDC の非高齢群と高齢群における代表的な SA- β -gal 染色例を示した。SA- β -gal 染色で老化細胞は青く染色される。(b) 各 CDC および高齢群と非高齢群の SA- β -gal 染色陽性率を示した。(c) 年齢と SA- β -gal 染色陽性率について相関分析を行い、相関係数を求めた。(d-f) 各 CDC において高齢群と非高齢群の細胞周期制御因子 p53、p16、p21 の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR を示した。

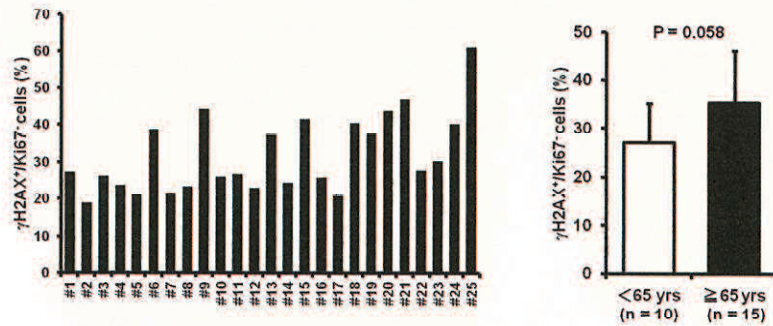
a



b



c



d

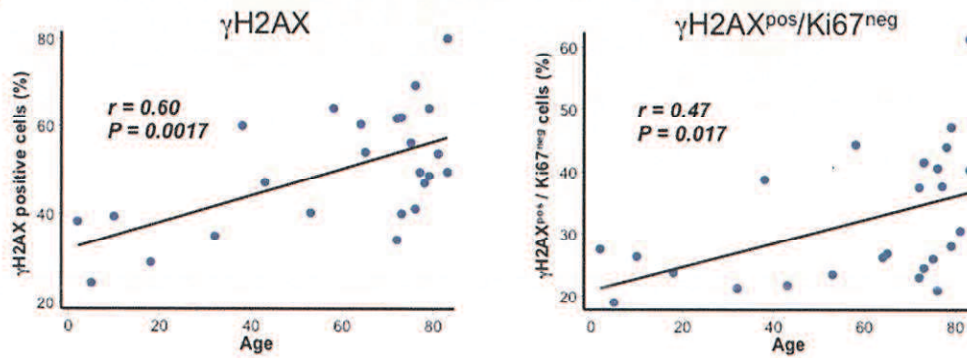


図 5. 各 CDC における DNA 障害マーカーの発現

(a) CDC を DNA 障害マーカーである核内 γ H2AX foci 数 (DNA 損傷時に核内で形成される斑点) で分類し、代表的な細胞を示した。(b) 各 foci 数の細胞数をカウントし、その比率をグラフに示した。また foci 数 1 個以上を γ H2AX 陽性細胞とし、 γ H2AX 陽性率を高年齢群と非高年齢群で比較した。(c) 細胞老化マーカーである γ H2AX⁺/Ki67 細胞をカウントし、高年齢群と非高年齢群で比較した。白矢頭は代表的な γ H2AX⁺/Ki67 細胞を示す。スケールバーは 20 μ m を表す。(d) 年齢と γ H2AX 陽性率および年齢と γ H2AX 陽性 Ki67 陰性率について相関分析を行い、相関係数を求めた。

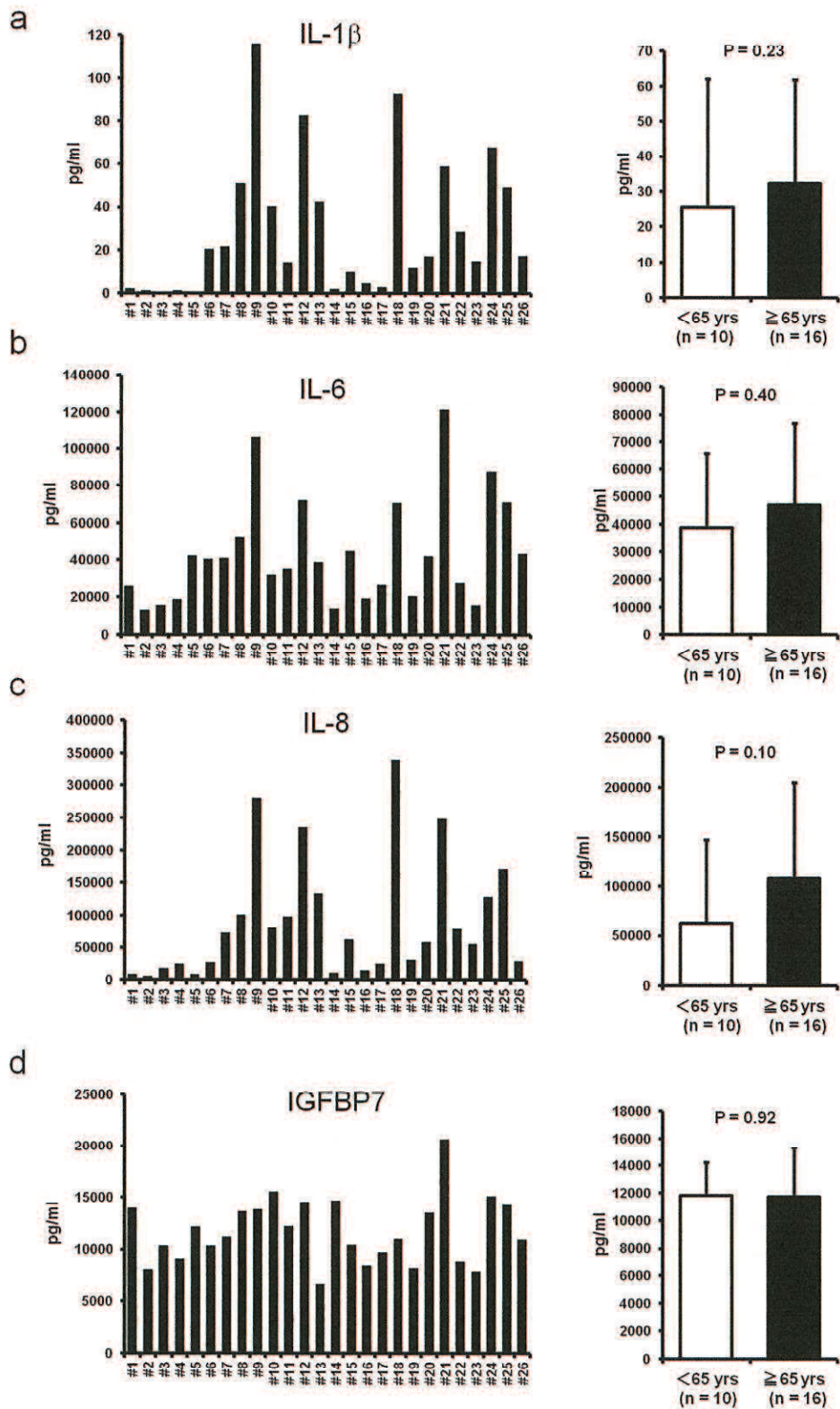


図 6. 各 CDC における細胞老化関連分泌因子の産生

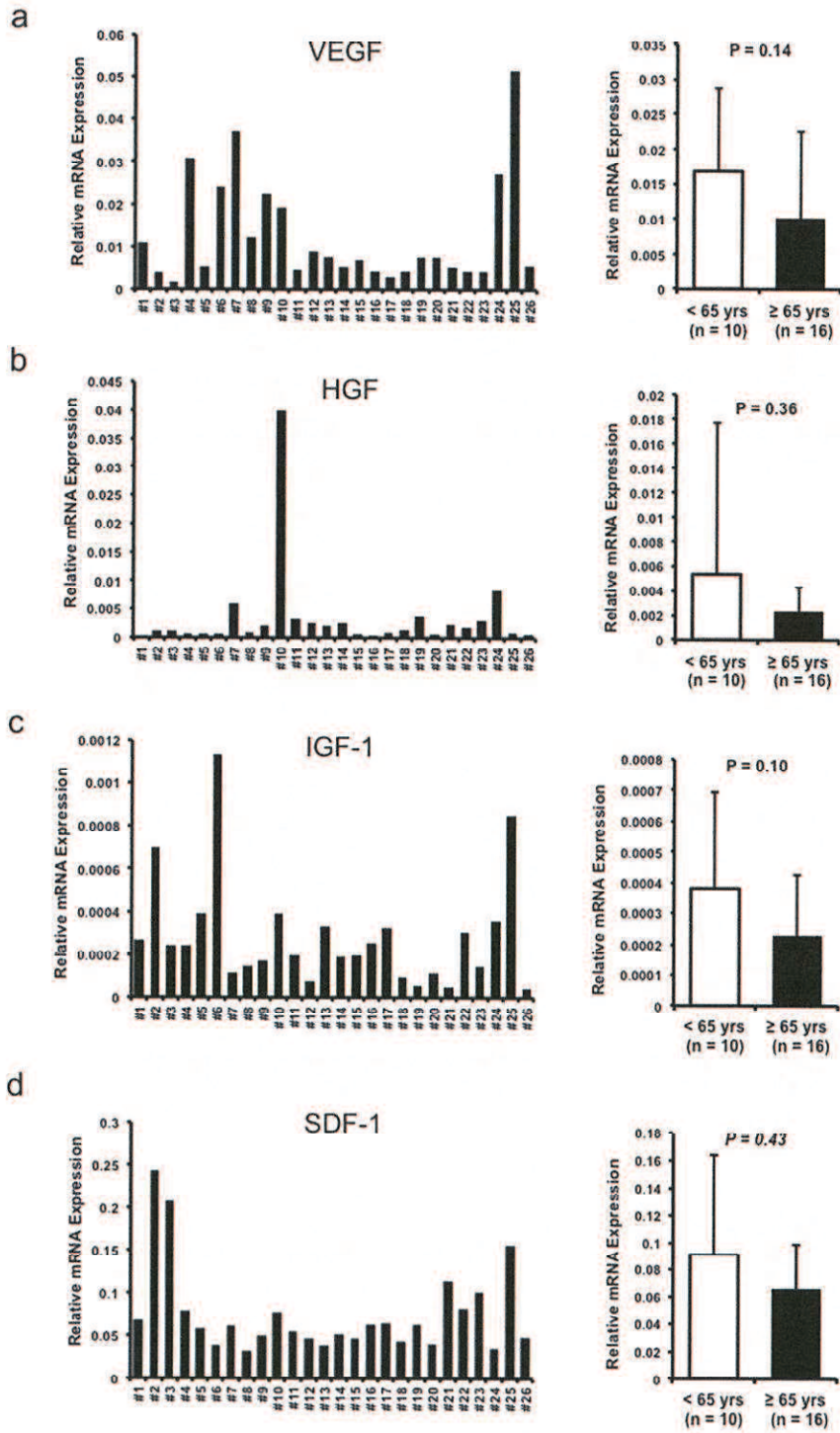
各 CDC において細胞老化関連分泌因子である IL-1 β (a)、IL-6 (b)、IL-8 (c)、IGFBP7 (d) の産生量を ELISA で測定し、高齢群と非高齢群で比較した。

In vitroにおけるパラクライン因子の産生量は各年齢由来の CDC で様々である

近年様々な研究から、細胞移植療法の効果は大部分がパラクライン効果によるものであることが明らかとなった[31, 32]。したがって、主要なパラクライン因子である VEGF、HGF、IGF-1、SDF-1、TGF- β の mRNA 発現量を各 CDC において検討した。図 7 に示すように、いずれの因子の mRNA 発現量も高齢群と非高齢群で有意差はなかった(図 7a-e)。またタンパク質レベルの比較においても、VEGF、HGF、IGF-1 分泌量に高齢群と非高齢群で有意差はなかった(図 8a-c)。このことは、これらの因子の産生量も加齢による大きな影響を受けないことを示唆している。

次に CDC の血管新生能を評価するため、tube formation assay を行った(図 9)。Tube formation assay はヒト臍帯静脈内皮細胞を用いる方法が一般的だが、CDC 自体が管腔様構造(tube)を形成することが知られており[24]、今回われわれは CDC を用いて本 assay を行った。少数の検体(#1、#8、#24)を除き、管腔様構造が形成された。管腔様構造の全長である total tube length は検体によって様々であり、その平均値の比較では高齢群と非高齢群で有意差はなかった($P=0.47$ 、図 9)。また CDC の遊走は VEGF、HGF、SDF-1 などによって起こるとされるが[33, 34]、遊走能についても 2 群間で有意差は無かった($P=0.47$ 、図 10)。

以上の結果から、CDC におけるパラクライン効果は検体によって様々であり、年齢とパラクライン効果の間に明らかな関連は認められなかった。



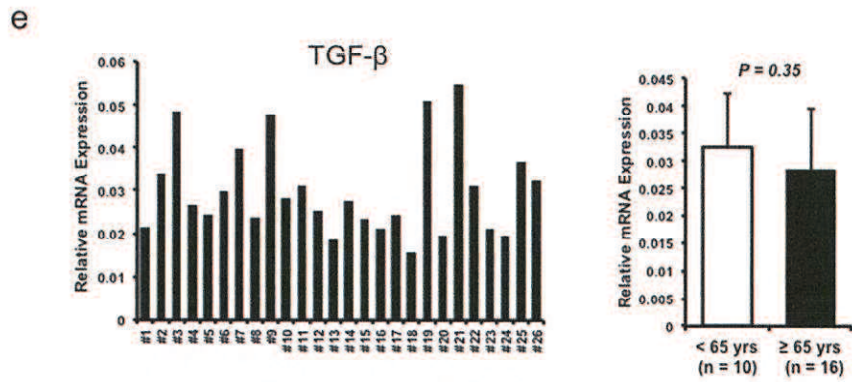


図7. 各 CDC における成長因子の発現量（遺伝子発現レベルでの比較）

各 CDC において成長因子である VEGF (a)、HGF (b)、IGF-1 (c)、SDF-1 (d)、炎症性サイトカインである TGF-β (e) の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で測定し、高齢群と非高齢群で比較した。

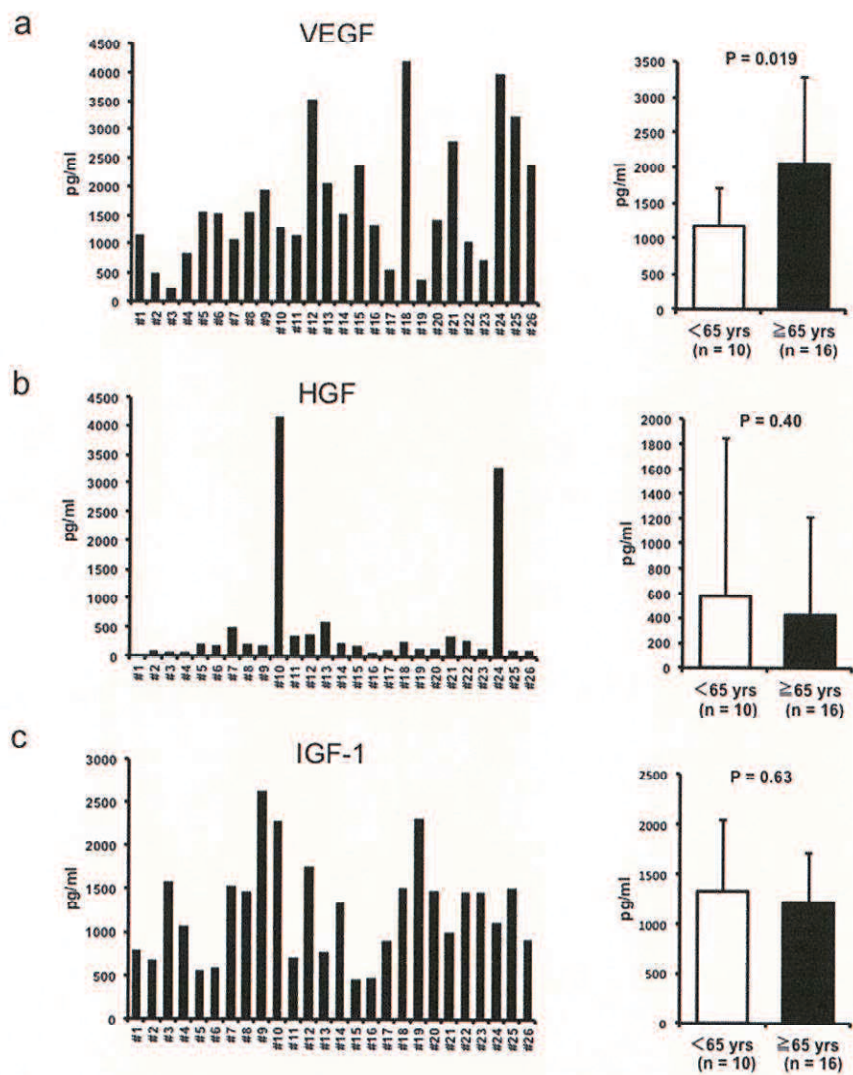


図 8. 各 CDC における成長因子の分泌量 (タンパク質レベルでの比較)
 各 CDC における VEGF (a)、HGF (b)、IGF-1 (c) のタンパク質分泌量を ELISA で測定し、高齢群と非高齢群で比較した。

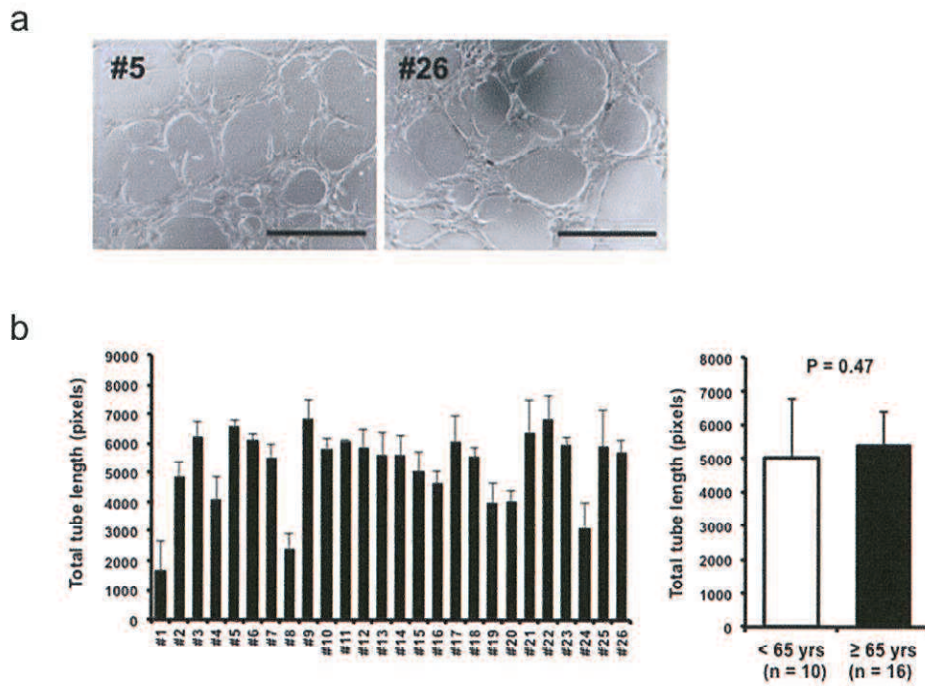


図9. 各 CDC における血管新生能

各 CDC における血管新生能を tube formation assay で評価した。(a) 実験開始 6 時間後の非高齢群と高齢群における代表的な結果を示した。(b) 各 CDC において実験開始 6 時間後の管腔様構造の全長 (total tube length) を計測し、高齢群と非高齢群で比較した。

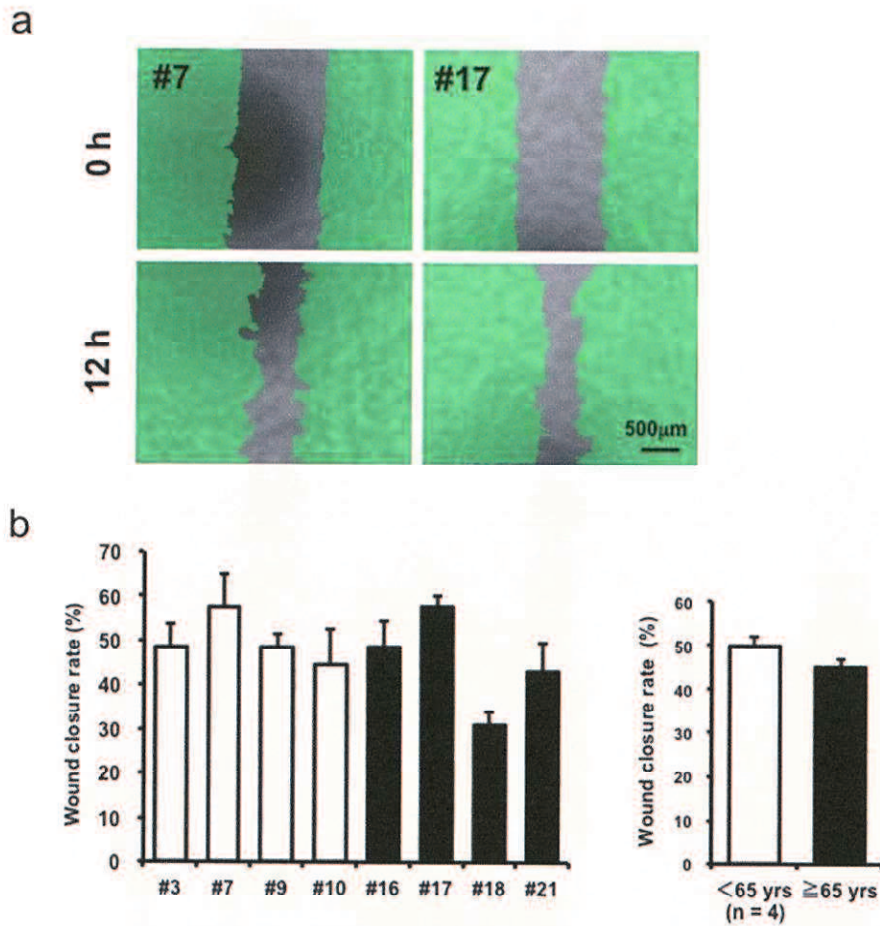


図 10. 各 CDC における遊走能

各 CDC の遊走能を評価するため、scratch assay を行った。(a) 非高齢群と高齢群における実験開始 12 時間後の代表的な結果を示した。(b) 各 CDC において実験開始時と開始 12 時間後の細胞剥離部の面積から創面積減少率 (Wound closure rate) を算出し、高齢群と非高齢群で比較した。

6. 考察

本研究では、加齢がヒト心筋幹細胞の一種である CDC の量と質に影響を及ぼすか否かを検討した。細胞老化マーカーである SA- β -gal 染色陽性率や γ H2AX の発現は高齢者由来 CDC でやや高い傾向であり、高齢者由来 CDC は若年者由来 CDC と比べ、わずかに老化していると考えられた。しかし CDC の増殖能、成長因子の発現、血管新生能などの機能については各検体由来 CDC で様々であり、患者年齢との明らかな関連は認められなかった。これらの結果から、様々な背景因子を持つ患者由来の CDC において、年齢は CDC の量と質の決定因子ではない可能性が示唆された。

加齢に伴い、組織には細胞老化をきたした細胞が増加することが知られている。組織幹細胞についても同様であり、造血幹細胞や骨格筋幹細胞の細胞老化とそれに伴う再生能低下がよく知られている [9, 35, 36]。しかし、これまでドナーの年齢が CDC に及ぼす影響についての報告は少ない。したがってわれわれは、様々な年齢の患者組織から CDC を分離培養し、その機能を比較検討することとした。

はじめに、CDC の「量」について検討した。自家心筋幹細胞移植において、わずかな心筋組織から十分量の移植細胞が培養できるか否かは非常に重要な問題である。本研究で CDC の増殖能は年齢と関連していなかった。これは以前のマウス CDC における報告と異なる結果であるが [12]、年齢以外の様々な患者背景因子が増殖能に関与しているためと考えられる。次に CDC の細胞表面マーカーについて検討した。CDC は間葉系細胞や心筋・血管平滑筋・血管内皮前駆細胞、幹細胞が混在した雑多な細胞集団であり、この特徴がパラクライン効果による再生能を高めているとされる [24]。したがって、これらの細胞集団の割合は再生効果に影響を与えている可能性がある。最近、CD90 の発現は再生効果に影響しており、CD90 陰性の CDC は治療効果が高いことが報告された [28]。したがって今回の結果は、CD90 発現率の面からも再生効果が年齢によらないことを示すと推測される。

次に CDC の「質」について、細胞老化と成長因子産生、血管新生能を評価した。現在のところ、細胞老化の評価として必要十分なマーカーは存在しないため、いくつかのマーカーを併用して評価する必要がある [29]。今回、SA- β -gal 染色陽性率や γ H2AX の発現は高齢群でわずかに増加傾向となった。しかし高齢者由来 CDC でも SA- β -gal 染色陽性率は低率であり、したがって少なくとも継代回数が P2 の時点では加齢の影響は少なく、大部分は老化細胞ではないと考えられた。

近年、細胞移植療法における心機能改善効果の大部分はパラクライン効果によると考

えられている [31, 37]。VEGF、HGF、IGF-1、SDF-1 は血管新生や抗アポトーシス、幹細胞の遊走などのパラクライン効果で主要な役割を果たしている成長因子である [37]。TGF- β は抗炎症性サイトカインだが、血管新生を促進すると同時に線維芽細胞による線維化を促進する [37, 38]。本研究において、これらのパラクライン因子の発現は年齢とともに低下しなかった。また tube formation assay で評価した血管新生能についても同様であった。これらの結果から、細胞移植におけるドナーの年齢は、パラクライン効果による再生能の決定因子ではないことが示唆された。

これまでの報告から CDC の機能は加齢により低下することが予想されたが、実際には加齢が CDC に与える影響は限定的であった。この原因の一つとしては、心機能や糖尿病などの患者背景因子が CDC の機能に影響を与えている可能性が挙げられる。実際に本研究で用いた CDC のドナーである心臓手術患者の背景因子は、表 2 に示すように様々であった。われわれは以前の研究で、高齢に加え、腎不全や貧血が骨髄幹細胞の血管新生能を低下させることを明らかにした [9]。ヒト心筋幹細胞においても慢性心不全は心筋幹細胞の機能を低下させることが示されている [10, 39]。しかし逆に心不全患者由来の心筋幹細胞は、SDF-1 産生増加を介して再生能が増強されるという報告もあり [40]、患者背景因子が心筋幹細胞にどのような影響を与えるかについては明らかではない。加えて、これらの因子は必ずしも同程度に心筋幹細胞の量と質に影響を与えるわけではないことも知られている。例えば老齢マウス由来の造血幹細胞は、増殖能は保たれるが再生能が低下するとの報告がある [41]。本研究の結果からは、年齢以外の因子が CDC の機能に大きく影響していると考えられた。したがって患者由来 CDC の再生能に影響するクリティカルな因子を明らかにするため、今後更なる研究が必要である。このような因子が明らかになれば、CDC 自家移植を臨床応用する際に極めて有益な情報になると考えられる。

今回の実験結果で加齢が CDC に与える影響が少なかったもう一つの理由として、CDC の培養方法が関係している可能性がある。つまり継代回数 P2 の CDC を得るのに約 1.5 カ月間培養が必要であり、その間に老化細胞が淘汰されていると考えられる。また CDC の培養過程でなんらかの若返りのメカニズムが働いている可能性もある。CDC は、途中で浮遊培養を行って cardiosphere を形成させ、それを播種することで得られる細胞である。Cardiosphere はニッチ様の環境であり、成長因子、接着因子、細胞外マトリックスの発現を介して stemness を増強しているとされる [2, 42]。このように cardiosphere の過程が再生能を高め、CDC の若返りに関与している可能性があるが、そ

れを実証するためには更なる研究が必要である。

われわれは、小児から高齢までの患者由来 CDC について、その量と質はドナーである患者によって様々であり、年齢が与える影響は限定的であることを見出した。本研究では CDC の量と質に影響を与える主要な因子について明らかにすることはできなかったが、年齢以外の多くの患者因子が関与していると推測された。将来的に CDC 自家移植を臨床応用する際には、年齢以外の背景因子を加味して適応基準を考慮する必要があるが、特に心臓移植適応外となる 65 歳以上の高齢患者も、CDC 自家移植治療の恩恵を十分に得られる可能性があることが本研究から示された。

7. 結語

本研究では、加齢がヒト心筋幹細胞の老化状態や細胞機能に与える影響は非常に限定的であった。この結果から、高齢心不全患者由来の心筋幹細胞でも、移植治療効果が保たれている可能性が示唆された。

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）、患者組織採取に際してご協力下さった美甘章仁先生をはじめとする山口大学医学部附属病院心臓外科の先生方、済生会下関総合病院心臓血管外科の阪田健介先生、伊東博史先生にこの場を借りて感謝申し上げます。

9. 参考文献

- [1] Leri, A., Rota, M., Pasqualini, F. S., Goichberg, P. & Anversa, P. Origin of cardiomyocytes in the adult heart. *Circ Res.* 2015;116: 150-66.
- [2] Messina, E. et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res.* 2004; 95: 911-21.
- [3] Smith, R. R. et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation.* 2007; 115: 896-908.
- [4] Davis, D. R. et al. Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue. *PLoS One.* 2009; 4: e7195.
- [5] Tateishi, K. et al. Human cardiac stem cells exhibit mesenchymal features and are maintained through Akt/GSK-3beta signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 352: 635-41.
- [6] Makkar, R. R. et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet.* 2012; 379: 895-904.
- [7] Malliaras, K. et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (Cardiosphere-Derived autologous stem Cells to reverse ventricular dysfunction). *J Am Coll Cardiol.* 2014; 63: 110-22.
- [8] Oh, J., Lee, Y. D. & Wagers, A. J. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat Med.* 2014; 20: 870-80.
- [9] Li, T. S. et al. Impaired angiogenic potency of bone marrow cells from patients with advanced age, anemia, and renal failure. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010; 139: 459-65.
- [10] Cesselli, D. et al. Effects of age and heart failure on human cardiac stem cell function. *Am J Pathol.* 2011; 179: 349-66.
- [11] Hariharan, N. et al. Nucleostemin rejuvenates cardiac progenitor cells and antagonizes myocardial aging. *J Am Coll Cardiol.* 2015; 65: 133-47.
- [12] Hsiao, L. C. et al. Murine cardiosphere-derived cells are impaired by age but not by cardiac dystrophic dysfunction. *Stem Cells Dev.* 2014; 23: 1027-36.
- [13] Vigen, R., Maddox, T. M. & Allen, L. A. Aging of the United States population: impact on heart failure. *Curr Heart Fail Rep.* 2012; 9: 369-74.
- [14] Choudhery, M. S., Badowski, M., Muise, A., Pierce, J. & Harris, D. T. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med.* 2014; 12: 8.
- [15] Brizova, H., Kalinova, M., Krskova, L., Mrhalova, M. & Kodet, R. A novel quantitative

- PCR of proliferation markers (Ki-67, topoisomerase IIalpha, and TPX2): an immunohistochemical correlation, testing, and optimizing for mantle cell lymphoma. *Virchows Arch.* 2010; 456: 671-9.
- [16] Mohsin, S. et al. Rejuvenation of human cardiac progenitor cells with Pim-1 kinase. *Circ Res.* 2013; 113: 1169-79.
- [17] Chuikov, S. et al. Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature.* 2004; 432: 353-60.
- [18] Meaburn, K. J. & Misteli, T. Locus-specific and activity-independent gene repositioning during early tumorigenesis. *J Cell Biol.* 2008; 180: 39-50.
- [19] Hummel, T. R. et al. Gene expression analysis identifies potential biomarkers of neurofibromatosis type 1 including adrenomedullin. *Clin Cancer Res.* 2010; 16: 5048-57.
- [20] Zeng, F. et al. Multiorgan engraftment and differentiation of human cord blood CD34+ Lin- cells in goats assessed by gene expression profiling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 7801-6.
- [21] Lo, B. K. et al. CXCR3/ligands are significantly involved in the tumorigenesis of basal cell carcinomas. *Am J Pathol.* 2010; 176: 2435-46.
- [22] Hagler, M. A. et al. TGF-beta signalling and reactive oxygen species drive fibrosis and matrix remodelling in myxomatous mitral valves. *Cardiovasc Res.* 2013; 99: 175-84.
- [23] Seki, T., Yuasa, S. & Fukuda, K. Generation of induced pluripotent stem cells from a small amount of human peripheral blood using a combination of activated T cells and Sendai virus. *Nat Protoc.* 2012; 7: 718-28.
- [24] Li, T. S. et al. Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 59: 942-53.
- [25] Arnaoutova, I., George, J., Kleinman, H. K. & Benton, G. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis.* 2009; 12: 267-74.
- [26] Liang, C. C., Park, A. Y. & Guan, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007; 2: 329-33.
- [27] Dominici, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8: 315-7.
- [28] Cheng, K. et al. Relative roles of CD90 and c-kit to the regenerative efficacy of cardiosphere-derived cells in humans and in a mouse model of myocardial infarction. *J Am Heart Assoc.* 2014; 3: e001260.

- [29] Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J. & Peeper, D. S. The essence of senescence. *Genes Dev.* 2010; 24: 2463-79.
- [30] Lawless, C. et al. Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Exp Gerontol.* 2010; 45: 772-8.
- [31] Chimenti, I. et al. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res.* 2010; 106: 971-80.
- [32] Tang, X. L. et al. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation.* 2010; 121: 293-305.
- [33] Nagai, T., Shiojima, I., Matsuura, K. & Komuro, I. Promotion of cardiac regeneration by cardiac stem cells. *Circ Res.* 2005; 97: 615-7.
- [34] Tang, J. et al. Vascular endothelial growth factor promotes cardiac stem cell migration via the PI3K/Akt pathway. *Exp Cell Res.* 2009; 315: 3521-31.
- [35] Jung, Y. & Brack, A. S. Cellular mechanisms of somatic stem cell aging. *Curr Top Dev Biol.* 2014; 107: 405-38.
- [36] Zhuo, Y. et al. Aging impairs the angiogenic response to ischemic injury and the activity of implanted cells: combined consequences for cell therapy in older recipients. *The J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010; 139: 1286-94, 1294 e1281-82.
- [37] Gnecci, M., Zhang, Z., Ni, A. & Dzau, V. J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res.* 2008; 103: 1204-19.
- [38] Shinde, A. V. & Frangogiannis, N. G. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol.* 2014; 70: 74-82.
- [39] Avolio, E. et al. Ex vivo molecular rejuvenation improves the therapeutic activity of senescent human cardiac stem cells in a mouse model of myocardial infarction. *Stem cells.* 2014; 32: 2373-85.
- [40] Cheng, K. et al. Human Cardiosphere-Derived Cells From Advanced Heart Failure Patients Exhibit Augmented Functional Potency in Myocardial Repair. *JACC Heart Fail.* 2014; 2: 49-61.
- [41] Rossi, DJ. et al. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell.* 2008; 132: 681-96.
- [42] Li, T. S. et al. Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair. *Stem cells.* 2010; 28: 2088-98.