

ミニ・レビュー —中村賞受賞者—

加齢がヒト心筋幹細胞の量と質に与える影響

中村玉美

山口大学大学院医学系研究科器官病態外科学（外科学第一） 宇部市南小串1丁目1-1（〒755-8505）

Key words : 心筋再生, 心筋幹細胞, 幹細胞移植, 細胞老化, 加齢

和文抄録

はじめに

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。しかし、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。

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、細胞移植治療に期待が寄せられている。近年、成人の心臓にも心筋幹細胞が存在し、心筋再生と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、心筋幹細胞はきわめて有望な移植細胞ソースとして注目されており、特に心筋幹細胞の一種であるCDC (Cardiosphere-derived cell) は、再生能が高く、少量の心筋組織から大量培養する方法が確立されている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、その結果として組織再生能が低下することが知られている⁸⁾。われわれは、骨髄幹細胞の血管新生能が加齢により低下することを明らかにした⁹⁾。心筋幹細胞については、加齢マウスや高齢ヒト由来c-kit陽性心筋幹細胞^{10, 11)} および加齢マウス由来CDC¹²⁾ で細胞老化がみられ、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。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て、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。そこでわれわれは、様々な年齢の患者心筋からCDCを分離培養し、その細胞老化と細胞機能を比較検討することとした。

CDCの増殖能および細胞表面マーカーの検討

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ことから、まずCDCの「量」について検討した。様々な背景因子を持つ心疾患患者26例の右房組織を心臓手術時に採取し、CDCを分離・培養した(図1A)。以降の検討は、WHOの定義に則って高齢群を65歳以上、非高齢群を65歳未満として行った。表1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例(61.5%)であった。CDCの増殖能の指標として、各CDCの継代回数P0およびP1の細胞数から、Population doubling time (PDT)を算出した。その結果、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1B)。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。

一方、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¹⁴⁾。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り、CD90陰性のCDCは治療効果が高いと報告されている¹⁵⁾。そこで、間葉系幹細胞の細胞表面マーカーであるCD90とCD105¹⁶⁾をフローサイトメトリーで検討した。結果はこれまでの報告と同様に¹⁵⁾、CD105の発現は91%から99%と一様に高発現し(図2B)、CD90は14%から79%と発現率に幅がみられた(図2A)。CD90陽性率は2群間で有意差はなく($P = 0.65$, 図2A)、CD105陽性率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2B)。このように細胞表面マーカー発現率からは、加齢がCDCを構成する細胞集団の割合に大きな影響を与えていないことが示唆された。

加齢によりCDC内の老化細胞は増加するか

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senescence-associated β -gal (SA- β -gal)と細胞周期制御因子(p53, p16, p21)¹⁷⁾のmRNA発現量を検討した。継代回数P2での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3A, B)。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3B)。一方、細胞周期制御因子のmRNA発現量については、高齢群での増加はみられなかった(図3C)。

次にDNA障害のマーカーである γ H2AXの発現率を検討した。核内 γ H2AXのfoci数(DNA損傷時に核内で形成される斑点)が1個以上認められるものを γ H2AX陽性細胞とすると、 γ H2AX陽性率は高齢群でやや高い傾向であった(図4A, B)。しかし、foci数自体に年齢との関連はなかった(図4B)。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¹⁸⁾、各検体の γ H2AX陽性Ki67陰性細胞数を検討したところ、高齢群で多い傾向であった(図4C, 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することがわかった。

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¹⁷⁾。SASP因子であるIL-1 β 、IL-6、IL-8、IGFBP7の分泌量をELISAで検討したところ、高齢群と非高齢群間でいずれも有意差は認められなかった(図5)。

加齢がCDCの心筋再生能に与える影響

近年、細胞移植療法的心筋再生効果の大部分は、移植細胞の直接分化ではなくパラクライン効果によることが明らかとなった¹⁹⁻²¹⁾。成長因子である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心筋再生に主要な役割を果たしている²¹⁾。またTGF- β は抗炎症性サイトカインとして知られるが、血管新生および線維芽細胞による線維化を促進する^{21, 22)}。

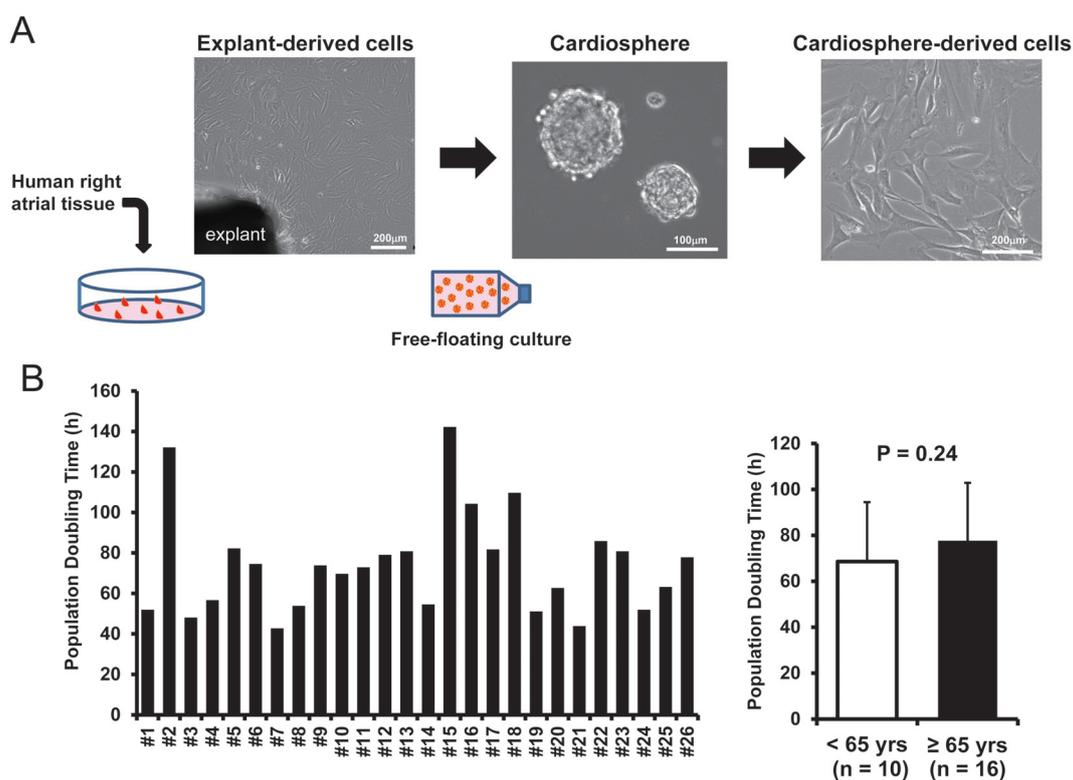


図1 CDCの分離・培養および増殖能

(A) 心臓手術患者から採取した右房組織を用いて初代培養を行い、途中浮遊培養を行って得られたcardiosphereを再度播種・培養してCDCを得た。(B) 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。

表1 臨床検体を採取した心臓手術患者の背景因子

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

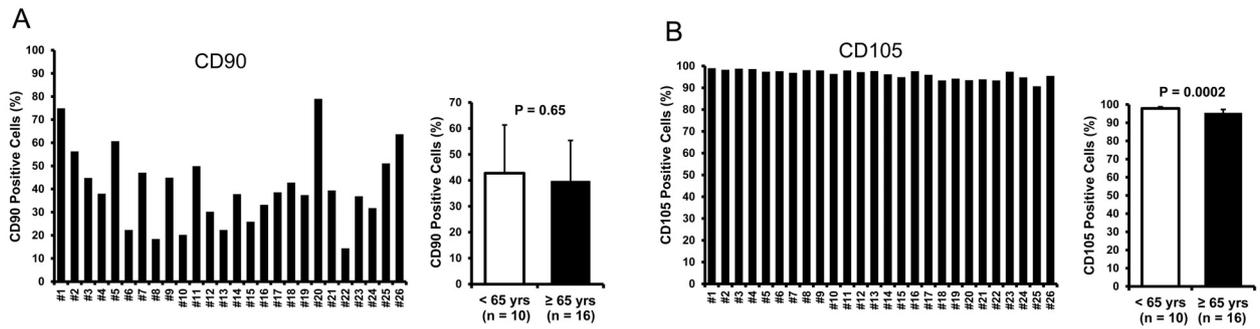


図2 各CDCにおける間葉系幹細胞マーカーの発現
各CDCのCD90発現率 (A) とCD105発現率 (B) をフローサイトメトリーで解析した. それぞれ高齢群と非高齢群で発現率を比較した.

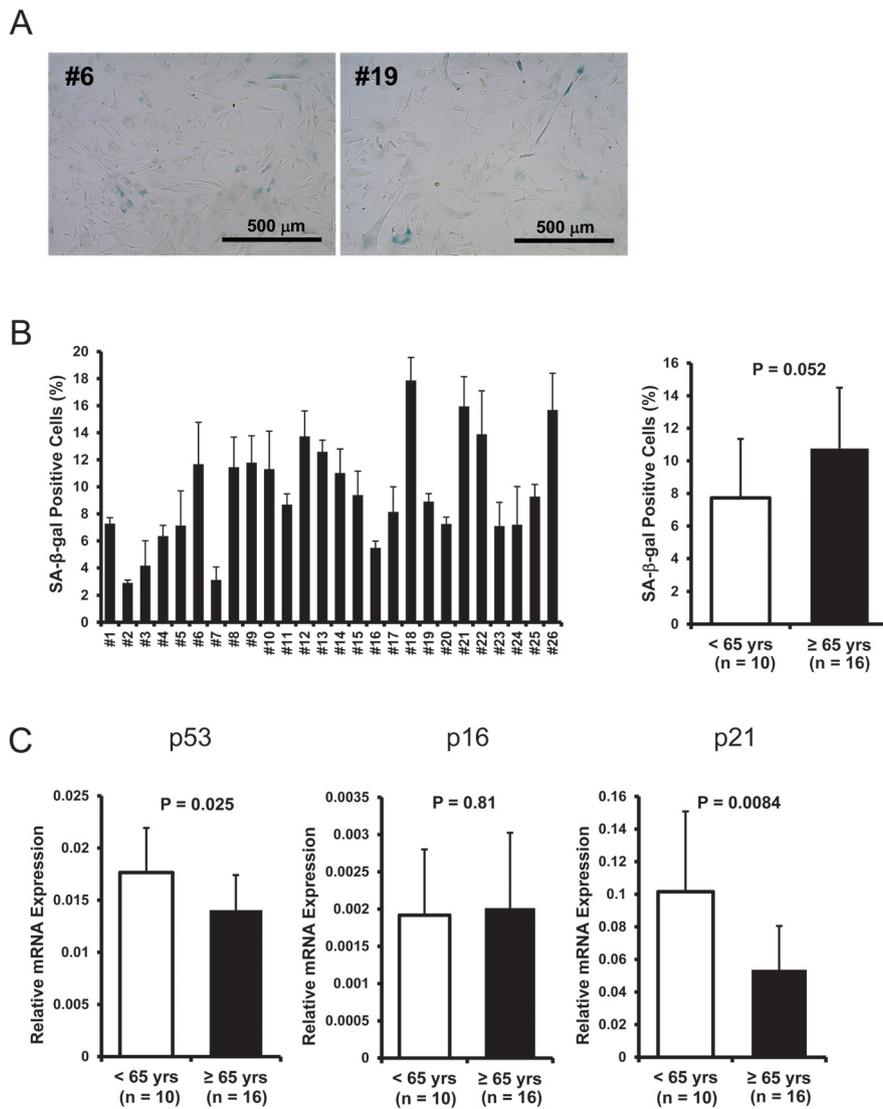


図3 各CDCにおける老化関連マーカーの発現
(A) CDCの非高齢群と高齢群における代表的なSA-β-gal染色例を示した. SA-β-gal染色で老化細胞は青く染色される. (B) 各CDCおよび高齢群と非高齢群のSA-β-gal染色陽性率を示した. (C) リアルタイムRT-PCRを行い, CDCの高齢群と非高齢群における細胞周期制御因子p53, p16, p21のmRNA発現量を検討した.

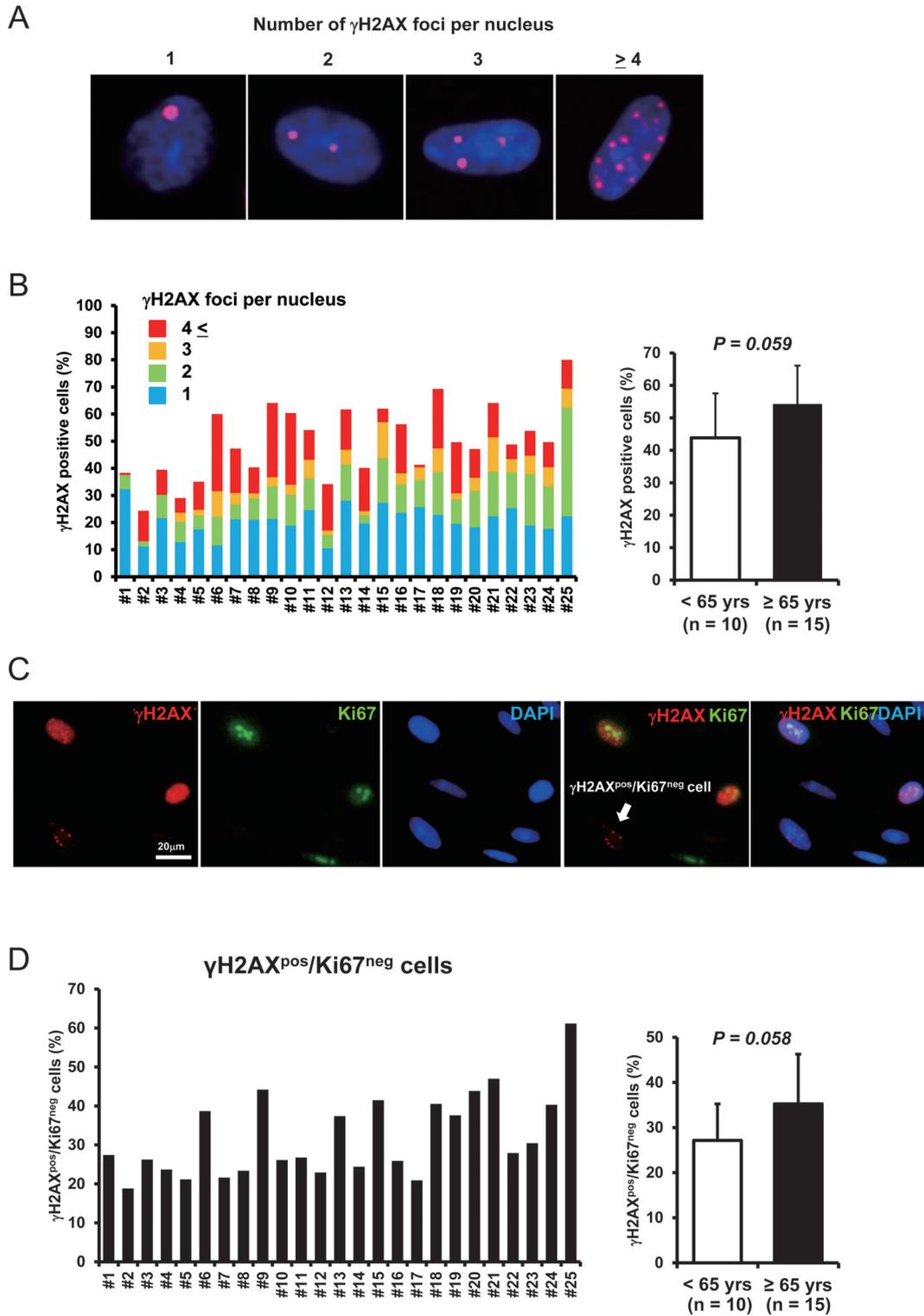


図4 各CDCにおけるDNA障害マーカーの発現

(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、D) 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。

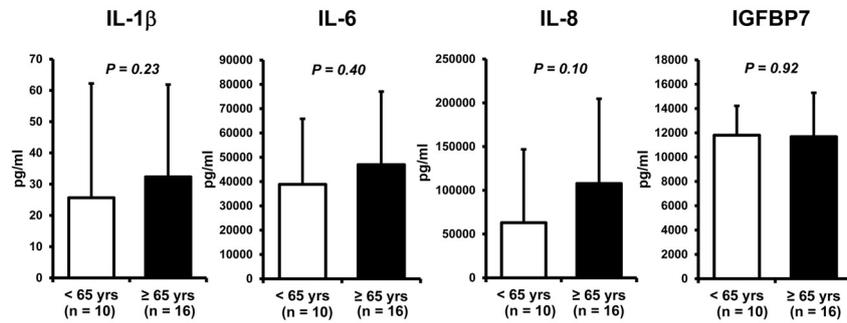


図5 CDCの高齢群と非高齢群における細胞老化関連分泌因子の産生
各CDCにおいて細胞老化関連分泌因子であるIL-1 β , IL-6, IL-8, IGFBP7の産生量をELISAで測定し, 高齢群と非高齢群で比較した。

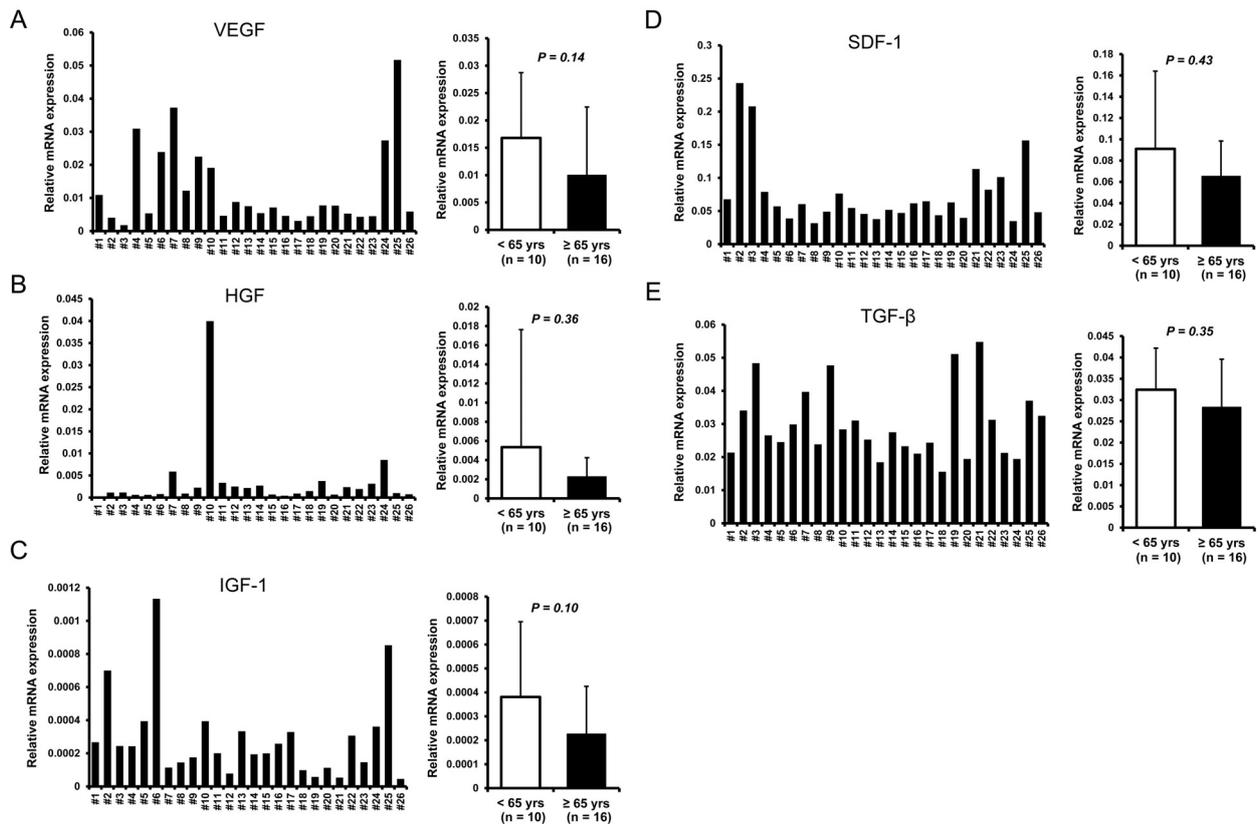


図6 各CDCにおける成長因子の発現量
各CDCにおいて成長因子であるVEGF (A), HGF (B), IGF-1 (C), SDF-1 (D), 抗炎症性サイトカインであるTGF- β (E)のmRNA発現量をリアルタイムPCRで測定し, 高齢群と非高齢群で比較した。

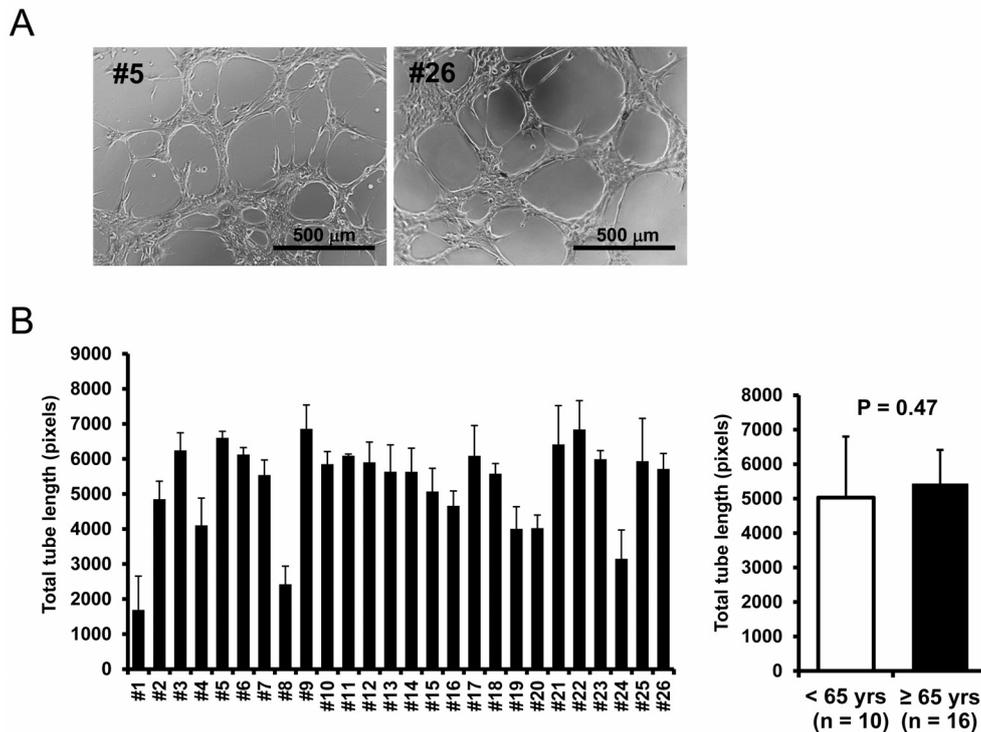


図7 各CDCにおける血管新生能

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。

そこで各CDCについて、これらのパラクリン因子 (VEGF, HGF, IGF-1, SDF-1, TGF- β) のmRNA発現量を検討した。図6に示すように、いずれの因子のmRNA発現量も各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 (図6 A-E)。

次にCDCの血管新生能を評価するため、tube formation assayを行った (図7)。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¹⁰、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、その平均値は高齢群と非高齢群間で有意差はなかった ($P = 0.47$, 図7)。

以上から、年齢とパラクリン因子の発現およびパラクリン効果の間に明らかな関連は認められなかった。したがって細胞移植におけるドナーの年齢は、パラクリン効果による心筋再生能の決定因子ではないことが示唆された。

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。これまでの報告からは、加齢に伴うCDCの細胞老化により、心筋再生能が低下することが予想された。しかし実際には、加齢に伴いCDC内の老化細胞はわずかに増加するものの、増殖能、成長因子の発現、血管新生能などの細胞機能は加齢により低下しなかった。

今回の結果を説明する理由の一つとして、心機能や糖尿病など、年齢以外の様々な患者背景因子がCDCの機能に影響を与えている可能性が挙げられる。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1に示すように様々であった。骨髓幹細胞では、高齢のみでなく腎不全や貧血が血管新生能を低下させる⁹⁾。ヒト心筋幹細胞においては慢性心不全が心筋幹細胞の機能を低下させる^{10, 23)}が、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するという報告もあり

24), 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が予想される。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²⁵⁾。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。

今回、加齢の影響が限定的であ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もある。つまり継代回数P2のCDCを得るのに約1.5ヵ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・培養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, 26)}。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。

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非常に限定的であることを見出した。本研究結果から、心臓移植適応外となる65歳以上の高齢患者でもCDC自家移植治療の恩恵を十分に得られる可能性が示唆された。今後はCDC自家移植治療の臨床応用に向けて、CDCの心筋再生能に影響を与えるクリティカルな因子を明らかにすることが課題である。

稿を終えるにあたり、ご指導・ご鞭撻をいただいた濱野公一先生（山口大学大学院医学系研究科器官病態外科学教授）に深謝いたします。また李桃生先生（長崎大学原爆後障害医療研究所幹細胞生物学研究分野教授）、当教室の先生方から数多くのご助言をいただきましたことに、心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Lori A, Rota M, Pasqualini FS, et al. Origin of cardiomyocytes in the adult heart. *Circ Res* 2015 ; 116 : 150-166.
- 2) Messina E, De Angelis L, Frati G, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 2004 ; 95 : 911-921.
- 3) Smith RR, Barile L, Cho HC, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* 2007 ; 115 : 896-908.
- 4) Davis DR, Zhang Y, Smith RR, et al. Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue. *PLoS One* 2009 ; 4 : e7195.
- 5) Tateishi K, Ashihara E, Honsho S, et al. Human cardiac stem cells exhibit mesenchymal features and are maintained through Akt/GSK-3beta signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 ; 352 : 635-641.
- 6) Makkar RR, Smith RR, Cheng K, 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, Makkar RR, Smith RR, 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 : 110-122.
- 8) Oh J, Lee YD, Wagers AJ. Stem cell aging : mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat Med* 2014 ; 20 : 870-880.
- 9) Li TS, Kubo M, Ueda K, et al. Impaired angiogenic potency of bone marrow cells from patients with advanced age, anemia and renal failure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010 ; 139 : 459-465.
- 10) Cesselli D, Beltrami AP, D' Aurizio F, et al. Effects of age and heart failure on human cardiac stem cell function. *Am J Pathol*

- 2011 ; 179 : 349-366.
- 11) Hariharan N, Quijada P, Mohsin S, et al. Nucleostemin rejuvenates cardiac progenitor cells and antagonizes myocardial aging. *J Am Coll Cardiol* 2015 ; 65 : 133-147.
 - 12) Hsiao LC, Perbellini F, Gomes RS, et al. Murine cardiosphere-derived cells are impaired by age but not by cardiac dystrophic dysfunction. *Stem Cells Dev* 2014 ; 23 : 1027-1036.
 - 13) Vigen R, Maddox TM, Allen LA. Aging of the United States population : impact on heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 2012 ; 9 : 369-374.
 - 14) Li TS, Cheng K, Malliaras K, 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 : 942-953.
 - 15) Cheng K, Ibrahim A, Hensley MT, 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.
 - 16) Dominici M, Le Blanc K, Mueller, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006 ; 8 : 315-317.
 - 17) Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, et al. The essence of senescence. *Genes Dev* 2010 ; 24 : 2463-2479.
 - 18) Lawless C, Wang C, Jurk D, et al. Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Exp Gerontol* 2010 ; 45 : 772-778.
 - 19) Chimenti I, Smith RR, Li TS, et al. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res* 2010 ; 106 : 971-980.
 - 20) Tang XL, Rokosh G, Sanganalmath SK, 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.
 - 21) Gneocchi M, Zhang Z, Ni A, et al. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res* 2008 ; 103 : 1204-1219.
 - 22) Shinde AV, Frangogiannis NG. Fibroblasts in myocardial infarction : a role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol* 2014 ; 70 : 74-82.
 - 23) Avolio E, Gianfranceschi G, Cesselli D, 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 : 2373-2385.
 - 24) Cheng K, Malliaras K, Smith RR, 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.
 - 25) Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* 2008 ; 132 : 681-696.
 - 26) Li TS, Cheng K, Lee ST, 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 : 2088-2098.

Influence of Aging on the Quantity and Quality of Human Cardiac Stem Cells

Tamami NAKAMURA

Department of Surgery and Clinical Science (Surgery I), Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

SUMMARY

Advanced age affects various tissue-specific stem cells and decreases their regenerative ability. We therefore examined whether aging affected the quantity and quality of cardiac stem cells using cells obtained from 26 patients of various ages (from 2 to 83 years old). We collected fresh right atria and cultured cardiosphere-derived cells (CDCs), which are a type of cardiac stem cell. Then we investigated

growth rate, senescence, DNA damage, and the growth factor production of CDCs. All samples yielded a sufficient number of CDCs for experiments and the cellular growth rate was not obviously associated with age. The expression of senescence-associated β -galactosidase and the DNA damage marker, γ H2AX, showed a slightly higher trend in CDCs from older patients (≥ 65 years). The expression of *VEGF*, *HGF*, *IGF-1*, *SDF-1*, and *TGF- β* varied among samples, and the expression of these beneficial factors did not decrease with age. An *in vitro* angiogenesis assay also showed that the angiogenic potency of CDCs was not impaired, even in those from older patients. Our data suggest that the impact of age on the quantity and quality of CDCs is quite limited. These findings have important clinical implications for autologous stem cell transplantation in elderly patients.