

78. 脂肪細胞由来細胞シートを用いた心筋再生療法の開発

西村 元延

鳥取大学 医学部 器官制御外科学講座 器官再生外科学分野

Key words : 脂肪幹細胞, 細胞シート, 心筋梗塞, 再生医療

緒言

我が国の食生活の欧米化に伴い、動脈硬化疾患である急性心筋梗塞は増加の一途を辿っている。本疾患に対する緊急の治療は経皮経管的冠動脈形成術や冠動脈バイパス術であり、これにより急性期の予後は大きく改善している。一方で、心筋梗塞後に生じる虚血性心不全は薬物治療や心臓同期療法が施されるが、その予後は十分に改善されない。これは、心筋梗塞後に起こる心機能の低下とこれを代償するために起こる交感神経活性やレニン・アンジオテンシン系等の神経体液性因子の活性化が、残存心筋肥大・細胞死や線維化といった心筋リモデリングを惹起するからである。加えて、 β アドレナリン受容体の異常により、さらに心筋リモデリングが促進され、末期心不全に至る。現在心筋梗塞後の心不全に対する治療法として、 β 遮断薬やアンジオテンシン変換酵素阻害薬などを用いた薬物治療、心臓同期療法、補助人工心臓の装着、心臓移植等が行われている。特に 65 歳以下の重症心不全患者には補助人工心臓を用いたブリッジ治療の後に心臓移植が行われるのが理想である。

しかしながら、我が国では倫理的な問題からドナー不足に陥っている。また、心臓移植を受けた場合も移植手術時の合併症の危険性や移植後の拒絶反応、免疫抑制剤の使用に伴う副作用の問題がある。そこで、近年、従来の治療法の代換えとして、再生医療の研究が行われている。これまでの報告では、多能性幹細胞 (iPS: induced Pluripotent Stem 細胞など) や体性幹細胞を移植すると、移植した細胞から分泌される VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) や HGF (Hepatocyte Growth Factor) などのサイトカインの働きにより、細胞死の抑制や血管新生が促進され、梗塞部位と心筋リモデリングの範囲の縮小に成功したと報告されている。

しかしながら、これらの報告では、移植時に単一細胞をシリンジで直接心筋に移植するため、移植細胞の生存率、生着率の低さや、死細胞が原因の不整脈性などの問題が生じている。これらの問題を解決し、移植細胞の生着率や生存率を改善する方策として、細胞シート技術が検証されている。細胞シート技術とは、培養細胞を 1 枚のシートに加工する技術である。細胞シートの作製には、温度感受性ポリマーで表面処理された培養皿を用いる。この温度感受性培養皿へ細胞を播種し、コンフルエントの状態まで増殖させる。この状態の培養皿を 37℃ 環境下から、20℃ 環境下に変化させることにより、培養皿表面の温度感受性ポリマーの構造が変化し、細胞が培養皿から浮遊し、細胞間接着や細胞外マトリックスを維持したまま細胞をシートとして回収することができる。この技術を用いることにより、移植細胞の生存率が向上するという報告や、細胞からのサイトカインの分泌期間も引き延ばすことができるという報告もある。

現在までの研究において、急性心筋梗塞に対する細胞シート技術を用いた細胞治療の細胞源としては、iPS 細胞や骨格筋芽細胞、脂肪組織由来幹細胞などが用いられている¹⁾。

これらの細胞を比較してみると、iPS 細胞の場合は癌化の問題や自家 iPS 細胞を用いる場合はその樹立と細胞数の確保に時間がかかること、骨格筋芽細胞の場合は、骨格筋からの細胞採取の際に患者への侵襲が大きく、シート作製に十分な細胞数を得ることが難しいという問題が挙げられる。

そこで我々は、脂肪組織由来幹細胞 (Adipose Derived Stem Cell, ADSC) に着目した。ADSCs は脂肪組織中に大量に存在する間葉系幹細胞であり、脂肪吸引という比較的侵襲が少ない方法で獲得することができる。本細胞は VEGF、FGF (Fibroblast Growth Factor) や HGF などのサイトカイン分泌能があることが知られ、これらのサイトカインの分泌により血管新生が促進され²⁾、虚血部位の細胞を保護し³⁾、心機能の改善やリモデリングの抑制に効果があると報告されている⁴⁾。

そこで本研究では心筋梗塞モデルラットを用いて、ADSCs シート移植が心機能の改善と、心筋リモデリングに対して改善効果をもたらすかどうか検討を行った。

方 法

1. Rat ADSCs の採取

8週令の雄 Lewis ラットを炭酸ガスで安楽死させたのち、腹部並びにそけい部の脂肪組織を採取した。採取した脂肪組織をコラゲナーゼタイプ I を含む培養液 (DMEM+0.1 % コラゲナーゼタイプ I で処理 (37 °C、60 分) した後、茶こし、100 μ m フィルターでろ過し、余分な繊維分や脂肪組織を除去した。ろ過した細胞含有液を遠心分離 (4 °C、1,500 rpm、5 分) し、沈殿物を PBS で洗浄し、ADSCs を得た。

2. ADSCs の培養

単離した ADSCs を 20 % Fetal bovine serum (FBS) と 1 % PSG を含む、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) の ADSCs 用培養液で 37 °C、5 % CO₂環境下で培養した。継代方法は ADSC を PBS で 3 回洗浄し、0.25 % Trypsin-EDTA を 1 mL 加えて 1 分間インキュベートしたのち、細胞を 15 mL チューブに回収した。その後、遠心分離 (1,000 rpm、3 分間) を行い、上清を除いて、培養液で懸濁し、培養皿に細胞を播種した。今回の実験で使用する細胞は継代数 2 ~ 3 の細胞を使用した。

3. 細胞シートの作製

培養した ADSCs を用いて細胞シートを作製した。シート作製の前日に 3.5 cm 温度感受性培養皿に FBS 2 mL を加えて 37 °C、5 % CO₂環境下で一晩インキュベートした。その後 PBS で一回洗浄し、 3.0×10^5 cells/cm²の ADSCs をまいて 37 °C、5 % CO₂環境下で培養し、24 時間後に温度感受性培養皿を室温に置き、シートを回収した。

4. 心筋梗塞モデルラットの作製

8週令の雄 Lewis ラットを用いて心筋梗塞モデルを作製した。ラットに吸入麻酔 (イソフルラン) で麻酔をかけ、気管挿管を行い、人工呼吸器でガス交換を行いながら、手術を行った。ラットの左胸部を切開し、鈍的剥離を行いながら脂肪組織や筋肉を切開し、心臓を露出させた。冠動脈の左前下行枝を 6-0 サイズの糸で結紮することによって心筋梗塞モデルを作製した。

5. 心エコー検査

手術前 (0 週目)、術後 1 週目、3 週目、5 週目で心エコー検査を行った。左室の短軸像を撮影し、左心室腔の面積、また、M モードにより左心室前壁の厚さ、左室短縮率 (Fractional Shortening, FS)、駆出率 (Ejection Fraction, EF) などの項目について計測した。

6. ADSC シートの移植

心筋梗塞モデルラットを作製して 1 週間後 ADSC シートの移植を行った。シート作製後、温度感受性培養皿を室温に 30 分間おいて、シートを培養皿からはがし、回収した。心筋梗塞モデルラット作製の際と同様に麻酔をかけ、人工呼吸器でガス交換をしながら、ラットの正中切開で開胸した後、ADSC シートを心筋梗塞部位に移植した。

7. ランゲンドルフ灌流実験

5 週目の心エコー検査が終了した後、ランゲンドルフ灌流実験を行い、強心薬への反応性を評価した。心エコー検査を終えたモデルラットから、心臓を取り出し、ランゲンドルフ装置に装着して、37 °C の灌流液 (NaCl: 140 mM、KCl: 5 mM、MgCl: 1 mM、HEPES: 10 mM、CaCl: 1.8 mM、Glucose: 10 mM、pH = 7.4) で心臓が拍動する状態を維持した。左心室にバルーンを挿入することにより、収縮末期圧、拡張末期圧を計測しながら、1 μ M のイソプロテレノールまたは 1 μ M のピモベンダン を 1 mL 加えて、左室の収縮末期圧や心拍数の変化を観察した。

8. 組織学的解析

ランゲンドルフ灌流実験を行った後の心臓を10%ホルマリン液で固定し、パラフィンで包埋し、組織切片を作製した。組織切片の線維化の判定には、マッソン・トリクローム染色を用いた。この染色法では膠原線維を特異的に染色する。心筋梗塞部と健常心筋の境界部を2か所顕微鏡で撮影(40倍)し、画像解析により、染色面積を測定した。また、組織切片の血管新生の判定には血管内皮細胞のマーカーである von Willebrand Factor に対する抗体を用いて免疫染色を行った。心筋梗塞部と健常心筋の境界部の血管数を計測した。

結果

1. ADSCs シート移植が心筋梗塞後の心機能に及ぼす効果

心筋梗塞時の ADSCs シート移植の心機能改善効果を調べるために、Sham 手術群、心筋梗塞群、ADSCs シート移植群の3群のモデルラットを作製し、比較を行った。心筋梗塞作製手術後1週間に ADSCs シートを移植し、移植後4週間に麻酔下で心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流実験で *Ex-vivo* で心機能の評価を行った。心エコー法については、手術前(0week)、心筋梗塞作製手術後1週間(ADSCs シート移植時)、ADSCs シート移植後2週間(3週)、ADSCs シート移植後4週間(5週)において、心エコー法を用いて心機能の非観血的測定を行った。

心筋梗塞後5週間の心エコー画像から、Sham 群に比較して心筋梗塞群では顕著に左室駆出率(Ejection Fraction: EF)ならびに左室短縮率(Fractional Shortening: FS)が低下し、左室拡張末期径ならびに左室収縮末期径が拡大していた。一方で ADSCs シート移植群では Sham 群に比べて EF ならびに FS が低下し、左室拡張末期径ならびに左室収縮末期径が拡大していたが、その程度は心筋梗塞に比較して軽度であった。

これらの心機能の評価項目を経時的に観察すると、EF は心筋梗塞作製後1週間で、心筋梗塞群、ADSCs シート移植群ともに、48%程度まで低下し、Sham 群と比較して、有意に低下していた。この低下傾向は術後3週間、5週間と継続し、心筋梗塞群では術後5週間で36%程度まで低下していた。一方で、ADSCs シート移植群では、EF は3週間後まで心筋梗塞群と同様に低下を続けるが、3週間後から5週間後まではほとんど低下を示さず、43%程度を維持していた。この結果は心筋梗塞と比べて、ADSCs シート移植群が EF の低下を有意に抑制していることを示している(図1)。

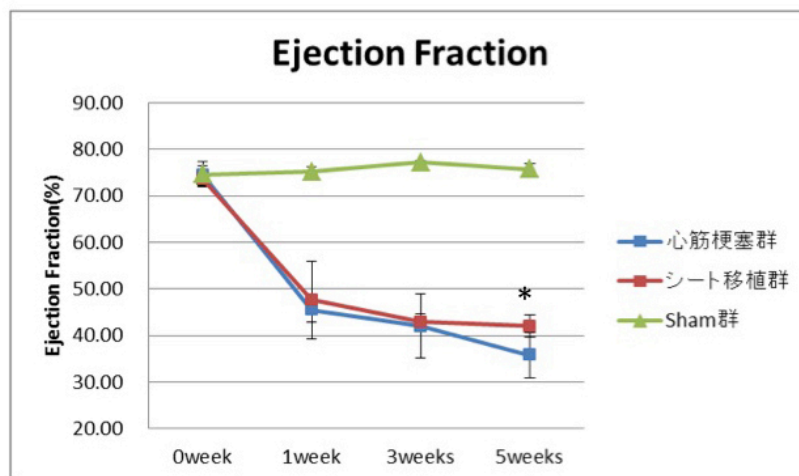


図1. ADSC シートによる EF の改善効果

心筋梗塞作製手術前(0week)、手術後1週間、3週間、5週間での EF の経時変化を示す。Sham 手術群 (n = 3) は開胸手術前後で大きな変化は見られない。心筋梗塞群 (n = 5) と ADSCs シート移植群 (n = 5) では手術後1週間で EF の値が大きく低下している。心筋梗塞作製後5週間で心筋梗塞群と比較して、ADSCs シート移植群で有意に EF が改善している (*p < 0.05, One-way ANOVA)。

これらの結果は FS においても同様であり、ADSCs シート移植群では術後3週目から5週目の FS の低下を抑制することが判明した。左室拡張末期径については、有意な改善効果は見られなかった。左室収縮末期径については、ADSCs シート移植群において、5週目で有意な改善が見られた。

以上の結果から ADSCs シート移植は軽微ではあるが、心筋梗塞後の心収縮能を改善することが判明した。またその効果は移植後 2 週間以上経過して現れることが判明した。

2. ランゲンドルフ灌流実験による *Ex-vivo* での心機能の検証

ランゲンドルフ灌流法を用いて、心筋梗塞後 5 週間の心臓の *Ex-vivo* における心機能を検討した。これまでの研究において、心筋梗塞後の ADSCs シート移植群では強心薬への応答性を改善できないという報告がある。そこで本研究でも $\beta 1$ アドレナリン受容体作動薬であるイソプロテレノールの効果について、同時に検証した。

ランゲンドルフ灌流装置で心臓を灌流し、左室収縮末期圧と dP/dt を記録すると、心筋梗塞群と ADSCs シート移植群で左室収縮末期圧と dP/dt の値に違いは見られなかった。またイソプロテレノール投与後においては、すべての群がイソプロテレノールへの応答性を示し、左室収縮末期圧と dP/dt の値が上昇した。しかしながら、心筋梗塞群と ADSCs シート移植群では、その応答性に有意な差は見られなかった。同様にそれぞれの変化量にも有意な差は見られなかった。

これらの結果から、ADSCs シート移植が示す心機能改善効果は *Ex-vivo* の解析では有意な改善効果を示さないことが判明した。

3. ADSCs シート移植の心臓組織への影響

心筋梗塞後の初期段階では、心筋細胞の肥大や線維化が起これ、一時的に心機能の補強が行われる。しかしながら、線維化が進行すると、心臓の収縮力が低下し、心筋リモデリングが進行することが知られている。そこで、本研究でも、心筋梗塞後の ADSCs シート移植群で、線維化がどの程度進行しているかを検証した。心筋梗塞作製後 5 週間の心臓の組織切片を作製し、マッソン・トリクローム染色により、心筋梗塞部と健全心筋との境界領域における線維化を定量した。その結果、心筋梗塞群と比較して ADSCs シート移植群で線維化が抑制されていた。定量解析を行うと、ADSCs シート移植群では心筋梗塞群の半分程度に線維化領域が減少していた (図 2)。

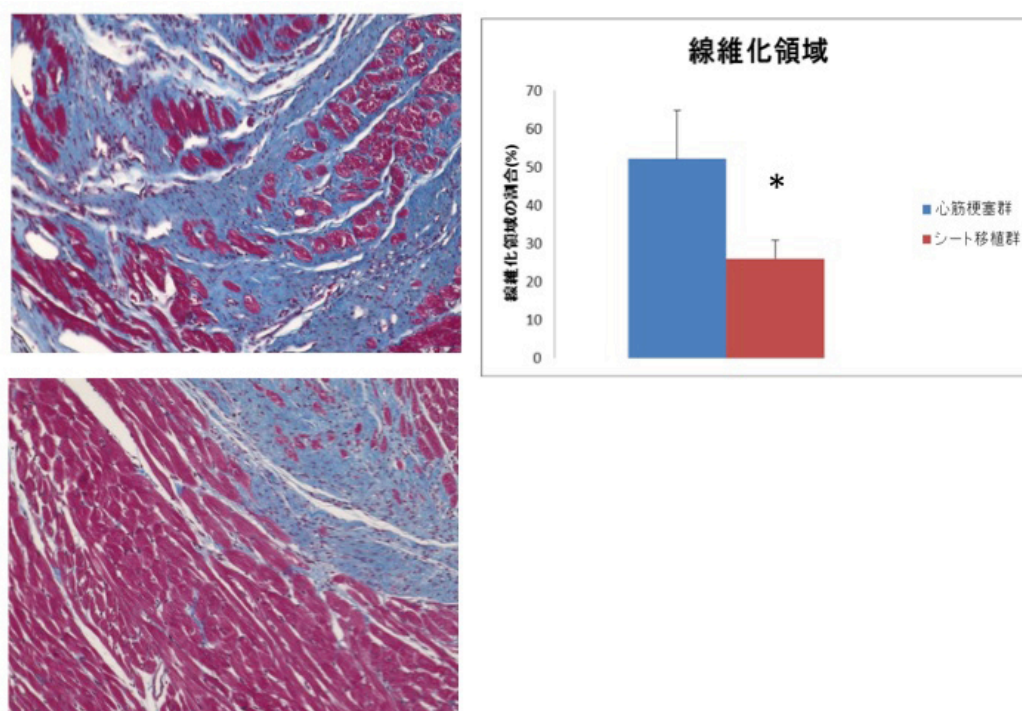


図 2. ADSC シートによる心筋梗塞後線維化の改善効果

マッソントリクローム染色による線維化領域の比較。左上段：心筋梗塞群の代表的な組織画像 ($\times 40$)、左下段：ADSCs シート移植群の代表的な組織画像 ($\times 40$)、右上段：線維化領域の定量的比較。

強拡大の組織画像において、心筋梗塞群と比較して、ADSCs シート移植群で有意に線維化領域が減少している (* $p < 0.05$, unpaired Student t test)。

次に、血管新生の評価を行った。抗 vWF 抗体による血管内皮細胞の染色により血管数を計測することで心筋梗塞と健常心筋との境界領域における新生血管を比較した。ADSCs シート移植群では心筋梗塞群と比較して顕著に血管数が増加していた。定量解析から、ADSCs シート移植群は 2 倍以上血管が増加していることが分かった (図 3)。

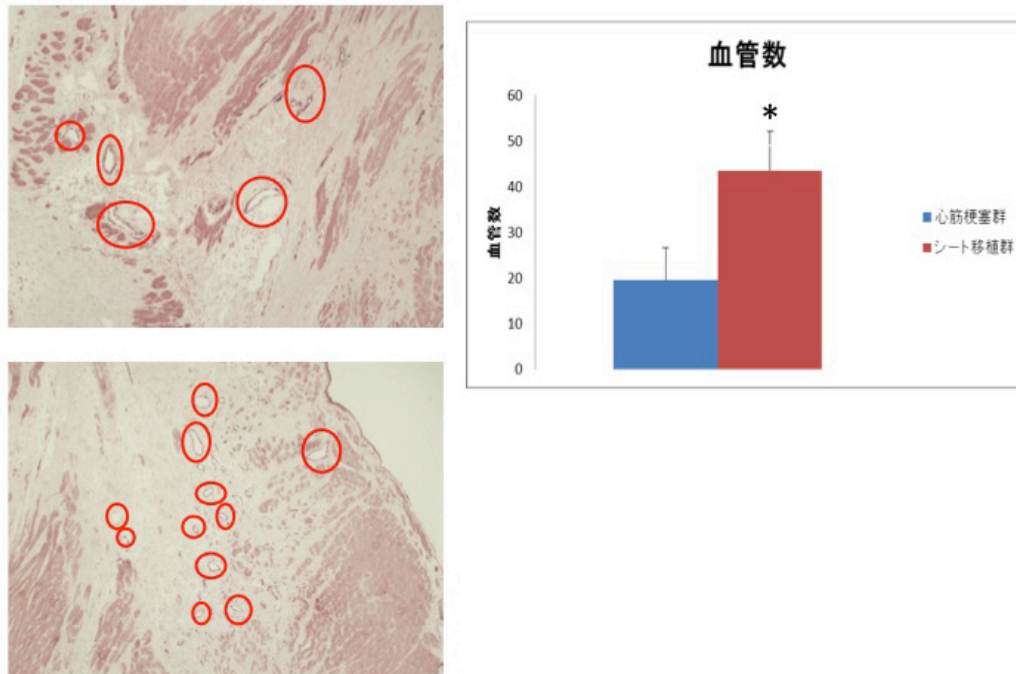


図 3. ADSC シートによる心筋梗塞後血管新生効果

抗 vWF 抗体による免疫染色組織画像。左上段：心筋梗塞群の組織画像 (×20)、左下段：ADSCs シート移植群の組織画像 (×20)、右上段：血管数の比較。

血管数をカウントすると、心筋梗塞群と比較して、ADSCs シート移植群において血管数が有意に増加していた。(* $p < 0.05$, unpaired Student t test) 赤丸は血管を示す。

以上の結果から、ADSCs シート移植は心筋梗塞後の線維化を抑制し、血管新生を促進することが判明した。

考 察

本研究は ADSCs シート移植が心筋梗塞後の慢性心不全に及ぼす治療効果の検討を目的として行った。その結果、心筋梗塞後の ADSCs シート移植は、心機能の改善と心筋リモデリングの抑制に有効であることが判明した。特に心機能の面では、ADSCs シート移植群で EF、FS が改善し、心臓組織学では線維化領域が減少し、血管数が増加することが判明した。血管数の増加は ADSCs より分泌される血管内皮成長因子 (VEGF) により血管新生が誘導されたためと考えられる。

本研究ではサイトカイン分泌量は測定していないが、ADSCs からは VEGF のほかに HGF などのパラクライン因子が分泌されていることが知られている。HGF は内皮細胞の遊走と増殖を促進し、加えて内皮細胞のアポトーシスを抑制することによって血管新生を促進する働きがある⁵⁾。また、ADSCs を低酸素状態で培養するとサイトカインの分泌量が増加することから、虚血状態においても同様のサイトカイン分泌の増加が起こると推測されている⁶⁾。これより本研究においては、VEGF、HGF によって心筋梗塞部と健常心筋の境界部に血管新生が起こり、新生血管により境界部の健常心筋が虚血状態から脱し、アポトーシスする細胞数が減少したと推測される。加えて、心筋細胞のアポトーシスの減少に伴って、癒痕化のために遊走する線維芽細胞の数が減少し、線維化領域の減少につながったと考えられる。これら健常心筋のアポトーシスの抑制と線維化領域の減少より、心臓の収縮能力障害が抑えられたことが、ADSCs シート移植での EF ならびに FS の低下抑制につながったと考えられる。

一方で心筋リモデリングを反映する左室収縮末期径は改善したが、左室拡張末期径は改善できなかった。このメカニズムに関しては本研究で明らかにすることができなかったため今後検討する必要がある。

ランゲンドルフ灌流を用いた *Ex-vivo* の検討では、イソプロテレノール投与前の左室収縮末期圧と dP/dt 、イソプロテレノール投与後の左室収縮末期圧と dP/dt の値は、心筋梗塞群と ADSCs シート移植群の両群間に差は見られなかった。この結果は、ADSCs シート移植では β アドレナリン受容体の反応性を改善できないことを示唆する。急性心筋梗塞等により心筋障害が生じると、生体内ではカテコラミンが分泌されて、心収縮力を補おうとする。しかし、慢性心不全になると慢性的に β アドレナリン受容体が刺激されるため、 β アドレナリン受容体の脱感作が引き起こされ、カテコラミンに対する感受性が低下する。また、慢性的に β アドレナリン受容体が刺激されると、 β アドレナリン受容体はクラスリンによって被覆されエンドサイトーシスで細胞内に内在化する。ADSCs シート移植ではこの β アドレナリン受容体の脱感作とエンドサイトーシスによる受容体の内在化を抑制することができなかったため、心筋梗塞群と ADSCs シート移植群の間でイソプロテレノールに対する反応性において差が見られなかったと考えられる。

本研究で心筋梗塞に ADSCs シートを移植することによって心機能が改善することが判明したが、先行研究の結果と比較するとその改善程度は小さい。先行研究で ADSCs を単細胞の状態、虚血心臓に直接注入する移植方法や本研究と同様に細胞シートを作製して、移植する方法が行われている⁶⁾。しかしながら、どちらも心機能の改善効果は本研究よりも大きい。これは、移植した細胞数に依存している可能性がある。単離 ADSCs を移植する先行研究では、本研究で細胞シートの作製に用いた細胞数の 2 倍量の細胞を移植していた。移植した細胞数が多ければ、実際に作用するパラクライン因子の分泌量も増加し、より大きな心機能の改善が期待される。

また、細胞シートを作製して移植する先行研究では本研究と細胞数は同じであるが、心筋梗塞モデルラットの重症度が異なっていた。先行研究では EF=45 % の心筋梗塞モデルを用いたのに対して、本研究では EF=40 % とより重症の心筋梗塞モデルを使用した。このことから、ADSCs シートは軽度の心筋梗塞では心機能をよく改善できるが、重度の心筋梗塞では心機能の改善効果が小さくなる可能性がある。心筋梗塞の重症度と ADSCs シート移植の効果については、今後さらなる検討が必要である。

本研究のような重症な心筋梗塞に対しては ADSCs シートによる心機能の改善効果は小さいことが予測されるため、臨床応用は難しい。そのため今後重症心不全に対する治療効果改善法の開発が必要である。一つ目は、移植細胞の生存率を向上させること、二つ目は、移植するシートの枚数を増やし、パラクライン因子の分泌量を増加させる方法が考えられる。移植細胞の生存率の向上については、クルクミン処理を行うことで ADSCs の生存率が向上したという報告がある。クルクミン処理を行った後、細胞シートを作製することで移植細胞の生存率を向上させることができるかもしれない。また、移植するシートの枚数を増やす方法に関しては、骨格筋芽細胞シートを重ねて移植すると心機能の改善効果が向上するといった報告がある。

細胞種は異なるが、骨格筋芽細胞も ADSCs と同様に VEGF などのパラクライン因子の分泌能が確認されている。そこで、ADSCs シートも何層か重ねることによって、パラクライン因子の分泌量が増加し、心機能をより改善するかもしれない。また、ハイドロゲルなどの細胞外基質との組み合わせによる血管新生の増強も有効である可能性がある。

ADSCs は自己組織から容易に単離できるため、安全性の面からも再生医療には最適の細胞ソースであるといえる。この利点を生かし、今後さらに移植法に改良を重ねて、実臨床への橋渡しにつなげていきたい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、鳥取大学医学部器官再生外科学の大月優貴、鳥取大学大学院医学系研究科再生医療学分野の山本堅志郎及び久留一郎である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Sawa Y, Miyagawa S, Sakaguchi T, Fujita T, Matsuyama A, Saito A, Shimizu T, Okano T Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in a patient with DCM: report of a case. *Surg Today*. 2012 Jan;42(2):181-4. doi: 10.1007/s00595-011-0106-4.
- 2) Harada Y, Yamamoto Y, Tsujimoto S, Matsugami H, Yoshida A, Hisatome I. Transplantation of freshly isolated adipose tissue-derived regenerative cells enhances angiogenesis in a murine model of hind limb ischemia. *Biomed Res*. 2013 Feb;34(1):23-9. PMID: 23428977.

- 3) Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004 Mar 16;109(10):1292-8. Epub 2004 Mar 1. PMID: 14993122.
- 4) Massimiliano Gnecci, Zhiping Zhang, Aiguo Ni, Victor J. Dzau Paracrine Mechanisms in Adult Stem Cell Signaling and Therapy *Circ Res*. 2008 Nov 21;103(11):1204-19. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.176826.
- 5) Yasutaka Yamamoto, Takashi Matsuura, Genta Narazaki, Miyoko Sugitani, Kohei Tanaka, Akihiro Maeda, Goshi Shiota, Kenzo Sato, Akio Yoshida, and Ichiro Hisatome Synergistic effects of autologous cell and hepatocyte growth factor gene therapy for neovascularization in a murine model of hindlimb ischemia *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Oct;297(4):H1329-36. doi: 10.1152/ajpheart.00321.2009.
- 6) Otsuki Y, Nakamura Y, Harada S, Yamamoto Y, Ogino K, Morikawa K, Ninomiya H, Miyagawa S, Sawa Y, Hisatome I, Nishimura M. Adipose stem cell sheets improved cardiac function in the rat myocardial infarction, but did not alter cardiac contractile responses to β -adrenergic stimulation. *Biomed Res*. 2015;36(1):11-9. doi: 10.2220/biomedres.36.11.