

28) PGE2による心筋幹細胞の増殖・分化制御機構の
 解明

研究代表者 竹原 有史

【研究成果の概要】

【研究目的】

心筋幹細胞 (Cardiac stem cells:CSC) はサイトカイン放出と心筋分化を心筋再生の機序として心機能を改善する最も期待されている新規の細胞である。しかし、細胞単独治療では梗塞組織での生着能、分化能には限界があり、細胞移植治療の効果を最大限に発揮することが困難である。従って、心筋幹細胞の生着、増殖、分化能を著しく亢進させる新しい細胞内機序の解明、およびそれに基づく新規の治療法の開発が必須である。プロスタノイドは、生態の様々な炎症反応、酸化ストレスに中心的役割を果たし、特に動脈硬化、左室リモデリング進展の key molecule として PGE2 がその病態に関与していることが知られている。近年、PGE2 を介した血液幹細胞の発生・増殖制御機構の発見を契機に幹細胞における PGE2 の増殖・分化機構に関する知見が集約されつつあるが、心筋幹細胞に関しては未だ全くの不明である。本研究の目的は、PGE2 を介した心筋幹細胞の増殖及び分化機構を明らかにすることである。

【研究方法】

WT マウス (C57/B6, 8W : WT-CSC) 及び EP4 受容体ノックアウトマウス (EP4^{-/-}-CSC) 心臓よりコラゲナーゼ処理及び percoll による比重分離法により CSC を含む細胞分画を抽出した。次いで、Mouse Sca-1-

FITC ビーズによる MACS sorting により、Sca-1⁺-CSC を単離、10% FBS を含む DMEM/F12 培地において、recombinant mouse b-FGF 40ng/ml の存在下に細胞培養を行った。増殖した WT-CSC 及び EP4^{-/-}-CSC は FACS 法にて CD29, CD106, CD90 陽性かつ CD45 陰性を、RT-PCR 法にて CSC 特異的な転写因子発現として ES マーカー :Nanog,Oct3/4,Sox-2,Rex-1 及び初期心筋分化因子 :NKX2.5, GATA4 の発現を確認した。また、EP4 受容体発現は RT-PCR 法にて確認した。Sca-1⁺-CSC の PGE2 を介した心筋幹細胞の増殖及び分化機構を明らかにするために、以下の実験を行った。

A. WT, EP4^{-/-} マウスにおける心臓内 Sca-1⁺-CSC 数並びに CSC 増殖能評価

B. EP4 アゴニスト (AE1-329) 投与による細胞増殖能評価

【結果と考察】

WT マウスでは EP4 受容体は他のプロスタノイド受容体に比し高発現していた (図1)。WT 及び EP4^{-/-} マウスでは CSC の転写因子発現は同様であったが、心重量あたりの Sca-1⁺-CSC 数は、EP4^{-/-} マウスにおいて著明に減少していた (図2)。EP4^{-/-}-CSC は WT-CSC に比し bFGF 添加による細胞増殖能が有意に低下しており、第3継代細胞で既に増殖限界を迎えていた

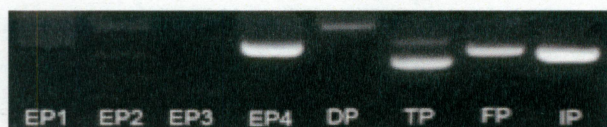


図1

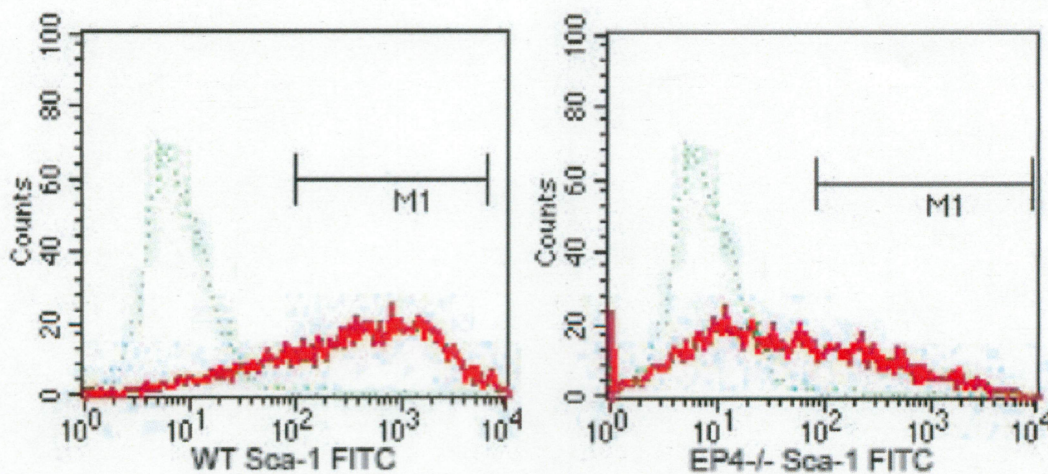


図2

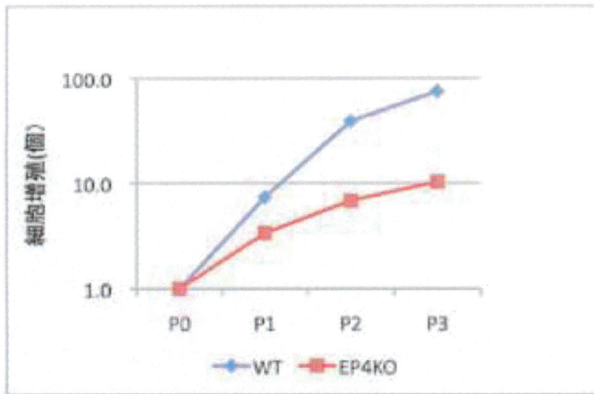


図 3

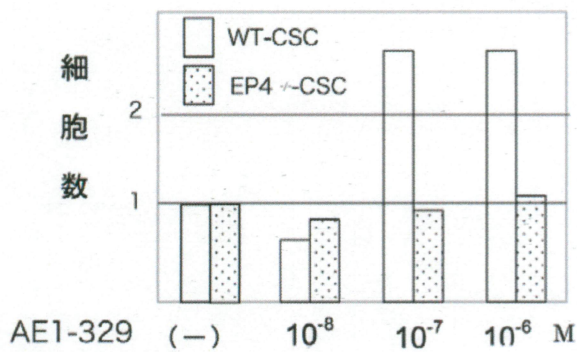


図 4

(図 3)。更に WT-CSC は EP4 受容体特異的アゴニストである AE1-329 刺激により濃度依存性に増殖が促進されたが、EP4^{-/-}-CSC では全く増強効果は全く認められなかった。

[まとめ]

マウス心臓内の Sca-1 陽性心臓幹細胞は EP4 受容体を発現し、EP4 受容体ノックアウトマウスでは心臓内 Sca-1 陽性細胞が野生型に比べ減少していることから、マウス心臓発生と PGE2 関与が示唆された。さらに、EP4 受容体ノックアウトマウス心臓由来 Sca-1 陽性心臓細胞の増殖能は野生型に比べ著しく低下しており、EP4 受容体刺激による細胞増殖増強効果が EP4 受容体ノックアウトマウスでは全く見られないことより、PGE2 が Sca-1 陽性心臓幹細胞の増殖機構に深く関与していることが示唆された。