

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	青沼 達也
<p>学位論文題目</p> <p>Apoptosis-resistant Cardiac Progenitor Cells Modified with Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease/Redox Factor-1 Gene Overexpression Regulate Cardiac Repair after Myocardial Infarction</p> <p>共著者名</p> <p>竹原 有史, 丸山 啓介, 鹿原 真樹, 松木 孝樹 山内 敦司, 川辺 淳一, 長谷部 直幸</p> <p>Stem Cells Translational Medicine</p> <p>平成28年 掲載予定</p> <p>研究目的</p> <p>昨今、障害された臓器の再生を目的として様々な細胞移植治療が行われている。心筋前駆細胞(Cardiac Progenitor Cell: CPC)は心筋分化能が高い体性幹細胞であり、既に虚血性心疾患に対して一定の効果が示されている⁽¹⁾。しかし、移植された細胞はホスト心筋内の酸化ストレスなどの影響を受け、移植後数週間で組織内に残存する細胞が数%程度まで減少する事が報告されている⁽²⁾。従って、ホスト心筋内における移植細胞の生存率改善は心疾患に対する細胞移植治療の効果を向上させる上で重要な課題とされている。</p> <p>Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease/Redox Factor-1(APE-1)遺伝子はDNA修復やレドックス機構を介して細胞内転写因子の調節を司る多機能酵素である⁽³⁾。動脈硬化病変や神経変性疾患などの酸化ストレス環境下ではAPE1の活性が上昇しているとされており、我々は血管内皮前駆細胞にAPE1遺伝子を導入する事によりその接着能を改善させ、結果として障害血管の修復が促進されることを報告した^(参考文献1)。本研究では虚血環境下においてAPE1遺伝子がCPCに与える影響を検討し、CPCへのAPE1遺伝子導入がマウス虚血心に対するCPC移植治療に与える効果とその機序について検討した。</p> <p>材料・方法</p> <p>1. Sca-1陽性CPC樹立、及びAPE1遺伝子導入</p> <p>8-10週齢のC57BL/6マウスの心臓をコラーゲン処理して細胞を抽出し、抗Sca-1抗体を用いたMACSにてSca-1陽性CPCをクローニングした。レトロウィルスを用いて蛍光標識のDsRed遺伝子単独、及びDsRed遺伝子を共発現するヒトAPE1遺伝子をCPCに導入した。DsRed陽性細胞をFACSによりソーティングして、DsRed導入CPC(Control[Ct]-CPC)、及びAPE1-DsRed導入CPC(APE1-CPC)を純化した。</p>			

2. CPCへのAPE1遺伝子導入効果の検討

過酸化水素負荷による酸化ストレス条件下でCPCの細胞内ROS産生、TUNEL法によるアポトーシスを評価した。また、同条件下で得られた炎症系及び抗アポトーシス関連蛋白のアレイ解析からAPE1過剰発現系に関連する細胞内シグナルを同定し、そのシグナル蛋白をTNF- α 刺激条件下でウェスタンブロット法により半定量解析した。

3. ex vivoの虚血環境下でAPE1-CPCが心筋細胞に与える影響の検討

虚血心筋組織内に移植されたAPE1-CPCがホストの心筋細胞に与える影響を検討するため、ex vivoモデルとしてラット新生児心筋細胞(NRVM)とCPCを無酸素条件下で共培養し、NRVMのアポトーシスを評価した。

4. マウス心筋梗塞モデルへのCPC移植治療におけるAPE1遺伝子導入効果の検討

鎮静管理開胸下でマウスの左冠動脈を45分間閉塞した後再灌流させ、得られた心筋梗塞モデルの虚血周辺部位にPBS (Ct-medium)、Ct-CPC及びAPE1-CPCを移植した。細胞移植後に施術を受けたマウスをランダム化し超音波検査を用いて虚血心の左室駆出率を細胞移植後28日目まで経時的に評価した。心機能評価後に殺処理し、得られた組織切片において心筋組織の繊維化面積を計測した。一方、ホスト心筋内における炎症性サイトカイン産生量(IL-1 β 、IL-6)は細胞移植後3日目で殺処理した心筋組織mRNAを用いて評価し、移植細胞残存率、心筋蛋白陽性の移植細胞数及びマクロファージ浸潤数は細胞移植後7日目で殺処理した組織切片を用いて評価した。

成 績

1. APE1遺伝子導入により、TAK1-NF κ B経路は活性化され、CPCのアポトーシスは抑制される

過酸化水素負荷による酸化ストレス条件下で、Ct-CPCに比べてAPE1-CPCでは有意な細胞内ROS産生の減少、アポトーシス細胞数の減少が確認された。同条件下における蛋白アレイの解析から、APE1過剰発現系に関与するシグナルとしてTAK1-NF κ B経路が同定され、TNF- α 刺激によりTAK1及びNF κ Bの活性化がAPE1-CPCにおいてより増強され、siRNAを用いたAPE1遺伝子の抑制系において減弱されることが確認された。

2. APE1-CPCは虚血環境下で心筋細胞のアポトーシスを抑制し、移植されたホスト虚血心筋内で高率に残存する

無酸素条件下で培養したNRVMのアポトーシスは、Ct-CPC共培養群に比べてAPE1-CPC共培養群で有意に抑制された。APE1-CPCのNRVMに対する抗アポトーシス効果はAPE1のレドックス活性選択的阻害剤E3330を投与することで阻害された。さらに、マウス心筋梗塞モデルへの細胞移植において、7日後の心筋組織内に残存していた移植細胞は、Ct-CPC投与群に比べてAPE1-CPC投与群で有意に増加していた。

3. APE1-CPCは心筋梗塞モデルマウスの心機能を改善し、心筋繊維化を抑制する

細胞移植後28日目ではCt-CPC投与群に比べ、APE1-CPC投与群では有意に左室駆出率が改善し、心筋繊維化面積はCt-CPC投与群に比べてAPE1-CPC投与群で有意に減少した。

4. APE1-CPCは心筋梗塞後の炎症性マクロファージ浸潤を抑制し、ホスト心筋内でより高率に心筋分化する

細胞移植3日目の心筋組織内では、炎症性サイトカインIL-1 β 、IL-6の発現はCt-medium投与群に比しAPE1-CPC投与群においてのみ減少が確認され、細胞移植7日目では、Ct-CPC投与群に比べてAPE1-CPC投与群で有意に炎症性マクロファージ浸潤数が減少していた。一方、虚血心筋内ではCt-CPC投与群に比しAPE1-CPC投与群において有意に多くの心筋蛋白(α -Sarcomeric actinin)陽性の移植細胞が確認された。

考 案

我々は本研究において、以下の事象を示した。1) APE1遺伝子導入により虚血時にCPC内のTAK1-NF κ B経路活性が亢進し、CPCのアポトーシス耐性が向上する、2) APE1-CPCは心筋細胞のアポトーシスを抑制し、移植された虚血心筋組織内に高率に残存する、3) 移植されたAPE1-CPCは多面的な機序を介してマウス心筋梗塞モデルの心繊維化を抑制し心機能を改善させる。

本研究ではCPCのAPE1遺伝子過剰発現系において、レドックス機構⁽³⁾を介したTAK1-NF κ B経路活性が亢進することを確認した。本現象は結果としてCPCの酸化ストレス耐性を向上させ、移植後臓器におけるCPCの高率な生存を実現したものと考えられた。一方、本研究においては、CPCの幹細胞機能改善等のAPE1遺伝子過剰発現によるDNA修復機能向上を直接確認するには至らなかった。今後さらなる検討が必要である。

細胞移植による心機能改善の機序は、サイトカインを介した心保護・免疫調節や血管再生、移植細胞の心筋分化等の多面的な要素によるものと考えられている。移植されたAPE1-CPCが高率に虚血組織内に残存することでCPCの本来有する体性幹細胞としての抗炎症作用を増強させるとともに、その一部が心筋細胞に分化することにより結果として心機能改善、繊維化抑制に寄与したと考えられた。さらに、我々はCPCにAPE1を過剰発現させることで、血管新生因子などの分泌が亢進することを確認しているが、導入したAPE1遺伝子が心筋内で直接障害心筋の修復に関与したか否かの解明は今後の課題である。

結 論

CPCに対するAPE1遺伝子導入はCPCの酸化ストレスに対するアポトーシス耐性を向上させ、虚血心に移植されたCPCの生存率を改善させて心筋梗塞後の心修復効果を増強する。


引 用 文 献

1. Malliaras K, Makkar R. R., Marbán, E et al. Intracoronary Cardiosphere-Derived Cells After Myocardial Infarction: Evidence of Therapeutic Regeneration in the Final 1-Year Results of the CADUCEUS Trial. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63 (2), 110–122.
2. Takehara N, Tsutsumi Y, Tateishi K et al. Controlled delivery of basic fibroblast growth factor promotes human cardiosphere-derived cell engraftment to enhance cardiac repair for chronic myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1858–1865.
3. Thakur S, Sarkar B, Cholia RP et al. Ape1/ref-1 as an emerging therapeutic target for various human diseases: Phytochemical modulation of its functions. *Exp Mol Med*. 2014; 46: e106.

参 考 文 献

1. Yamauchi A, Kawabe J, Kabara M, Matsuki M, Asanome A, **Aonuma T**, Ohta H, Takehara N, Kitagawa T, Hasebe N. Apurinic/apurimidine endonuclease 1 maintains adhesion of endothelial progenitor cells and reduces neointima formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013; 305(8): H1158–67.
2. Kabara M, Kawabe J, Matsuki M, Hira Y, Minoshima A, Shimamura K, Yamauchi A, **Aonuma T**, Nishimura M, Saito Y, Takehara N, Hasebe N. Immortalized multipotent pericytes derived from the vasa vasorum in the injured vasculature. A cellular tool for studies of vascular remodeling and regeneration. *Lab Invest*. 2014; 94(12): 1340–54.
3. Matsuki M, Kabara M, Saito Y, Shimamura K, Minoshima A, Nishimura M, **Aonuma T**, Takehara N, Hasebe N, Kawabe J. Ninjurin1 is a novel factor to regulate angiogenesis through the function of pericytes. *Circ J*. 2015; 79(6): 1363–71.
4. Ota H, Takehara N, **Aonuma T**, Kabara M, Matsuki M, Yamauchi A, Takeuchi T, Kawabe J, Hasebe N. Association between microalbuminuria predicting in-stent restenosis after myocardial infarction and cellular senescence of endothelial progenitor cells. *PLoS One*. 2015; 10(4): e0123733.
5. **Aonuma T**, Takehara N, Saito E, Hasebe N. Adult accessory mitral valve with septal hypertrophy. *Intern Med*. 2016 in Press.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	青 沼 達 也
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>審査委員長</p>   </div> <div style="text-align: center;"> <p>審査委員</p>   </div> <div style="text-align: center;"> <p>審査委員</p>   </div> </div>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Apoptosis-resistant Cardiac Progenitor Cells Modified with Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease/Redox Factor-1 Gene Overexpression Regulate Cardiac Repair after Myocardial Infarction</p> <p>(APE1過剰発現によるアポトーシス耐性心筋前駆細胞は心筋梗塞後の心修復を制御する)</p>			
<p>心筋前駆細胞 (Cardiac Progenitor Cell: CPC) は心筋分化能が高い体性幹細胞であり、すでに虚血性心疾患に対して一定の効果が示されている。しかし、移植された細胞の組織内残存率は数%であり、したがってホスト心筋内における移植細胞の生存率改善が課題となっている。Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease/Redox Factor-1 (APE1遺伝子) はDNA修復やレドックス機構を介して細胞内転写因子の調整をつかさどる多機能酵素である。申請者らのグループはすでに血管内皮前駆細胞にAPE1遺伝子を導入することによりその接着能を改善させ、結果として障害血管の修復が促進されることを報告している。申請者は本研究において虚血環境下においてAPE1遺伝子がCPCに与える影響を検討し、CPCへのAPE1遺伝子導入がマウス虚血心に対するCPC移植療法に与える効果とその機序について検討した。</p>			

(1) 8-10週齢のマウスの心臓より細胞を抽出し、Sca-1陽性CPCをクローニングし、レトロウイルスを用いてヒトAPE1遺伝子をCPCに導入した。(2) 過酸化水素負荷による参加ストレス条件下でCPCの細胞内ROS賛成、TUNEL法によるアポトーシスを評価した。また、同条件下で得られた炎症系及び抗アポトーシス関連タンパクのアレイ解析からAPE1過剰発現系に関連する細胞内シグナルを同定し、そのシグナル蛋白をTNF- α 刺激条件下でウェスタンブロット法により半定量解析した。(3) 虚血心筋細胞内に移植されたAPE1-CPCがホストの心筋細胞に与える影響を検討するため、ex vivoモデルとしてラット新生児心筋細胞(NRVM)とCPCを無酸素条件下で共培養し、NRVMのアポトーシスを評価した。(4) マウスの心筋梗塞モデルを用い、APE1-CPCを移植し、コントロール群と比較した。評価項目として、心機能のほか心筋組織の線維化面積、炎症性サイトカイン産生量(IL-1 β 、IL-6)を測定した。

結果として、過酸化水素負荷による酸化ストレス条件下で、APE1-CPCではコントロール群と比べ有意な細胞内ROS産生の減少、アポトーシス細胞数の減少が確認された。蛋白アレイの解析から、APE1過剰発現系に関与するシグナルとしてTAK1-NF κ B経路が同定された。また、無酸素条件下で培養したNRVMのアポトーシスはコントロール群と比べAPE1-CPC共培養群で有意に抑制された。さらに、マウス心筋梗塞モデルへの細胞移植においてAPE1-CPC投与により、7日後の心筋組織内残存移植細胞の増加、28日目における左室駆出率の改善ならびに心筋線維化面積の減少が確認された。APE1-CPC投与群において、細胞移植3日後の心筋組織内では炎症性サイトカインIL-1 β 、IL-6の発現の減少が確認され、7日目では炎症性マクロファージ浸潤数が減少していた。また、APE1-CPC投与群においては有意に多くの心筋蛋白陽性の移植細胞が確認された。

本研究において、以下の事象が示された(1) APE1遺伝子導入により虚血時にCPC内のTAK1-NF κ B経路活性が亢進し、CPCのアポトーシス耐性が向上する、(2) APE1-CPCは心筋細胞のアポトーシスを抑制し、移植された虚血心筋組織内に高率に残存する、(3) 移植されたAPE1-CPCは多面的な機序を介してマウス心筋梗塞モデルの心線維化を抑制し心機能を改善させる。近年、虚血性心疾患に対する細胞移植治療は再生医療の一つとして非常に期待されている分野であるが、移植細胞の生着率の低さが課題であった。本研究はAPE1遺伝子導入による移植細胞の生着率向上の可能性を示した非常に画期的な基礎研究と言える

本論文は、幹細胞研究の分野において権威のあるStem Cells Translational Medicine (Impact factor 5.709)に掲載されているものである。申請者に対して論文・関連領域に関する諮問を行ったが、いずれも的確な回答がなされ、この領域において十分な見識と経験を有することが確認された。以上より、本論文は学位授与に値するものと結論した。