

他家 Muse 細胞の点滴静注による 急性心筋梗塞の修復再生治療法の可能性

梗塞組織修復再生と心機能回復をもたらす画期的修復再生治療を目指して

岐阜大学大学院医学系研究科循環病態学分野の湊口信也教授の研究グループと東北大学大学院医学系研究科細胞組織学分野の出澤 真理教授の研究グループは共同で、生体内多能性幹細胞である Muse 細胞をウサギ急性心筋梗塞モデルに静脈内投与すると、梗塞組織に選択的に遊走・生着し機能的な心筋細胞に自発的に分化することで心筋梗塞サイズの縮小と心機能の回復がもたらされ、さらに他家細胞(ドナーの Muse 細胞)であっても半年以上の長期間にわたり効果が持続することを明らかにしました。本研究成果は、日本時間 2018 年 2 月 24 日に Circulation Research 誌のオンライン版で発表されました。

【発表のポイント】

- ・ウサギ急性心筋梗塞モデルに、自己と他家の骨髄由来 Muse 細胞、およびヒト骨髄由来 Muse 細胞が 30 万細胞、静脈投与されました。
- ・細胞が破壊されたときに積極的に合成されるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) が梗塞部位から警報シグナルとして出され、それに対する受容体 (S1P receptor 2) を持つ Muse 細胞は静脈投与の後、選択的に梗塞部位に集積できることが新たに分かりました。
- ・Muse 細胞は梗塞組織内で 1) 自発的に心筋と血管に分化、2) 線維化の抑制、3) 液性因子による保護効果、4) ホスト細胞の細胞死抑制、などを発揮し、梗塞サイズ縮小、心機能回復、左室リモデリングの抑制などの効果をもたらしました。
- ・分化した心筋は周辺の正常心筋と連結・同期し、電気的活動性を持つ作業心筋としての役割を果たしていることが確認されました。ヒトの Muse 細胞でも同様の効果が認められました。
- ・Muse 細胞は、胎児が母体の免疫攻撃を抑制して拒絶を免れる機構の一部を持っているため、他家細胞であっても免疫拒絶を免れて効率よく梗塞心筋に到達し修復することがわかりました。また他家 Muse 細胞から分化した心筋細胞が 6 ヶ月後でも心臓内で生存し、一旦改善された心機能が減弱せずに長期間そのまま維持されることが確認されました。
- ・急性心筋梗塞に対して再灌流療法などの通常治療に加えて、ドナー由来の Muse 細胞の点滴静注で治療することにより、梗塞心筋組織を修復再生できる可能性が示唆されました。

【概要】

Muse 細胞は骨髄、末梢血、あらゆる臓器の結合組織に存在する腫瘍性を持たない生体由来の多能性幹細胞です。市販の間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells; MSCs)や線維芽細胞にも数パーセントの比率で含まれています。脳梗塞、腎不全、肝障害、皮膚損傷など様々な傷害モデルで、分化誘導せずにそのまま静脈投与あるいは局所投与することで有効に傷害部位に生着し、組織を構成する細胞に自発的に分化することで修復することが報告されています。また脳梗塞、心筋梗塞の患者さんでは、発症後急性期に末梢血内の Muse 細胞数が上昇すること、有意に上昇した患者さんは慢性期において機能回

復傾向が高いことが統計的有意差をもって示されており (Tanaka et al., Cir J 2017)、生体内で Muse 細胞が修復幹細胞として働いていることが示唆されています。

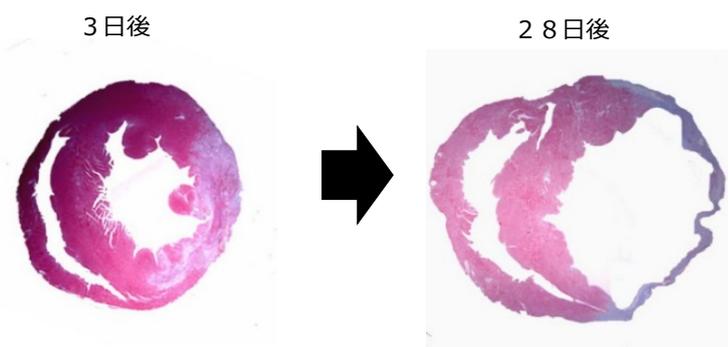
今回、ウサギ骨髄由来自家および他家 Muse 細胞、ヒト骨髄由来 Muse 細胞をウサギ急性心筋梗塞モデルに静脈内投与し、梗塞縮小効果、心機能改善、Muse 細胞由来心筋細胞の機能性などの評価を行い、さらに Muse 細胞の遊走・生着を制御するメカニズムの解明や長期における他家 Muse 細胞の有効性を検証しました。

本研究成果は、日本時間 2018 年 2 月 24 日に Circulation Research 誌のオンライン版で発表されました。また本研究は、日本医療研究開発機構 (AMED) 「橋渡し研究加速ネットワークプログラム (シーズ B15)」および国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 「再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業」の支援を受けて行われました。

1. 背景

急性心筋梗塞は、日本では年間 65,000 人から 70,000 人の発症がある循環器疾患であり、罹患率、死亡率の高い疾患です。現在、一般的で最良の治療法は、発症してからできるだけ早期に心臓カテーテルによって急性心筋梗塞の原因となっている完全閉塞した冠動脈を再灌流することです。血流が再開されることによって、本来なら死んでしまうであろう傷害を受けた心筋細胞を救出することができるからです。しかし、この責任冠動脈の再灌流が時間的に遅れたり、再灌流に失敗した場合には、多くの心筋細胞が死に至り、心筋梗塞の範囲が拡大します。さらに、慢性期には左室リモデリング、すなわち左室内腔の拡大、左室壁の線維化による左室壁の菲薄化が起きてしまいます (図 1)。このような状態になると心臓のポンプ機能は低下してしまうことになり、心不全が発症します。心不全は生命予後の悪い疾患であるため、心筋梗塞後に心不全に陥らないための治療法が求められていますが、現在の段階ではその方法は確立されておりません。そのための切り札として考えられるのが、Muse 細胞を用いた梗塞心筋組織の修復再生治療法です。

図1:大型心筋梗塞後の心臓の変化



左室リモデリング(内腔拡大、左室壁の菲薄化)

2. 研究手法

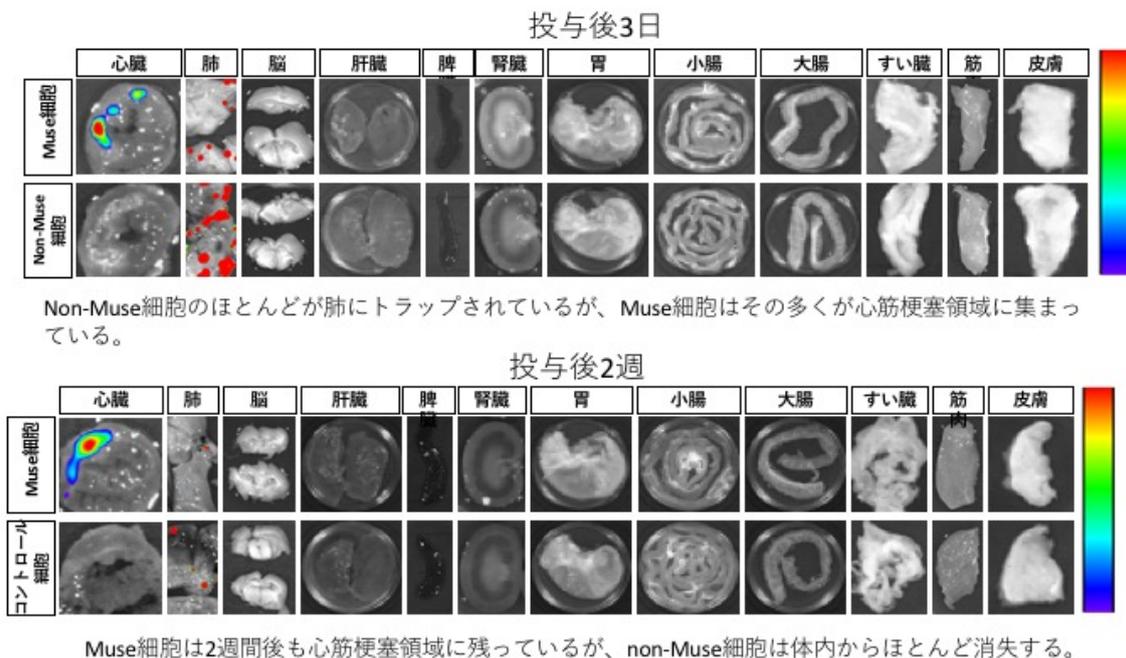
Muse 細胞の治療効果を検証するために、ウサギ急性心筋梗塞モデルを使用しました。ウサギは心臓の側副血行路を有さないため、高い確実性で梗塞モデルを作成することができます。ですので、心筋梗塞に対する Muse 細胞の治療効果を評価するには適したモデルです。ウサギを麻酔下にて開胸し、左冠動脈を 30 分間結紮(けっさつ)した後、再灌流をおこなうことにより急性心筋梗塞を作製しました。ウサギ急性心筋梗塞モデル作製 24 時間後に、30 万個の骨髄由来 Muse 細胞(Muse 群)、対象群として間葉系幹細胞(MSC 群)、MSC から Muse 細胞を除いた non-Muse 細胞(non-Muse 群)、食塩水(vehicle 群)の静脈内投与を行い、3 日、2 週後、2 カ月後、6 カ月後において Muse 細胞投与の効果の評価しました。Muse 細胞は、ウサギ自家および他家骨髄由来細胞、ヒト骨髄由来 Muse 細胞の 3 種類について評価しました。

3. 実験結果

1) Muse 細胞の梗塞心筋への遊走・生着

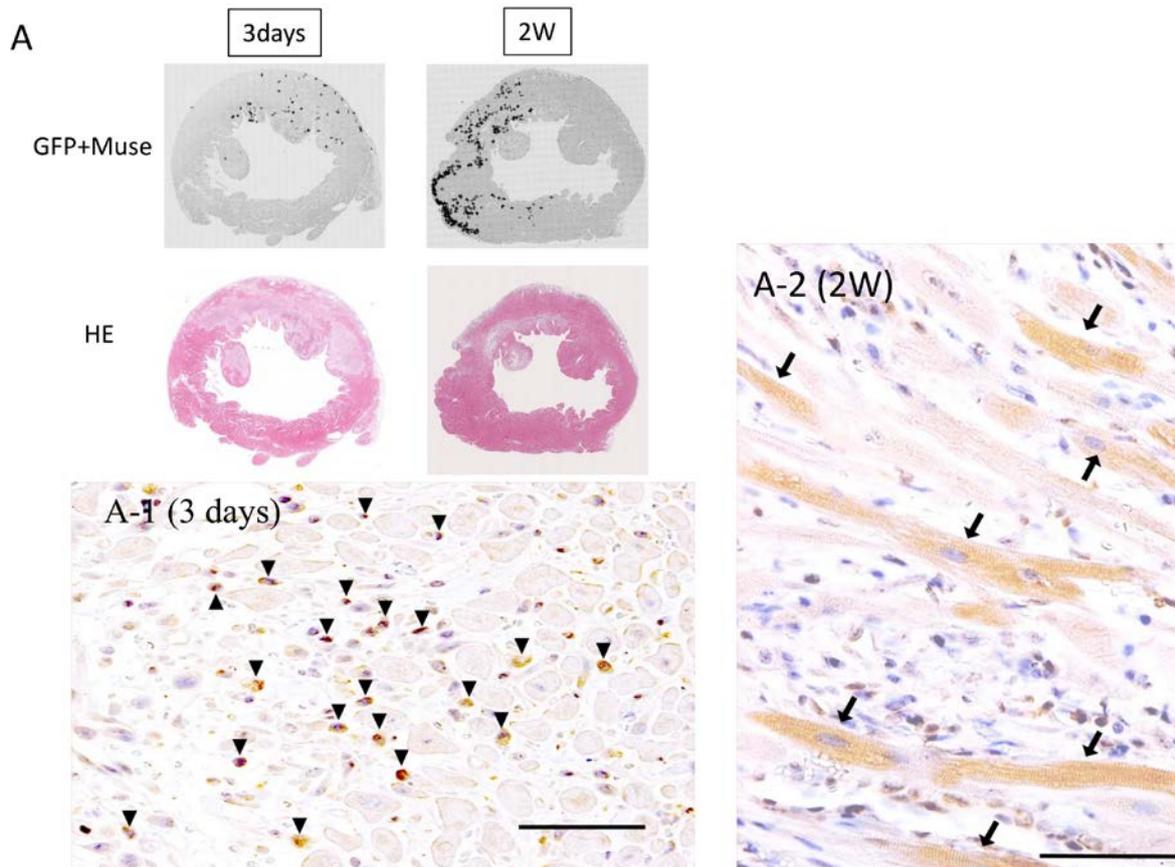
静注された Muse 細胞は、梗塞 3 日目と 14 日目の評価で、心臓のしかも梗塞部位にほぼ選択的に生着することが確認されました。一方コントロールの non-Muse 細胞はほとんどが肺にトラップされ、心臓には生着しないことが示されました。このことから Muse 細胞は静注するだけで心筋梗塞部位に選択的に集積する能力を有することが分かります。(図 2)

図 2: Nano-lantern-Muse 細胞、non-Muse 細胞(ヒト)の臓器分布



さらに心臓内を詳しく調べますと、梗塞を起こして壊死に陥った部分と壊死周辺に、Muse 細胞が生着しているのが確認されました。(図 3)

図 3: 3 日後および 2 週後の Muse 細胞 (自己) の心臓内分布

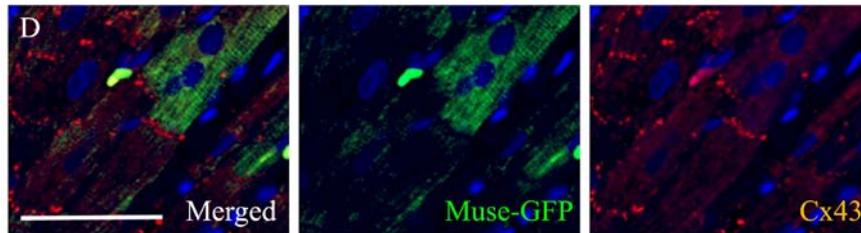


30 万細胞が静脈から投与されましたが、3 日目で心臓に生着していた率は約 14.5%です。一般に MSC では静脈投与においてはほとんどの細胞が傷害部位に生着せず、仮に組織に入ったとしても全投与細胞数の 1%以下でしかないことが報告されています。このことから、Muse細胞が高いホーミング効率を持つことが理解できます。

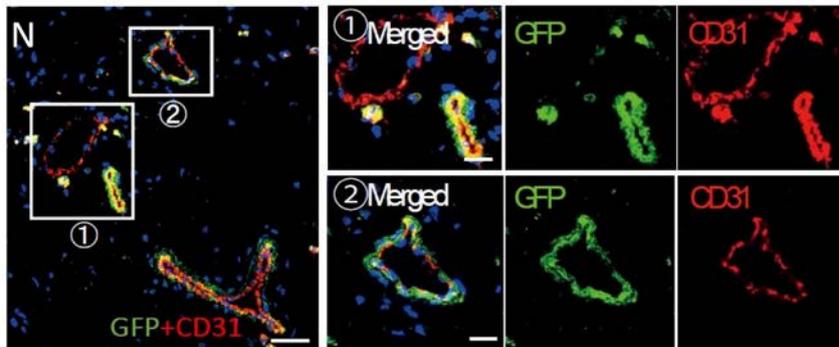
2) 「場の論理」に応じた自発的な分化

Muse 細胞は、梗塞巣に生着した後、2 週間で自発的に心筋と血管に分化しました。2 ヶ月後にはさらに分化が成熟し、troponin I、 α -actinin など成熟心筋のマーカーを発現しておりました。また、ホスト心筋細胞との電気的連結に関わる gap junction を構成する connexin43 を発現していました。(図 4)

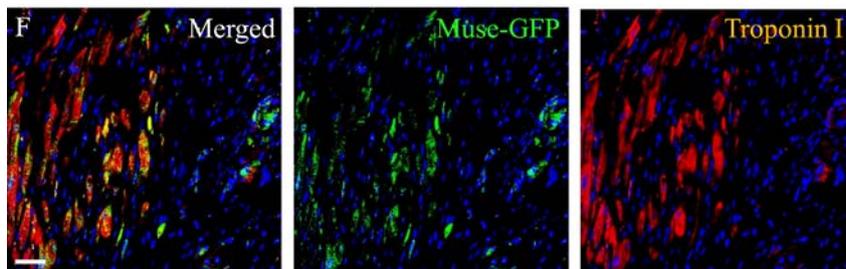
図 4: GFP-Muse 細胞(自己 Muse)における心筋マーカー発現



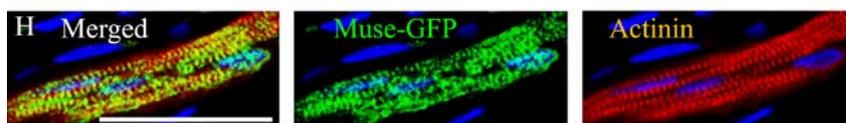
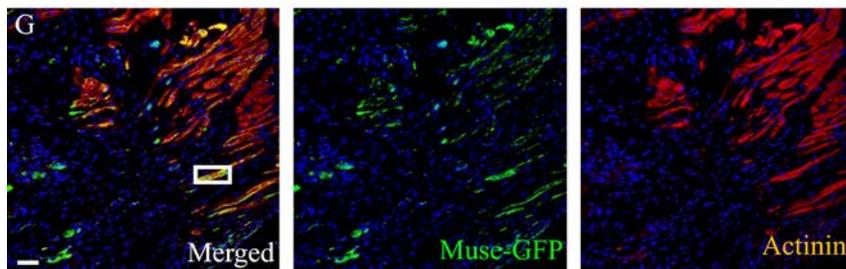
2 週: connexin43



2 週: 血管への分化



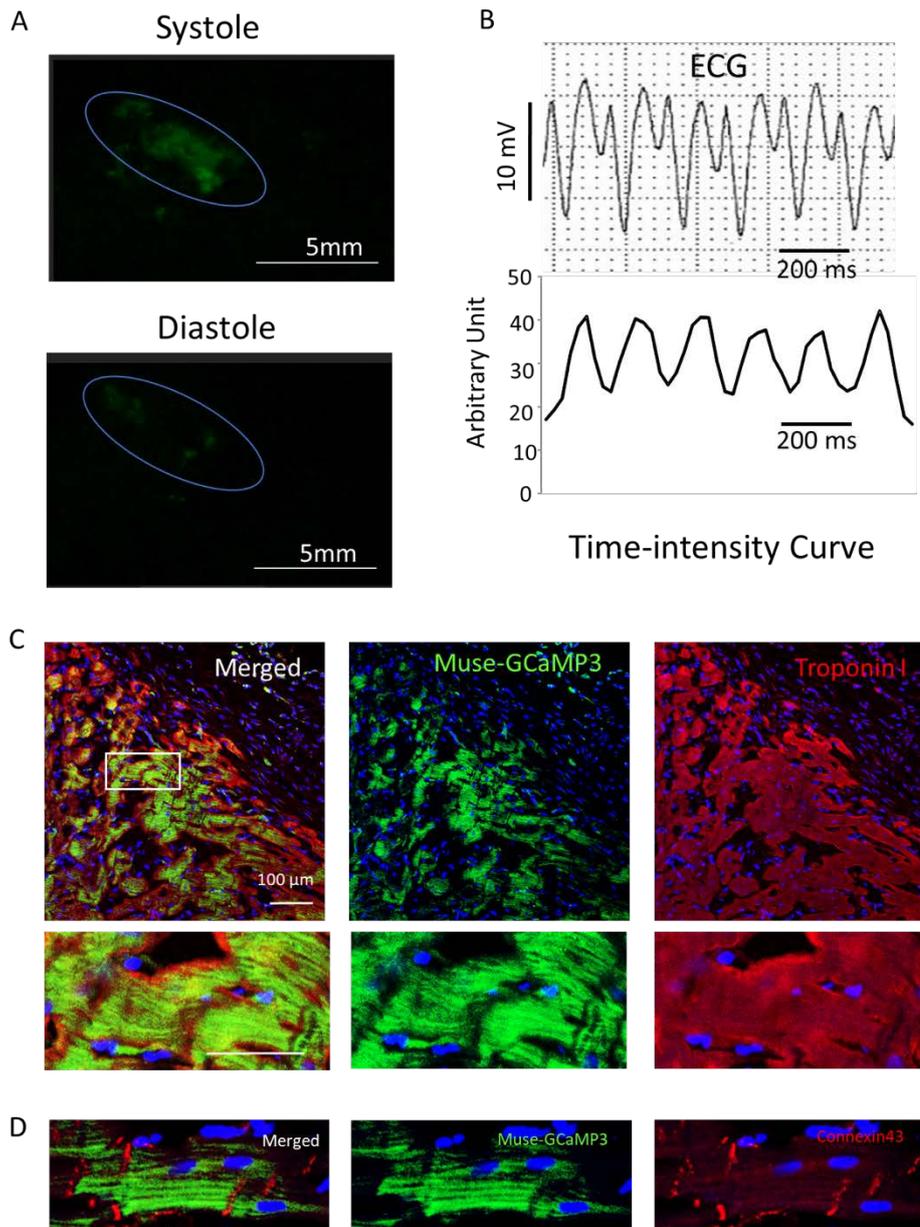
2 ヶ月: TroponinI と
 α -actinin の発現



3) 機能性を有する作業心筋への分化の確認

Caが細胞内に流入することでGFPが光るGCaMP3をMuse細胞に導入しました。2週後に心臓表面のGFPの蛍光強度を測定したところ、心電図波形と同期して収縮期にGFPの蛍光強度が上昇し、拡張期に低下し、電気的活動性を持つ機能的な心筋に分化していることが確認されました(図5)。さらに計測した領域を組織学的に調べると、GCaMPを発現しているMuse細胞が成熟心筋マーカーのTroponin Iや機能的連結を示すgap junctionタンパクconnexin43を発現することが確認されました。このことから、**Muse細胞は梗塞心臓内に生着した後、自発的に作業心筋にまで分化・成熟をしたと考えられました。**

図5: Muse細胞(ヒト)の作業心筋への分化



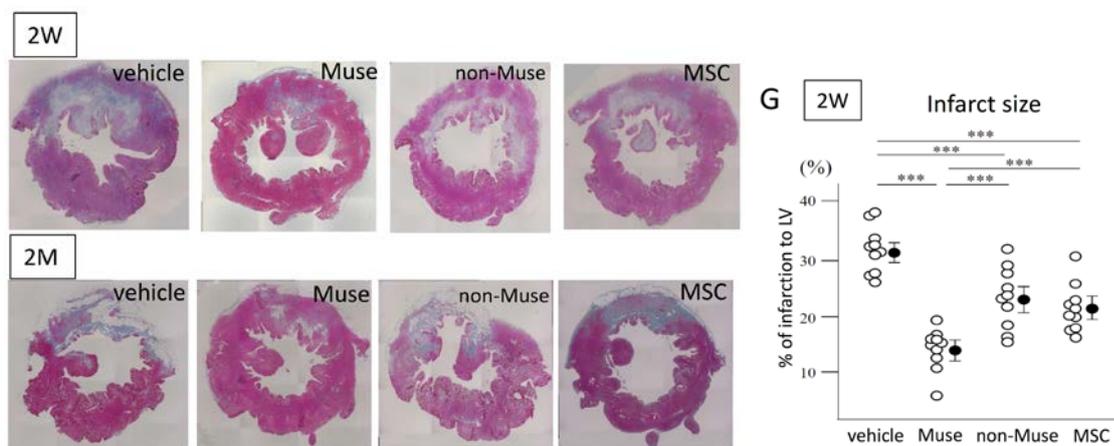
4) Muse 細胞は多面的な効果を有する

Muse 細胞が直接的に組織を構成する細胞に分化することは修復と機能回復に直結しますが、そのほかにも細胞保護作用や血管新生を促す HGF, VEGF、線維化を抑制する MMP-2, MMP-9 を産生することが示されました。実際にホストの心筋組織におけるホスト細胞の細胞死や組織の線維化の抑制、血管新生が確認されており、分化の他に多面的な効果を有することがわかりました。

5) 梗塞サイズの有意な縮小

2 週間において Muse 群の梗塞巣はコントロールの半分以下に縮小しました。一方 MSC や non-Muse では多少の効果は見られたものの、Muse 群ほどの有意な縮小効果はみられませんでした。Muse 群の縮小効果は 2 ヶ月後も維持され、ほぼ変わらない傾向を示しました。(図 6)

図 6: 梗塞サイズの縮小効果(自己 Muse 細胞)

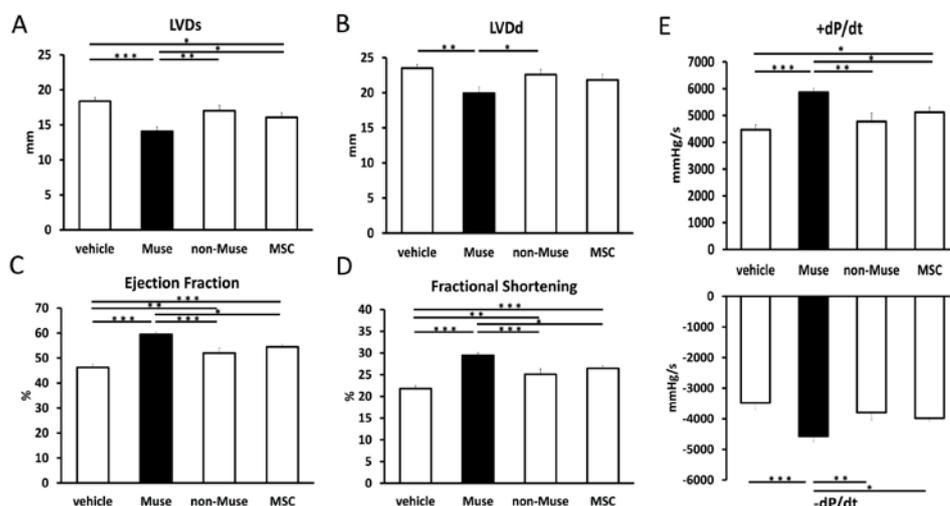


6) 心機能の回復と心不全の回避傾向

2 週後の心機能(左室駆出率 EF、左室短縮率 FS、+dP/dt、-dP/dt)、左室リモデリング(収縮末期および拡張末期の左室内径 LVDs, LVDd)は、Muse 群が他の MSC 群、non-Muse、vehicle 群に比較して有意な改善を認めています。(図 7)

同様の機能回復は 2 ヶ月後もほぼ同じで、回復した機能は維持されていました。

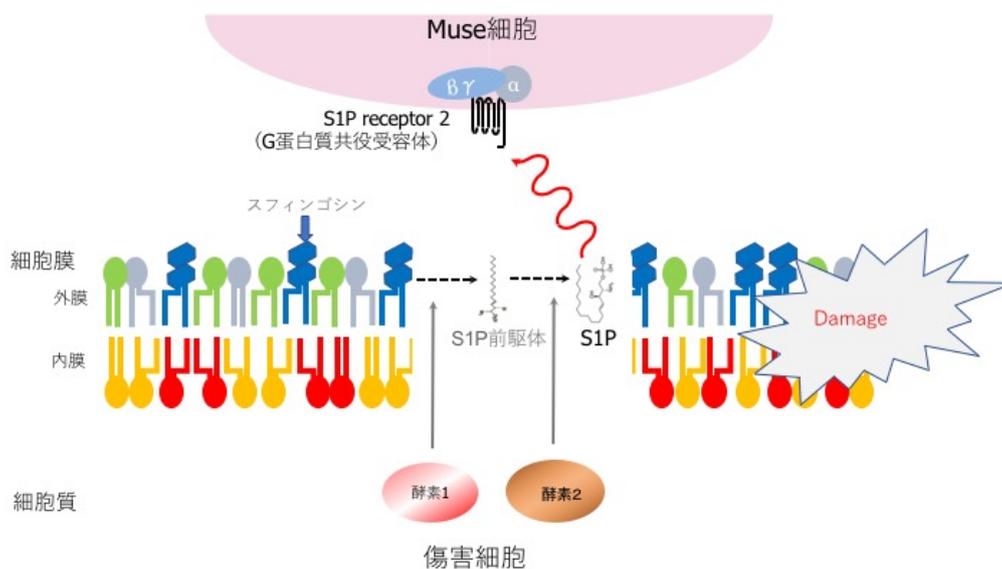
図 7: 急性心筋梗塞 2 週後の心機能回復(自己 Muse 細胞)



7) S1P-S1P receptor 2 システムによる傷害部位への特異的な遊走・生着

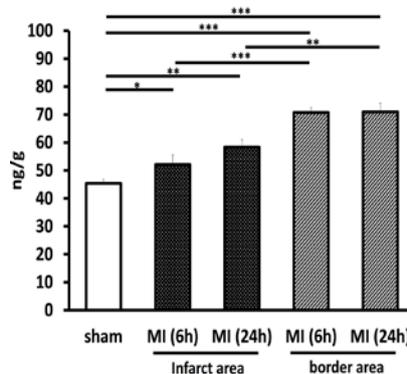
スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)は細胞が傷害を受けた時に出来る警報シグナルの一つです。細胞は脂質二重膜で出来ており、S1Pの基質は細胞膜外膜にあるスフィンゴシンです。スフィンゴシンをS1Pに転換する酵素は細胞質にあり、両者の間に細胞膜内膜が横たわるため、通常状態では積極的に作れません。しかし梗塞などで細胞が傷害され、細胞膜が破壊されると細胞膜外膜にあるスフィンゴシンと細胞内にある転換酵素が結合でき、その結果、S1Pが積極的に合成されます。S1Pに対する受容体には1~5までの5つのサブタイプがありますが、Muse細胞はS1P receptor2(S1PR2)を発現します。(図8)

図8: S1PとS1PR2の説明



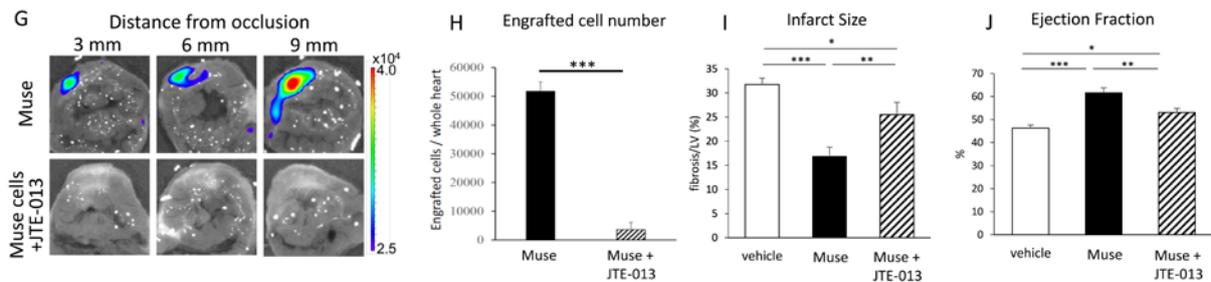
実際に心筋梗塞の梗塞部位ではS1Pが正常心筋部位よりも多く合成されていることが確認されました。(図9)

図9: 正常部位(sham)、梗塞部位(Infarct area)、梗塞周辺部位(border area)でのS1P濃度



そこで S1PR2 の特異的阻害剤 JTE-013 を Muse 細胞の投与時に同時投与しますと、図 2 で見られていた心筋梗塞領域への特異的な遊走・生着がほぼ完全に抑制され、心機能改善効果も大きく減弱しました。(図 10)。Muse 細胞に S1PR2 の siRNA を導入し、遺伝子レベルで受容体の発現を抑制しても同様の結果が確認されました。

図 10: S1PR2 の阻害による遊走・生着・心機能改善効果の減弱

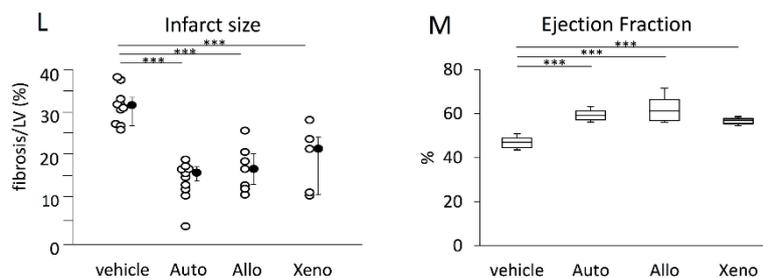


これまで腎臓や肝臓などの傷害モデルにおいて、静脈投与したMuse細胞は傷害部位特異的に遊走・生着することが示されてきました。今回心筋梗塞モデルを用いて、その機構がS1P-S1PR2 によるものであることが初めて明らかにされました。

8) 他家 Muse 細胞の修復効果と心機能改善は長期間維持される

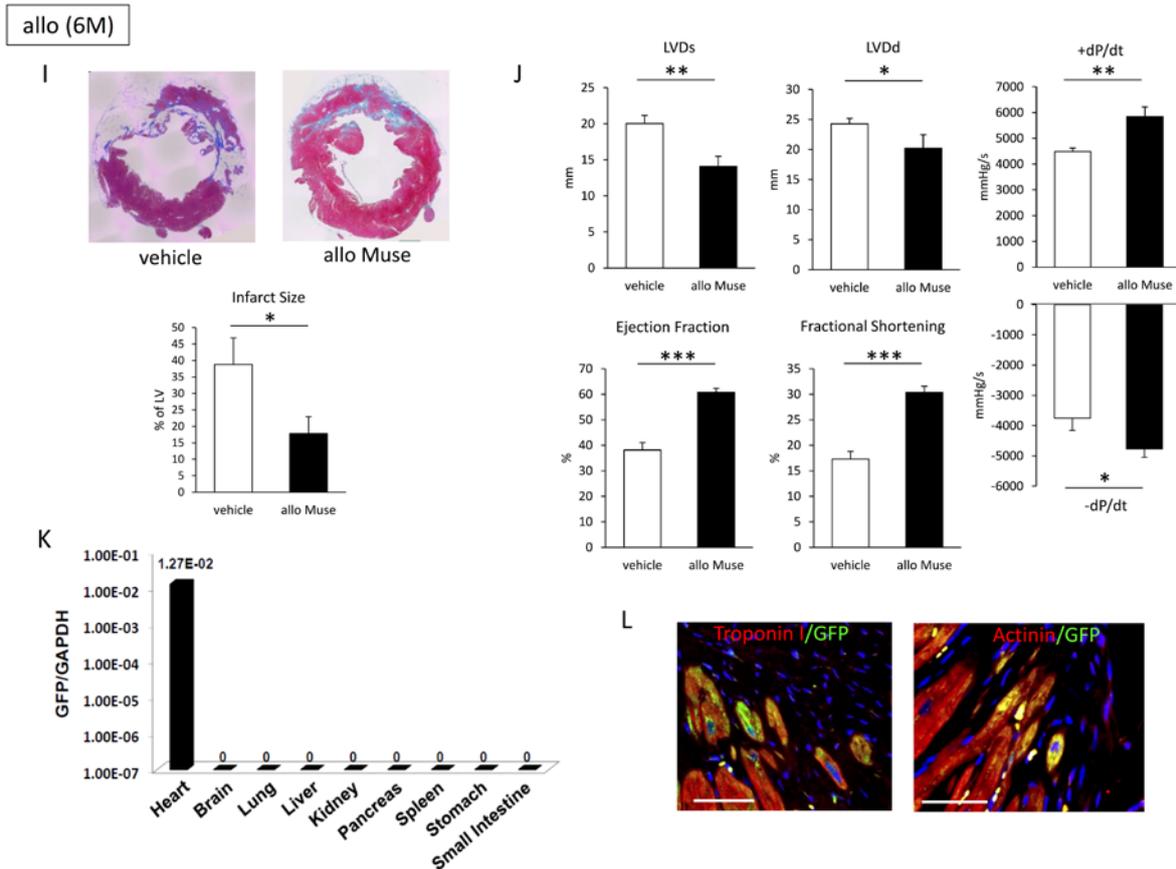
自己と他家の Muse 細胞の効果を 2 週目で比較したところ、梗塞サイズの縮小と心機能改善効果は両者ともほぼ同等であることが確認されました。(図 11)

図 11: 自己(Auto),他家(Allo),ヒト(Xeno)Muse 細胞投与での梗塞サイズ(Infarct size)と左心室拍出量(Ejection Fraction)の比較(2 週)



ウサギ他家骨髄由来 Muse 細胞では、6 ヶ月後に評価したところ、Muse 細胞から分化した心筋細胞はこの時点でも心臓組織内に存在することから、Muse 細胞からの心筋細胞への分化は長期間にわたって維持されることが明らかになりました。またこの時点での心機能の改善、左室リモデリングの抑制は2週、2ヶ月での改善状態が維持されたままでした(図 12)。

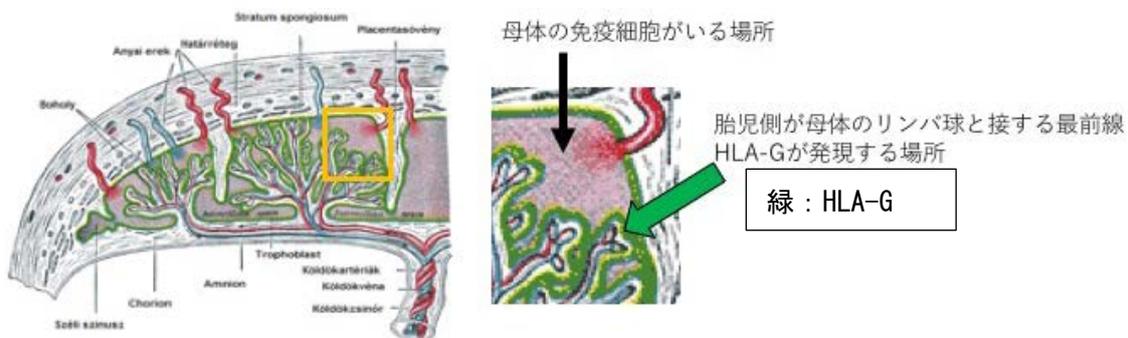
図 12:6 ヶ月後における他家 Muse 細胞から分化した心筋細胞と心機能改善・左室リモデリングの抑制の維持



今回の実験では免疫抑制剤などは一切用いておりません。そのような条件下で、他家 Muse 細胞が半年以上にわたり免疫拒絶を受けずにそのまま心筋組織に生着をし続けるということは、何らかの特殊な機構があることを意味します。MSC は一般に免疫抑制機構を持つことが知られており、Muse 細胞は同様の機構をもつことが示されました。ただ MSC であっても、このような長期間の宿主内での生存は見られていません。

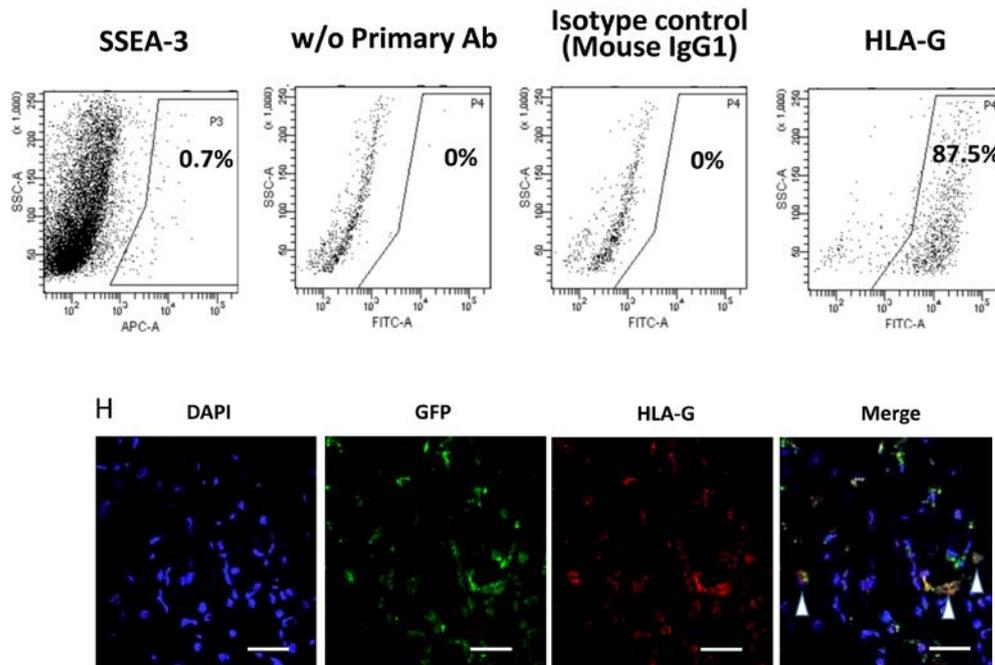
そこで調べた結果、胎児が母体の免疫攻撃を逃れる機構の一つである HLA-G を Muse 細胞が発現していることを見出しました。HLA-G は胎盤において、胎児組織が母体のリンパ球と接する最前線で発現する HLA のサブタイプであり、強い免疫抑制力を持つことが知られています。(図 13)

図 13: 胎盤における HLA-G の発現



Muse 細胞の多くが HLA-G を発現し、梗塞心筋に生着した後も Muse 細胞が HLA-G を発現していること(3日目)が確認されました。(図 14)

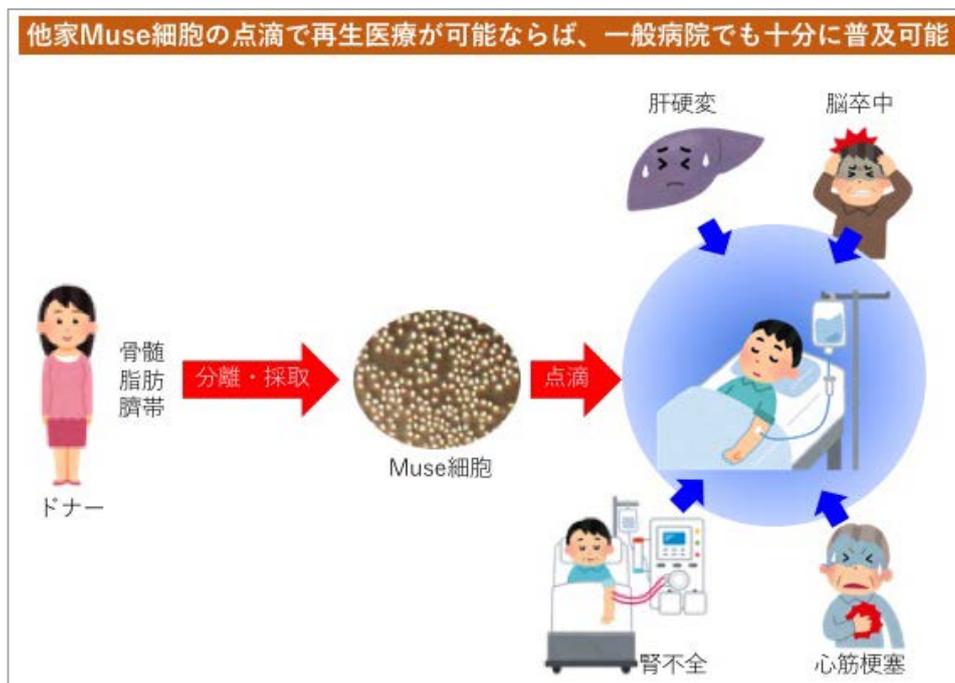
図 14: ヒト Muse 細胞における HLA-G の発現



4. 結論

急性心筋梗塞の患者に対して通常の治療を行っても心機能が良好でないと予想される場合、Muse 細胞を静脈注射することによって心機能の回復を促す新規治療法の開発が期待されます。Muse 細胞が梗塞心筋組織に集積生着し、心筋細胞、血管細胞に分化することによって、傷害組織を修復再生、心機能を回復し、慢性期の左室リモデリングを抑制できることから、心不全への進展を防止できると期待されます。またドナー由来の他家 Muse 細胞が自己の Muse 細胞と同様の効果を持ち、半年にわたり維持されることから、他家 Muse 細胞の点滴静注という簡便な修復再生治療は、心筋梗塞の新しい治療の切り札になる可能性が高いと期待されます。

5. この研究の示す可能性



我々の体は日々微細な修復がなされて組織が維持され恒常性が保たれます。これはごく自然のことように思われていますが、その機構はよくわかっていません。Muse 細胞は発見当初、骨髓や皮膚に存在する腫瘍化の懸念の低い多能性幹細胞として位置付けられ、再生医療への実用化が期待される細胞と認識されてきましたが、現在、体の修復を日々行っている「生体内修復幹細胞」としての機能が明らかになってきております。

Muse 細胞は骨髓から血液に少しずつ動員され、個人差はあるものの一定の割合で血液中を巡り、各臓器に供給されます。供給先の組織で細胞死が起きると、Muse 細胞は「場の論理」に応じた分化を行って機能的細胞を補い、修復します。今回はウサギのモデルで解析がされ、S1P によって Muse 細胞の遊走が制御されていること、心筋が補充され機能回復がなされることを示しましたが、実はこれらのデータはヒトでも確認されています(Tanaka et al., Cir J, 2017)。心筋梗塞発症後にまず血中の S1P が上昇し、引き続いて末梢血中の Muse 細胞の上昇が 24 時間以内に起こります。また急性期に Muse 細胞の上昇傾向の高かった患者さんは半年以上を経過した慢性期で、心機能が回復し心不全回避傾向が確認されています。このことは自分の内因性の Muse 細胞が心臓の修復に働いていることを示唆します。しかし、ご本人に基礎疾患があって Muse 細胞の活性が落ちていたり、動員数が足りない場合には、自分の内因性 Muse 細胞だけでは修復は追いつきません。ここに再生医療として健常なドナーから採取した活性の高い Muse 細胞を補充する意味があります。

今回の結果は、以下の 2 つのポイントが新しい成果です。

- 1) S1P-S1PR2 システムによって Muse 細胞は静脈投与によって傷害部位を特異的に認識することができること、そして組織に応じた細胞に自発的に分化をし、機能的な細胞となって組織の一員となって組み込まれ、修復をする。
- 2) HLA-G 発現などの特異な免疫調整作用を持ち、他家 Muse 細胞は自己 Muse 細胞とほぼ同等の治療効果を半年以上の長期間もたらすことができる。従って、ドナーの Muse 製剤を点滴で静脈投与すれば、心筋梗塞の修復再生治療が可能になる。

特に2に関してですが、自己の Muse 細胞しか使えない場合、心筋梗塞のような緊急を要する場合には実用がありません。しかし他家 Muse 製剤を準備しておけば、点滴で投与できるわけですので、緊急の現場においても十分に活用が可能となります。

再生医療には「夢はあるがコストと時間がかかるハードルの高い医療」というイメージがありますが、点滴で再生医療が可能になればどうでしょうか。一般普及をすることができ、さらには現在の医療を大きく変えることができます。何より、生体に備わる修復機構を最大限に活用する医療は安全性に優れ、「自然の理に叶った」治療を可能とします。自然の理にかなった細胞はうまく生体に適合できるでしょう。こうした、「修復再生治療」という全く新しい次世代の治療概念を提示することができます。

現在、(株)生命科学インスティテュートが他家 Muse 細胞製剤を用いて心筋梗塞患者への治験を開始しております。

6. 用語解説

- 1) 急性心筋梗塞: 心臓組織を栄養している血管が閉塞してしまうために心臓組織が死んでしまう病気。心室の心筋細胞が壊死に陥り脱落してしまうため心臓の収縮性が低下し心ポンプ機能が低下してしまう。
- 2) 左室リモデリング: 心筋梗塞が発症した後、左室の心筋細胞が壊死に陥り脱落してしまうため壊死心筋部の線維化により瘢痕化が進行し、左室壁厚が薄くなり、心臓容積は拡大してしまう。このことは心不全が発症する原因となる。
- 3) gap junction: ギャップ結合: 隣り合う上皮細胞をつなぎ、水溶性の小さいイオンや分子を通過させる細胞間結合のこと。並んだ二つの細胞の細胞膜にはコネクソンと呼ばれるタンパク複合体の末端が複数並んでおり、橋渡し構造をなしている。ギャップ結合は心筋細胞膜の受動的な電気特性を決定する重要な因子であり、その発現が少ない組織では興奮の伝播速度が遅くなり、不整脈が発生する原因となる。
- 4) 左室駆出率 (EF): 心拍ごとに心臓が送り出す血液量 (駆出量) を心臓が拡張したときに左室容積で除した値であり、心機能評価の指標のひとつ。正常値は 55 % 以上である。
- 5) 左室内径短縮率 (FS): 左室心筋収縮力の指標のひとつ。M モードエコー図を用い、左室拡張末期径と左室収縮末期径を計測し、両者の差を左室拡張末期径で除し、100 分率で表した値。正常値は 30-50 % である。
- 6) GCaMP3: GCaMP は緑色蛍光タンパク (EGFP)、カルモジュリン (CaM)、ミオシン軽鎖フラグメント (M13) を遺伝子工学的に結合させたカルシウムセンサータンパク質である。このタンパク質は EGFP の片側 (N 末端側) にカルモジュリンを、もう片側 (C 末端側) にはミオシン軽鎖 M13 フラグメントを結合した形をしている。カルシウムイオンがカルモジュリンと結合すると、Ca²⁺/CaM 複合体が M13 と相互作用して EGFP の立体構造を変化させ、蛍光強度が変化する。これを利用することによってカルシウム濃度の変化を GCaMP 蛍光強度の変化として検出することが出来る。

【主な研究者プロフィール】

湊口 信也(みなとぐち しんや)

岐阜大学大学院医学系研究科 再生医科学循環呼吸病態学

<略歴>

1983年 岐阜大学大学院医学研究科修了

1988年 岐阜大学医学部第二内科 助手

1989年 オーストラリア・メルボルン大学医学部留学

1990年 復職

1994年 岐阜大学医学部第二内科 講師

1997年 岐阜大学医学部第二内科 助教授

2002年 岐阜大学大学院医学系研究科 再生医科学循環呼吸病態学(第二内科)助教授

2006年 岐阜大学大学院医学系研究科 再生医科学循環呼吸病態学(第二内科)臨床教授
岐阜大学医学部附属病院第二内科 科長

2007年 岐阜大学大学院医学系研究科 再生医科学循環呼吸病態学(第二内科)教授



出澤 真理(でさわ まり)

東北大学大学院医学系研究科 細胞組織学分野 教授

<略歴>

1989年 千葉大学大学院医学部卒業

1995年 千葉大学大学院医学研究科博士課程修了

1995年 千葉大学医学部 助手

2000年 横浜市立大学医学部解剖学第一講座講師

2003年 京都大学大学院医学研究科助教授

2008年 東北大学大学院医学系研究科教授



【メディア等取材に関するお問い合わせ先】

- ・岐阜大学 総合企画部総務課広報室 担当：伊藤、佐藤

TEL：058-293-3377/2009 FAX：058-293-2021 MAIL：kohositu@gifu-u.ac.jp

- ・東北大学 大学院医学系研究科・医学部広報室 担当：稲田

TEL：022-717-7891 FAX：022-717-8187 MAIL：pr-office@med.tohoku.ac.jp

【臨床試験に関するお問い合わせ先】

- ・株式会社生命科学インスティテュート 総務・法務部 広報担当 TEL 03-6896-8743

- ・株式会社三菱ケミカルホールディングス 広報・IR室 TEL 03-6748-7140