

主論文の要旨

**Dental pulp-derived stem cell conditioned medium
reduces cardiac injury following ischemia-reperfusion**

〔 歯髓由来幹細胞の培養上清は虚血再灌流後の心傷害を減少させる 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導：日比 英晴 教授)

山口 聡

【背景】

心筋梗塞等の虚血性心疾患は全世界における主要な死因のひとつである。心筋梗塞に対し経皮的冠動脈形成術や薬物療法が行われるが、組織に不可逆的な傷害を生じることから、依然として予後不良例は多く致死率は高い。そのため、効果的な補助療法の開発が必要とされている。

近年、幹細胞の利用が新たな治療戦略として注目されている。様々な幹細胞の移植による治療効果が示されてきた一方で、臨床応用のためには細胞の大量培養を必要とし、移植細胞による造腫瘍性や免疫拒絶反応等が懸念されている。その中で、最近では幹細胞治療による治療効果の大部分が幹細胞から放出される様々なサイトカインによることが明らかとなり、幹細胞由来培養上清（CM）が病態改善効果をもたらすことが報告されている。

ヒト歯髄幹細胞（DPSCs）およびヒト脱落乳歯由来幹細胞（SHEDs）は歯髄の血管周囲に存在する、優れた増殖能と多分化能を示す間葉系幹細胞である。これまでにラット心筋梗塞モデルに対する DPSCs 移植の心機能改善効果が報告されている。近年われわれは SHEDs 移植および SHEDs 由来 CM（SHED-CM）投与が中枢神経損傷後の機能改善を促し、それらの治療効果が同等であることを報告してきた。このように SHED-CM は幹細胞移植に変わる新しい治療戦略を提供する可能性がある。しかしながら、虚血性心疾患に対する SHED-CM の治療効果は未だ明らかになっていない。

【目的】

本研究では心臓の急性虚血性傷害に対する SHED-CM の効果を検証した。また SHED-CM の培養心筋細胞に対する作用およびその機序を評価した。

【方法】

SHEDs は名古屋大学生命倫理委員会の承認のもと、インフォームド・コンセントを得られた患者の歯髄組織から採取した細胞を使用した。骨髄間葉系幹細胞（BMSC）、脂肪組織由来幹細胞（ADSC）は Lonza 社より購入した。各幹細胞 70～80%の細胞密度まで培養し、培地を無血清 DMEM へ交換した。48 時間後、培養上清を回収し遠心分離で細胞片を除去したものを SHED-CM、BMSC-CM、ADSC-CM として使用した。

C57BL/6J 雄性マウスの冠動脈を結紮し、30 分後に再灌流させることで心筋虚血再灌流傷害（I/R）モデルを作成した。再灌流 5 分後に SHED-CM500 μ L を頸静脈より投与した。コントロール群へは DMEM を投与した。I/R24 時間後にエバンスブルーおよび 2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライドを用いて左室域（LV）、危険域（AAR）、梗塞域（IA）を染色し、画像解析により IA/AAR、IA/LV を算出した。I/R24 時間後の血中トロポニン値を ELISA 法、虚血組織におけるアポトーシスを TUNEL 染色法、炎症性サイトカインの遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で評価した。また、I/R7 日後に心エコーにより収縮能を評価した。

in vitro の実験では、新生ラットより採取した心筋細胞を用いた。培地を SHED-CM、

BMSC-CM、ADSC-CM に交換した後、無血清状態で低酸素培養および正常酸素圧培養した。24 時間低酸素培養後および 48 時間正常酸素圧培養後に、アポトーシスを TUNEL 染色法、細胞生存率を WST-8 法でそれぞれ評価した。また培地を SHED-CM、BMSC-CM、ADSC-CM へ交換した後にリポポリサッカライド (LPS) で刺激し、6 時間後の炎症性サイトカインの遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で評価した。

SHED-CM、BMSC-CM、ADSC-CM のサイトカインアレイを RayBio G-series Human Cytokine Antibody Array 4000 kit (Ray Biotech 社) を用いて行った。

【結果】

SHED-CM の急性心筋虚血性傷害への効果をマウス I/R モデルで検討した。I/R24 時間後、SHED-CM 群の IA/AAR および IA/LV は、コントロール群と比較してそれぞれ 55.1%、55.9%低下し (図 1a, b)、血中トロポニン値は低下を認めた (図 1c)。I/R7 日後の心エコーでは、SHED-CM 群の左室内径短縮率の上昇を認めた (図 1d)。また、SHED-CM 群では虚血組織における TUNEL 陽性率が低下し (図 2a, b)、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-1 β (IL-1 β) の遺伝子発現が低下した (図 2c)。

ラット心筋細胞を用いて、SHED-CM の心筋細胞に対する直接的な作用を検討した。SHED-CM 群では 24 時間低酸素培養後および 48 時間正常酸素圧培養後の TUNEL 陽性率がそれぞれ 63.5%、38.2%低下し (図 3a, b)、細胞生存率の上昇を認めた (図 3c)。また、SHED-CM 群では LPS 誘導性の TNF- α 、IL-6、IL-1 β の mRNA 発現が濃度依存的に低下した (図 3d)。

細胞源の異なる幹細胞 CM の作用を *in vitro* で比較した結果、SHED-CM 群では BMSC-CM 群、ADSC-CM 群よりも 24 時間低酸素培養後の TUNEL 陽性率が低下した (図 4a)。さらに、SHED-CM 群では 48 時間正常酸素圧培養後の細胞生存率が上昇した一方、BMSC-CM 群と ADSC-CM 群では変化を認めなかった (図 4b)。LPS 誘導性の炎症性サイトカインの遺伝子発現抑制効果は 3 群で同等であった (図 4c)。これらの結果より、SHED-CM は心筋細胞のアポトーシスを BMSC-CM、ADSC-CM よりも効果的に抑制することが示された。

SHED-CM による強力な抗アポトーシス効果の機序を明らかにするため、サイトカイン抗体アレイによるスクリーニングを行った。SHED-CM、BMSC-CM、ADSC-CM は血管内皮増殖因子 (VEGF)、インスリン様増殖因子 1 (IGF-1)、肝細胞増殖因子 (HGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、ストロマ細胞由来因子 1 (SDF-1)、上皮細胞増殖因子 (EGF)、幹細胞因子 (SCF) を発現していた。注目すべきことに、HGF は SHED-CM において BMSC-CM、ADSC-CM よりも高発現であった (図 5a, b)。

SHED-CM の強力な抗アポトーシス作用への HGF の関与を検討した。抗 HGF 中和抗体で SHED-CM 中の HGF を抑制し培養心筋細胞に投与した結果、SHED-CM の抗アポトーシス作用と細胞生存率改善効果は減弱した (図 5c, d)。一方で LPS 誘導性の TNF- α 、IL-6、IL-1 β の発現は変化を認めなかった (図 5e)。さらに、マウス I/R モデル

ルにおける SHED-CM の心保護効果への HGF の関与を検討するために、免疫沈降法により HGF を特異的に除去した SHED-CM (HGF-depleted SHED-CM) を I/R5 分後に投与した。HGF の除去は、SHED-CM の心筋梗塞縮小効果を減弱し (図 5f)、虚血域の TUNEL 陽性細胞減少効果を減弱させた (図 5g)。以上から、HGF は SHED-CM による抗アポトーシス効果に関与することが明らかとなった。

【考察】

本研究では SHED-CM 投与による急性心筋傷害の病態改善効果を初めて報告した。SHED-CM はマウス I/R モデルにおいてアポトーシスと炎症反応の抑制により心筋梗塞を縮小し、心機能を改善した。また、SHED-CM は *in vitro* 実験において心筋細胞のアポトーシスを減少させ、炎症性サイトカインの産生を抑制した。

in vitro の実験における SHED-CM の炎症性メディエーター抑制効果は BMSC-CM、ADSC-CM と同程度であった。この結果から炎症制御による心保護効果は、各種幹細胞 CM において同等レベルであると考えられた。

心筋細胞のアポトーシスは虚血性心疾患における重要な病態であり、これを減少させることは意義があると考えられている。本研究において、SHED-CM は I/R 後のアポトーシスを減少させ、*in vitro* においても心筋細胞のアポトーシスを抑制した。以上から、SHED-CM による I/R 後の心筋梗塞縮小効果の少なくとも一部は、心筋細胞に対する直接的なアポトーシス抑制効果に依存していると考えられる。

HGF は当初、肝細胞の強力な分裂促進因子として同定されたが、心筋細胞をはじめあらゆる細胞に対し抗アポトーシス作用を持つことが知られている。これまでに、HGF 投与がアポトーシス抑制によりラット心筋梗塞の病態を改善し、一方 HGF 抑制が心筋細胞のアポトーシスを促進し心筋梗塞の病態を悪化させることが報告されている。本研究において、SHED-CM は BMSC-CM、ADSC-CM よりも高濃度の HGF を含有することが明らかとなった。さらに HGF の除去により SHED-CM の抗アポトーシス作用は *in vivo* と *in vitro* において減弱した。以上から、少なくとも SHED-CM は HGF を含むシグナル伝達経路を介して心筋細胞死を抑制し、虚血性傷害から心臓を保護すると考えられる。さらにサイトカインアレイ解析から、SHED-CM は HGF 以外にも多くの因子を含むことが明らかとなった。これらの因子の協調的な作用により SHED-CM は急性心筋傷害に対する心保護効果を発揮したと考えられた。

【結論】

本研究において、われわれは SHED-CM が心筋細胞の細胞死を減少させ、炎症反応を抑制するという少なくとも 2 つの機序により I/R 後の心筋傷害から心臓を保護することを示した。大型動物モデルを用いたさらなる検討が必要であるが、SHED-CM 投与は急性心筋梗塞に対する新たな治療戦略となりうると考えられる。