

200500168A

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

心筋組織再生のための集約的研究

(H17-再生-007)

平成 17 年度 総括研究報告書

主任研究者 小室 一成

平成 18 (2006) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告書	
心筋組織再生のための集約的研究-----	1
小室 一成	
II. 分担研究報告書	
1. 心筋幹細胞の分化誘導と不全心への移植に関する研究-----	5
永井 敏雄	
2. 心筋分化誘導因子の単離精製に関する研究-----	7
南野 徹	
3. 間葉系細胞の心筋分化誘導と不全心への移植に関する研究-----	8
梅澤 明弘	
4. 移植組織の血管新生についての研究-----	11
望月 直樹	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	13
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	18

研究要旨

骨髄間葉系細胞、心筋幹細胞を心筋細胞に分化誘導する因子と、血管新生を促進する因子の解明を目的とした本研究の初年度に、我々は、間葉系幹細胞のうち心筋易誘導細胞の細胞表面抗原を同定し、OP9 細胞から分泌される新規心筋分化誘導因子を単離した。また、心筋 SP 細胞を成熟した心筋細胞に *in vitro* で分化誘導させる因子を解明した。さらに、心筋虚血時には成体のヘマンジオブラスト様の細胞が発現し、血管新生にかかわることが明らかになった。

A. 研究目的

心不全・心筋梗塞の新しい治療法として再生治療が注目されている。現在、骨格筋芽細胞、骨髄細胞、内皮前駆細胞による細胞移植が臨床試験中であるが、臨床的に十分な数の心筋細胞と血管の両者を再生する方法は確立されていない。本研究では骨髄間葉系細胞、心筋幹細胞を心筋細胞に分化誘導する因子と、血管新生を促進する因子を単離精製し、非侵襲的な心血管分化誘導療法の確立を目的とする。

B. 研究方法

間葉系幹細胞

心筋易誘導細胞の抽出：心筋易誘導細胞に発現している抗原に対する抗体を用いて、心筋易誘導細胞の免疫染色、FACS による sorting を行った。

心筋誘導率の算定と機能評価：ガラス微小電極を用いた活動電位記録と、Video image 解析装置で細胞収縮速度、収縮持続時間、収縮長を測定する事によって定量的に評価した。

無血清培養システムの導入：間葉系幹細胞を用いて無血清培地による、心筋誘導率アッセイを試みた。

血管新生因子の同定：VE-cadherin/EGFP, Tie2/EGFP を作成して解析を行った。VE-cadherin/EGFP マウスの左冠状動脈を結紮して数日後から、骨髄での GFP 陽性細胞の出現の確認と、虚血部位での GFP 陽性細胞の確認をおこなった。また、VE-cadherin/EGFP マウスの GFP 陽性細胞を flow cytometry で採取して、GFP 陽性細胞の表面抗原特性を検討した。

心臓 SP 細胞：新生仔ラット心臓より SP 細胞を分取し、オキシトシンまたはトリコスタチン A により 72 時間処

理した。心筋細胞への分化は自律拍動の有無、および心筋転写因子、収縮蛋白の発現を PCR 法と免疫染色法で確認することにより行った。

OP9 培養上清中に存在する心筋細胞分化誘導因子の同定：signal sequence trap 法を用いて OP9 細胞から分泌される分子のクローニングを行い、その中から心筋細胞分化誘導活性をもつ蛋白の単離同定を試みた。

（倫理面への配慮）

ヒト細胞の培養に関しては、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療センター研究所、受付番号 25、26 及び 27、平成 15 年 1 月承認、受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 15 年 11 月承認、受付番号 88、89、90、91 平成 16 年 7 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認）。また、倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針（未定稿）」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮し研究を行った。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行っている。

実験動物を用いる研究については、千葉大学、国立循環器病センターおよび国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する（承認番号 2003-002, 2005-003）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこない、実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。

C. 研究結果

間葉系幹細胞

心筋易誘導細胞の抽出：心筋易誘導細胞に発現している抗原の発現は確認できたが、FACSによる検討では、対象抗原がトリプシン処理で消滅している可能性もあり、明瞭な分画は得られなかった。

心筋誘導率の算定と機能評価：誘導心筋細胞の細胞収縮速度、収縮持続時間、収縮長を数値化することで、より具体的な機能解析が可能となった。

無血清培養システムの導入：我々が開発した無血清培地により、間葉系幹細胞は血清が存在しているときと同程度か、さらに高頻度に心筋細胞に分化した。

血管新生因子の同定：Tie2/EGFP マウスは成体までEGFPを血管で発現するのに対して、VE-cad/EGFP マウスは生後5週目までに血管のEGFP陽性細胞が消失していた。VE-cadherin/EGFP マウス心筋梗塞モデルでは梗塞部位のCD45陽性細胞の30%近くがEGFPを発現した。このGFP陽性細胞の95%以上がCD45陽性細胞であり、また血管内皮に発現するCD31も半数で陽性であった。したがって、心筋梗塞部位、流血中もしくは骨髄のGFP陽性細胞は、血球と内皮細胞両者の性格をもつヘマンジオブラストである可能性が示唆された。

心臓SP細胞：心臓SP細胞はオキシトシンまたはトリコスタチンAで72時間分化誘導した後に3週間培養したところ、自律拍動する心筋細胞を認めた。分化誘導した心筋SP細胞は心筋転写因子や心筋収縮蛋白の発現を認めた。

OP9培養上清中に存在する心筋細胞分化誘導因子の同定：signal sequence trap法を用いて得られたいくつかの分子の中で、ある分泌蛋白(X因子)がES細胞やP19細胞の心筋細胞への分化を著明に亢進することが明らかになった。

D. 考察

我々は、心筋易誘導性を示す細胞に特徴的な膜貫通蛋白に着目し、これらに対する抗体作成に成功したが、これらは細胞単離時に使用するトリプシン処理にて簡単に消滅する可能性が高く、そのため既知のCDマーカーではない可能性が高い。この細胞外ドメインの抗原性を失う事無く細胞単離する方法を考案すれば、この抗体を用いて心筋易誘導細胞のみを抽出濃縮し、心筋誘導率を改善する事が出来る。

虚血によって炎症細胞として虚血部位に浸潤する細胞がVE-cadherinのプロモーターが活性化された細胞であり、様々なサイトカインを分泌する可能性を持つ

たangiogenesis-stimulating cytokine-producing細胞としての機能が予想された。また、心筋梗塞部位の毛細血管ならびに梗塞巣周囲の健常部の小動脈内皮細胞でも、GFPの発現を認めた。虚血によりどのように、骨髄からのGFP陽性細胞の動員が起きるのかは未解決であるが、おそらく局所での虚血シグナルによる血中のサイトカインの上昇が骨髄に伝達され、流血中のCD45陽性細胞かつVE-cadherin陽性細胞が、局所で発現されるVE-cadherinとの接着により積極的に虚血部位である心臓へと集積するのではないかと予想した。

心臓SP細胞は心筋細胞、骨、脂肪へ分化可能な多能性を有した心臓幹細胞分画であることが明らかになった。オキシトシンやトリコスタチンAの作用の詳細な分子機序はまだ不明であるが、SP細胞はヒトを含めた種々の臓器に存在する幹細胞分画であり、心臓においても成熟した心筋細胞に分化可能な幹細胞分画としてSP細胞が存在することを明らかにした今回の結果は重要である。

X因子は新たな心筋分化誘導因子であることが明らかになったが、今後ES細胞、骨髄幹細胞、心臓組織幹細胞などを用いた高効率心筋分化誘導法の確立を目指す。また、X因子が心筋細胞誘導をおこすメカニズムについても現時点では不明であり、今後検討する必要がある。

E. 結論

心臓分野での幹細胞治療に自己骨髄細胞がすでに使用されているが、現在の培養方法では心筋への分化効率はほとんど無いに等しい。しかし、骨髄以外の組織由来のヒト間葉系幹細胞では、高い心筋分化能力を有している。心筋虚血により浸潤するCD45陽性細胞は一部VE-cadherinを発現し、血管内皮細胞と血球系の両方の性格を持つ細胞系であった。実際一つの細胞が両方の性格を有することから、成体のヘマンジオブラスト様の細胞が血管新生にかかわる可能性が考えられた。心筋SP細胞は心筋細胞にin vitroで分化誘導可能であり、心筋幹/前駆細胞を含む分画である。OP9細胞から分泌されるX因子は心筋細胞分化誘導活性を持つ。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

・Naito, A.T., Akazawa, H., Takano, H., Minamino,

- T., Nagai, T., Aburatani, H., Komuro, I.
Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway Plays a Critical Role in Early Cardiomyogenesis by Regulating Canonical Wnt Signaling. *Circ Res* 97:144-151, 2005.
- Ohtsu, Y., Johkura, K., Ito, K., Akashima, T., Asanuma, K., Ogiwara, N., Oka, T., Komuro, I., Sasaki, K., Amano, J. Stimulation of P19CL6 with multiple reagents induces pulsating particles in vivo. *Curr Med Res Opin* 21:795-803, 2005.
 - Nagai, T., Shiojima, I., Matsuura, K., Komuro, I. Promotion of cardiac regeneration by cardiac stem cells. *Circ Res* 97:615-617, 2005.
 - Sakurai A, Fukuhara S, Yamagishi A, Sako K, Kamioka Y, Masuda M, Nakaoka Y, Mochizuki N. MAGI-1 is required for Rap1 activation upon cell-cell contact and for enhancement of VE-cadherin-mediated cell adhesion. *Mol. Biol. Cell* (in press), 2005.
 - Somekawa S, Fukuhara S, Fujita H, Masuda M, Saito Y, Mochizuki N. Enhanced functional Gap junction neofunction by PKA-dependent and Epac-Rap1-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 92:655-662, 2005.
 - Cho CH, Kim KE, Byun J, Jang HS, Kim DK, Baluk P, Baffert F, Lee GM, Mochizuki N, Kim J, Jeon BH, McDonald DM, Koh GY. Long-term and sustained COMP-Ang1 induces long-lasting vascular enlargement and enhanced blood flow. *Circ Res.* 97 : 86-94, 2005.
 - Maeng YS, Min JK, Kim JH, Yamagishi A, Mochizuki N, Kwon JY, Park YW, Kim YM, Kwon YG. ERK is an anti-inflammatory signal that suppresses expression of NF-kappaB-dependent inflammatory genes by inhibiting IKK activity in endothelial cells. *Cell Signal* (in press) 2005.
 - Fujita H, Fukuhara S, Sakurai A, Yamagishi A, Kamioka Y, Nakaoka Y, Masuda M, Mochizuki N. Local activation of Rap1 contributes to directional vascular endothelial cell migration accompanied by extension of microtubules on which RAP1, a Rap1-associating molecule, localizes. *J. Biol Chem.* 280: 5022-5031, 2005
 - Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, Saito Y, Kangawa K, Mochizuki N. Cyclic AMP potentiates VE-cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through Epac-Rap1 signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 25: 136-146, 2005.
 - Fukuhara Y, Li XK, Kitazawa Y, Inagaki M, Matsuoka K, Kosuga M, Kosaki R, Shimazaki T, Endo H, Umezawa A, Okano H, Takahashi T, Okuyama T. Histopathological and Behavioral Improvement of Murine Mucopolysaccharidosis Type VII by Intracerebral Transplantation of Neural Stem Cells. *Mol Ther*, in press.
 - Lu FZ, Fujino M, Kitazawa Y, Uyama T, Hara Y, Funeshima N, Jiang JY, Umezawa A, Li XK. Characterization and gene transfer in mesenchymal stem cells derived from human umbilical-cord blood. *J Lab Clin Med.* ;146(5):271-8, 2005.
 - Matsushita K, Iwanaga S, Oda T, Kimura K, Shimada M, Sano M, Umezawa A, Hata J, Ogawa S. Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis. *Lab Invest.* 85(10):1210-23; 2005.
 - Matsumoto S, Shibuya I, Kusakari S, Segawa K, Uyama T, Shimada A, Umezawa A. Membranous osteogenesis system modeled with KUSA-A1 mature osteoblasts. *Biochim Biophys Acta.* 1725(1):57-63, 2005.
 - Mori T, Kiyono T, Imabayashi H, Takeda Y, Tsuchiya K, Miyoshi S, Makino H, Matsumoto K, Saito H, Ogawa S, Sakamoto M, Hata J, Umezawa A. Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential. *Mol Cell Biol.* 25(12):5183-95, 2005.
 - Katagiri YU, Kiyokawa N, Nakamura K, Takenouchi H, Taguchi T, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J. Laminin binding protein, 34/67 laminin receptor, carries stage-specific embryonic antigen-4 epitope defined by monoclonal antibody Raft.2. *Biochem Biophys Res Commun* ;332(4):1004-11, 2005.
 - Higuchi A, Shindo Y, Gomei Y, Mori T, Uyama T, Umezawa A. Cell separation between mesenchymal progenitor cells through porous polymeric membranes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* ;74(1):511-9, 2005.

・ Kuroda M, Oikawa K, Yoshida K, Takeuchi A, Takeuchi M, Usui M, Umezawa A, Mukai K. Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL. Cancer Lett. 221(1):21-8, 2005.

・ Kawashima N, Shindo K, Sakamoto K, Kondo H, Umezawa A, Kasugai S, Perbal B, Suda H, Takagi M, Katsube K. Molecular and cell biological properties of mouse osteogenic mesenchymal progenitor cells, Kusa. J Bone Miner Metab.;23(2):123-33, 2005.

・ Terai M, Uyama T, Sugiki T, Li XK, Umezawa A, Kiyono T. Immortalization of human fetal cells: the life span of umbilical cord blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway. Mol Biol Cell.;16(3):1491-9, 2005.

2. 学会発表

・ 小室一成：平成 17 年度 21 世紀 COE セミナー「循環器疾患に対する再生医療の現状と課題」平成 17 年 8 月 5 日、京都。

・ 小室一成：千葉県地域結集型共同研究事業 第 7 回地域結集セミナー「血管再生医療の新たな展開」平成 17 年 8 月 24 日、千葉。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許取得

「心筋細胞への分化能を有する細胞」

発明者：梅澤明弘、三好俊一郎、小川聡

出願日：PCT/JP2006/301043 平成 18 年 1 月 25 日

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

2. 実用新案登録 該当なし

3. その他 該当なし

研究要旨

近年、成体の心筋にも心筋へ分化しうる幹/前駆細胞が存在することが報告されている。我々はマウス心筋 Sca-1 陽性細胞が心筋幹/前駆細胞を含む分画であることを報告したが、Sca-1 はマウスに特異的な抗原である。そこで、我々は色素排泄能を指標とした幹細胞分画である side population (SP) 細胞に着目し、心筋 SP 細胞の単離、分化誘導因子の探索、in vivo における役割について検討した。本年度の研究において、心臓 SP 細胞の単離と心筋分化誘導に成功した。

A. 研究目的

近年、成体の心筋にも心筋幹/前駆細胞が存在することが報告されているが、その分化のメカニズム、in vivo での動態は明らかではない。また、細胞移植療法に加えて、このような心筋幹細胞を心筋へ分化する因子を解明することは、移植療法の効率を高めるためにも重要である。本研究における分担研究者の目的は、ヒトからも採取可能な幹細胞分画である心筋 side population 細胞を単離し、分化誘導因子の探索、in vivo における役割について解明することである。本研究は細胞移植を基盤とした心筋再生療法の開発につながり、国民の福利厚生に寄与するものと考えられる。

B. 研究方法

新生仔ラット心臓より酵素消化法により細胞を単離し、ヘキスト 33342 により染色した後に flow cytometry を行い色素染色性の低い SP 細胞を得た。心臓 SP 細胞は細胞培養皿に培養し、オキシトシンまたはトリコスタチン A により 72 時間処理した。心筋細胞への分化は自律拍動の有無、および心筋転写因子、収縮蛋白の発現を PCR 法と免疫染色法で確認することにより行った。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、千葉大学動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

心臓 SP 分画は全細胞の 1-2% であり、verapamil 前処理により SP 分画が消失すること、Bcrp1 遺伝子および蛋白が発現していることより、SP 細胞であることを確認した。オキシトシンまたはトリコスタチン A により 72 時間培養した後、3 週間後に自律拍動する心筋細胞を認めた。分化誘導した心筋 SP 細胞は心筋転写因子である Nkx2.5, GATA4, MEF-2C や心筋収縮蛋白である β -MHC, MLC-2v の遺伝子発現を認め、免疫染色でも GATA4 や心筋収縮蛋白の発現、緻密なサルコメア構造を認めた。心臓の非 SP 細胞分画は同様の処置により心筋細胞に分化しなかった。心臓 SP 細胞は骨、脂肪への分化誘導条件でそれぞれ骨細胞、脂肪細胞へ分化した。

D. 考察

今年度の研究より、心臓 SP 細胞は心筋細胞、骨、脂肪へ分化可能な多能性を有した心臓幹細胞分画である

ことが明らかになった。オキシトシンやトリコスタチン A の作用の詳細な分子機序はまだ不明であるが、SP 細胞はヒトを含めた種々の臓器に存在する幹細胞分画であり、心臓においても成熟した心筋細胞に分化可能な幹細胞分画として SP 細胞が存在することを明らかにした今回の結果は重要である。次年度は、分化の分子機序、in vivo での動態、役割についてさらに検討していく予定である。

E. 結論

心筋 SP 細胞は心筋幹/前駆細胞を含む分画である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

研究要旨

細胞移植を基盤とした心筋再生療法を確立するためには、分化多能性をもつ細胞を心筋細胞へ効率よく分化誘導させる技術の開発が必須である。分担研究者らは OP9 細胞の培養上精中に心筋分化誘導活性があることを見いだしていたが、本年度の研究において OP9 細胞由来の心筋分化誘導因子の単離に成功した。

A. 研究目的

近年、心筋細胞へ分化しうる幹細胞を用いた心筋再生治療が注目されているが、臨床的に十分な数の心筋細胞を分化誘導する方法は確立されていない。本研究における分担研究者の目的は、分化多能性をもつ細胞を心筋細胞に分化誘導する因子の単離精製である。本研究は細胞移植を基盤とした心筋再生療法の開発につながり、国民の福利厚生に寄与するものと考えられる。

B. 研究方法

これまでに我々は骨髄間葉系細胞 OP9 の培養上精中に、ES 細胞を心筋細胞へ分化誘導させる活性があることを明らかにしてきた。そこで signal sequence trap 法を用いて OP9 細胞から分泌される分子のクローニングを行い、その中から心筋細胞分化誘導活性をもつ蛋白の単離同定を試みた。

（倫理面への配慮）

本研究は培養細胞を用いたものであり、特に倫理面での問題はないと考える。

C. 研究結果

signal sequence trap 法を用いて得られたいくつかの分子のうちある分泌蛋白（X 因子）が ES 細胞や P19 細胞の心筋細胞への分化を著明に亢進することが明らかになった。

D. 考察

今年度の研究により X 因子は新たな心筋分化誘導因子であることが明らかになった。今後さらに条件検討を行うことにより、ES 細胞、骨髄幹細胞、心臓組織幹細胞などを用いた高効率心筋分化誘導法の確立を目指す。また、X 因子が心筋細胞誘導をおこすメカニズムについても現時点では不明であり、今後検討する必要がある。

E. 結論

OP9 細胞から分泌される X 因子は心筋細胞分化誘導活性を持つ

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

間葉系細胞の心筋分化誘導と不全心への移植に関する研究

分担研究者 梅澤明弘 国立成育医療センター研究所・部長

研究要旨

成体内のさまざまな臓器由来の間葉系幹細胞株を確立し、細胞寿命の延長に関わる遺伝子を導入して細胞の増殖能の増加、寿命の延長を検討した。また、骨髄間葉系細胞を効率よく心筋細胞に分化させる因子を網羅的に分析し、高い心筋分化効率を有する間葉系幹細胞株にのみ強発現している遺伝子を MicroArray 法により同定し、間葉系幹細胞から心筋細胞に分化しやすい細胞を選択する方法の確立を試みた。精製した心筋誘導因子により心筋細胞に分化させた骨髄間葉系細胞や、心筋誘導因子の遺伝子導入を行った骨髄間葉系細胞の傷害心筋への *in vivo* 移植実験を行い、心筋細胞補充法の基盤の確立を目指す。

A. 研究目的

間葉系幹細胞が心筋へ分化可能な事が知られているが、その分化誘導因子は未だ同定されていない。我々の開発したヒト幹細胞 *in vitro* 心筋誘導率アッセイシステム（特許PCT/JP2006/301043）を用い、間葉系細胞培養時の条件や *ex vivo* での薬剤投与による心筋誘導率の変化を観察することにより、ヒト間葉系幹細胞の心筋誘導率改善因子の同定を試みた。また、心筋分化に必要な液性因子のみならず、物理刺激、至適培養条件、培地の無血清化がその細胞分化・発現遺伝子にどのような影響を与え、また、マーカーとなる細胞表面タンパク等も合わせて検討を行った。

B. 研究方法

心筋易誘導細胞の抽出

心筋易誘導細胞に発現している抗原に対する抗体を用いて、心筋易誘導細胞の免疫染色を行った。また、雑多な幹細胞の集団である骨髄および胎盤間葉系幹細胞初代培養を酵素反応により単離し、FACSにより抗原陽性細胞が抽出できるか否かを検討した。

心筋誘導率の算定と機能評価：

心筋誘導率は、誘導率が低い場合は目視によって確認可能であるが、誘導率が20%以上となると目視で正確に評価する事が困難となる。そのため、共培養1週間後に単離し、心筋特異的な Cardiac Troponin-I を用いて免疫染色を行い、GFP 陽性のヒト細胞中の Troponin-I 陽性細胞率を心筋誘導率として評価を行った。

無血清培養システムの導入：

心筋誘導因子の同定を行う際に、培養液中に含まれる血清が結果の評価を曖昧なものとする可能性を排除するため、無血清培地を用いた *in vivo* 誘導率アッセイを試みた。

（倫理面への配慮）

当研究所においては、ヒト細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療センター研究所、受付番号25、26及び27、平成15年1月承認、受付番号49、平成15年10月承認、受付番号55、平成15年11月承認、受付番号88、89、90、91平成16年7月承認、受付番号55、平成16年11月追加承認、受付番号146、平成17年4月承認、受付番号156、平成17年7月承認）。また、倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針（未定稿）」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮し研究を行った。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないよう、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行っている。

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する（承認番号2003-002, 2005-003）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこない、実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。

C. 研究結果

心筋易誘導細胞の抽出

心筋易誘導細胞に発現している抗原が、確かにこれらの細胞に発現している事が明らかになった。しかしながら、FACSによる検討は、対象抗原がトリプシン処理で消滅している可能性もあり、明瞭な分画は得られていない。今後は酵素反応なしで細胞を剥離する事が出来る温度感受性培養皿や、低濃度の Collagenase、papain などを利用した細胞単離方法を実践し、抗原性を確保したまま、単離条件設定を目指す。

心筋誘導率の算定と機能評価:

誘導された心筋細胞の機能評価は、ガラス微小電極を用いた活動電位記録と、我々が独自に開発した Video image 解析装置で細胞収縮速度、収縮持続時間、収縮長を測定する事によって定量的に評価した。その結果、ヒト細胞コロニーについて、それらの細胞収縮速度、収縮持続時間、収縮長を数値化することで、より具体的な機能解析が可能となった。

無血清培養システムの導入:

我々は心筋代謝を考慮した独自の無血清培地の開発に成功しており、本培地により無血清でありながら、血清が存在しているときと同程度か、さらに強い心筋誘導を確認した。今後は無血清培地を用いたインビトロ誘導率アッセイシステムの有効性に関する基礎研究を行い、その科学的な根拠をもとに、徐々に本研究の完全な無血清化を視野に入れる。

D. 考察

Polyclonal な間葉系幹細胞の集団よりも(25-30%)、限界希釈法で monoclonal 化した幹細胞の心筋誘導率が高い(60-90%)。初代培養細胞の雑多な幹細胞中に、心筋易誘導性を示す細胞が一定比率混入している事を推測させる。我々はすでに確立した 30 近くのヒト間葉系幹細胞の MicroArray のデータから、心筋易誘導性を示す細胞に特徴的な膜貫通蛋白に着目し、これらに対する抗体作成に成功している。これらは細胞単離時に使用するトリプシン処理にて簡単に消滅する可能性が高く、そのため既知の CD マーカーではない可能性が高い。この細胞外ドメインの抗原性を失う事無く細胞単離する方法を考案すれば、この抗体を用いて心筋易誘導細胞のみを抽出濃縮し、心筋誘導率を改善する事が出来る。

E. 結論

我々の有している間葉系幹細胞株のほとんどが

CD59 を発現しており、免疫学的寛容が成立しやすいと考えられるが、人体に応用する場合免疫抑制剤の使用が必要かもしれない。心臓分野での幹細胞治療に自己骨髄細胞がすでに使用されているが、現在の培養方法では心筋への分化効率はほとんど無いに等しい。しかしながら、骨髄以外の組織由来のヒト間葉系幹細胞では、高い心筋分化能力を有している事から、培養法の違いがその心筋分化効率に与える影響は決して小さくない。我々はそれらの因子を詳細に検討し、循環器領域の再生医療研究に寄与していきたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Fukuhara Y, Li XK, Kitazawa Y, Inagaki M, Matsuoka K, Kosuga M, Kosaki R, Shimazaki T, Endo H, Umezawa A, Okano H, Takahashi T, Okuyama T. Histopathological and Behavioral Improvement of Murine Mucopolysaccharidosis Type VII by Intracerebral Transplantation of Neural Stem Cells. Mol Ther, in press.

Lu FZ, Fujino M, Kitazawa Y, Uyama T, Hara Y, Funeshima N, Jiang JY, Umezawa A, Li XK. Characterization and gene transfer in mesenchymal stem cells derived from human umbilical-cord blood. J Lab Clin Med.;146(5):271-8, 2005.

Matsushita K, Iwanaga S, Oda T, Kimura K, Shimada M, Sano M, Umezawa A, Hata J, Ogawa S. Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis. Lab Invest. 85(10):1210-23; 2005.

Matsumoto S, Shibuya I, Kusakari S, Segawa K, Uyama T, Shimada A, Umezawa A. Membranous osteogenesis system modeled with KUSA-A1 mature osteoblasts. Biochim Biophys Acta. 1725(1):57-63, 2005.

Mori T, Kiyono T, Imabayashi H, Takeda Y, Tsuchiya K, Miyoshi S, Makino H, Matsumoto K, Saito H, Ogawa S, Sakamoto M, Hata J, Umezawa A. Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential. Mol Cell Biol. 25(12):5183-95, 2005

Katagiri YU, Kiyokawa N, Nakamura K, Takenouchi H, Taguchi T, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J. Laminin binding protein, 34/67 laminin receptor, carries stage-specific embryonic antigen-4 epitope defined by monoclonal antibody Raft. 2. Biochem Biophys Res Commun ;332(4):1004-11, 2005.

Higuchi A, Shindo Y, Gomei Y, Mori T, Uyama T, Umezawa A. Cell separation between mesenchymal progenitor cells through porous polymeric membranes. J Biomed Mater Res B Appl Biomater ;74(1):511-9, 2005.

Kuroda M, Oikawa K, Yoshida K, Takeuchi A, Takeuchi M, Usui M, Umezawa A, Mukai K. Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL. Cancer Lett. 221(1):21-8, 2005.

Kawashima N, Shindo K, Sakamoto K, Kondo H, Umezawa A, Kasugai S, Perbal B, Suda H, Takagi M, Katsube K. Molecular and cell biological properties of mouse osteogenic mesenchymal progenitor cells, Kusa. J Bone Miner Metab. ;23(2):123-33, 2005.

Terai M, Uyama T, Sugiki T, Li XK, Umezawa A, Kiyono T. Immortalization of human fetal cells: the life span of umbilical cord blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway. Mol Biol Cell. ;16(3):1491-9, 2005

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「心筋細胞への分化能を有する細胞」

発明者：梅澤明弘、三好俊一郎、小川聡

出願日：PCT/JP2006/301043 平成18年1月25日

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

移植組織の血管新生についての研究一

分担研究者 望月直樹 国立循環器病センター研究所循環器形態部 部長

研究要旨 虚血性心疾患では虚血部位への新生血管構築を期待し、心筋細胞の保護のための細胞治療が期待されている。生体内でも血管を自己修復・新生する機構が存在している。しかし、どの細胞あるいはどのようなメカニズムで血管新生を調節しているのかは不明である。本研究では生体内の血管新生担当細胞を同定し、さらにこれらの細胞を増加させるような治療法を目指している。血管内皮細胞前駆細胞といった骨髄由来の細胞の一部が新生血管の一部を構成することから、内皮細胞のマーカーであるVE-cadherinのプロモーター活性依存性に生体内で、green fluorescent protein (GFP)を発現するマウスを作製して、血管新生にかかわる細胞の同定を試みた。

A. 研究目的

心臓の再生には心筋細胞への酸素、グルコース、脂肪酸などのエネルギーの供給のために血管が不可欠である。現在、虚血性心疾患の増加によりこれに対する治療方法と予防方法の確立は急務である。移植治療しか術のない重症虚血性心筋症では、心筋の再生を促すしか治療法は無いと考えられている。本分担研究では、心筋再生を障害なく、また、効率よくするための血管新生についてそのメカニズムを詳細に検討して、如何にして新生血管を再生心筋に役立てるかを具現化することを目標にしている。

B. 研究方法

Vascular endothelial cadherin (VE-cadherin)プロモーター活性によりGFPを発現するマウスの作製

新生血管の構築にかかわる細胞として骨髄由来もしくは虚血部以外から動員される細胞として血管内皮細胞前駆細胞(EPC)がこれまで盛んに提唱されてきたが、生体内での実体は不明のままであった。また、どれだけこの前駆細胞が血管を本当に形作る細胞として新生血管に取り込まれるかも未解決であった。EPCは血管内皮細胞としての機能するため、血管内皮細胞のマーカーとして繁用されているVE-cadherinとTie2のプロモーター活性依存的にGFPを発現するマウスを作製して、これらの細胞が虚血によりどのような部位で発現してくるかを検討した。VE-cadherinプロモーターにCreを発現するマウス、Tie2プロモーターの下流でCreを発現するマウスと、Enhanced GFPをCreが働くと発現するマウスを交配し、それぞれVE-cadherin/EGFP, Tie2/EGFPとして解析を行った。

虚血(心筋梗塞モデル)でのEGFP発現細胞の同定

VE-cadherin/EGFPマウスの左冠状動脈を結紮して、数日後から骨髄でのGFP陽性細胞の出現の確認と、虚血部位でのGFP陽性細胞の確認をおこなった。

VE-cadherin 依存性GFP発現マウスの骨髄ならびに末梢血液のGFP陽性細胞のFACS解析
VE-cadherin/EGFPマウスのGFP陽性細胞をflow cytometryで採取して、以下の表面抗原を認識する抗体を用いてGFP陽性細胞の表面抗原特性を検討した。(VE-cadherin, CD34, Lin, CD45, CD45, CD31)。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、国立循環器病センター実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

VE-cadherin/EGFPマウスとTie2/EGFPマウスの相違

Tie2/EGFPマウスは成体までEGFPを血管で発現するのに対して、VE-cad/EGFPマウスは生後直ちにEGFPの発現が減弱し、5週目までに血管のEGFP陽性細胞が消失していた。どちらのマウスも発生時期の血管ではEGFPを強く発現することから、血管構築にかかわる細胞でVE-cadherin, Tie2ともにプロモーターが活性化することがわかった。しかし、特徴的なのはVE-cadherin/EGFPマウスは虚血に伴い、再度骨髄にEGFP陽性細胞が出現したことである。さらに詳細に心臓組織を検討した。

心筋梗塞部位の炎症細胞と毛細血管でのVE-cadherin/EGFP細胞の出現

心筋梗塞では梗塞部位に著名な炎症細胞が浸潤するが、殆どがCD45陽性であり、このなかの30%近くがEGFPを発現していた。すなわち血球系細胞でありながらVE-cadherinプロモーターが活性化されるという血球・内皮細胞の両方の性格をもつ成人のヘマンジオブラストである可能性も考えられた。

おける
骨髄・末梢血液にVE-cadherin/EGFP細胞の虚血による再出現

VE-cadherin/EGFPマウスは生後GFP発現細胞が消失するが、心筋梗塞で再出現してきた。この細胞はFACS解析によると95%以上がCD45陽性細胞であり、また血管内皮に出現するCD31も半数で陽性であった。したがって、流血中もしくは骨髄でGFP陽性細胞となったものが、血球かつ内皮細胞の二つの系統の性格をもつ細胞である可能性が示唆された。

また、骨髄のCD45陽性細胞が本当にVE-cadherinを発現しているかを定量的RT-PCRでVE-cadherin mRNAを用いて確認したところ虚血によりVE-cadherin mRNAが顕著に増加していることを確認した。

D. 考察

虚血によって炎症細胞として虚血部位に浸潤する細胞がVE-cadherinのプロモーターが活性化された細胞であり、かつCD45陽性であった。新生血管の内皮細胞として働くというよりも、炎症細胞として様々なサイトカインを分泌する可能性をもったangiogenesis-stimulating cytokine-producing 細胞としての機能が予想された。

今後、虚血によって末梢血液もしくは骨髄に出現するGFP陽性細胞を集め、サイトカインの分泌を起こしているのかを確認する必要がある。また、虚血部位でなければ分泌しない可能性もあるので虚血部位に浸潤しているGFP陽性細胞がサイトカイン陽性であることを、in situで調べる必要がある。

浸潤細胞でのVE-cadherin依存性のGFP発現とともに、心筋梗塞部位の毛細血管ならびに梗塞巣周囲の健常部の小動脈内皮細胞でも、GFPの発現を認めた。生後一度、VE-cadherinのプロモーター活性は低下するが、虚血によって再度、血管でのVE-cadherinプロモーターの活性化が起きていることを示す結果である。実際、虚血部位で抗VE-cadherin抗体を用いた免疫組織学的研究でもVE-cadherinの再出現を確認しており、VE-cadherin promoterの活性化とVE-cadherinの発現が一致しているという結果である。

虚血によりどのように、骨髄からのGFP陽性細胞の動員が起きるのかは未解決であるが、おそらく局所での虚血シグナルによる血中のサイトカインの上昇が骨髄に伝達され、流血中のCD45陽性細胞かつVE-cadherin陽性細胞が、局所で発現されるVE-cadherinとの接着により積極的に虚血部位である心臓へと集積するのではないかと予想した。

E. 健康危険情報

なし。

F. 結論

心筋虚血により浸潤するCD45陽性細胞は一部VE-cadherinを発現し、血管内皮細胞と血球系の両方の性格を持つ細胞系であった。実際一つの細胞が両方の性格を有することから、成人のヘマン

ジオブラスト様の細胞が血管新生にかかわる可能性が考えられた。

G. 研究発表

(研究業績「英文」)

【原著】

- ① Sakurai A, Fukuhara S, Yamagishi A, Sako K, Kamioka Y, Masuda M, Nakaoka Y, Mochizuki N. MAGI-1 is required for Rap1 activation upon cell-cell contact and for enhancement of VE-cadherin-mediated cell adhesion. *Mol. Biol. Cell* (in press), 2005
- ② Somekawa S, Fukuhara S, Fujita H, Masuda M, Saito Y, Mochizuki N. Enhanced functional Gap junction neofunction by PKA-dependent and Epac-Rap1-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 92:655-662, 2005
- ③ Cho CH, Kim KE, Byun J, Jang HS, Kim DK, Baluk P, Baffert F, Lee GM, Mochizuki N., Kim J, Jeon BH, McDonald DM, Koh GY. Long-term and sustained COMP-Ang1 induces long-lasting vascular enlargement and enhanced blood flow. *Circ Res.* 97: 86-94, 2005
- ④ Maeng YS, Min JK, Kim JH, Yamagishi A, Mochizuki N., Kwon JY, Park YW, Kim YM, Kwon YG. ERK is an anti-inflammatory signal that suppresses expression of NF-kappaB-dependent inflammatory genes by inhibiting IKK activity in endothelial cells. *Cell Signal* (in press) 2005
- ⑤ Fujita H, Fukuhara S, Sakurai A, Yamagishi A, Kamioka Y, Nakaoka Y, Masuda M, Mochizuki N. Local activation of Rap1 contributes to directional vascular endothelial cell migration accompanied by extension of microtubules on which RAP1, a Rap1-associating molecule, localizes. *J. Biol. Chem.* 280: 5022-5031, 2005
- ⑥ Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, Saito Y, Kangawa K, Mochizuki N. Cyclic AMP potentiates VE-cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through Epac-Rap1 signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 25: 136-146, 2005

2. 学会発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Harada M, Komuro I, et al.	G-CSF prevents cardiac Remodeling after myocardial infarction by activating Jak/Stat in cardiomyocytes	Nat Med	11	305-311	2005
Naito AT, Komuro I, et al.	Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway Plays a Critical Role in Early Cardiomyogenesis by Regulating Canonical Wnt Signaling.	Circ Res	97	144-151	2005
Hasegawa R, Komuro I, et al.	Effect of mental stress on coronary flow velocity reserve in healthy men.	Am J Cardiol	96	137-140	2005
Akazawa H, Komuro I, et al.	Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases.	Pharmacol Ther	107	252-268	2005
Saegusa N, Komuro I, et al.	Kir6.2-deficient mice are susceptible to stimulated ANP secretion: K(ATP) channel acts as a negative feedback mechanism?	Cardiovasc Res	67	60-68	2005
Yokoyama M, Komuro I, et al.	Plasma low-density lipoprotein reduction and structural effects on coronary atherosclerotic plaques by atorvastatin as clinically assessed with intravascular ultrasound radio-frequency signal analysis: a randomized prospective study.	Am Heart J	150	287 e1-e7	2005
Urano A, Komuro I, et al.	Infertility with defective spermiogenesis in mice lacking AF5q31, the target of chromosomal translocation in human infant leukemia.	Mol Cell Biol	25	6834-6845	2005

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Daimon M, Komuro I, et al.	Physiologic assessment of coronary artery stenosis without stress tests: noninvasive analysis of phasic flow characteristics by transthoracic Doppler echocardiography.	J Am Soc Echocardiogr	18	949-955	2005
Nagai T, Komuro I, et al.	Promotion of cardiac regeneration by cardiac stem cells.	Circ Res	97	615-617	2005
Ueda M, Komuro I, et al.	Pulmonary vein morphology before and after segmental isolation in patients with atrial fibrillation.	Pacing Clin Electrophysiol	28	944-953	2005
Funabashi N, Komuro I, et al.	Large collateral conus branch to the left anterior descending branch of the coronary artery in a subject with angina pectoris demonstrated by multislice computed tomography.	Int J Cardiol	103	105-106	2005
Niitsuma Y, Komuro I, et al.	Atherosclerotic right internal thoracic arterial aneurysm demonstrated by multislice computed tomography.	Int J Cardiol	106	270-272	2006
Funabashi N, Komuro I, et al.	Patency of gastroepiploic arterial graft to left circumflex branch with distal portion of the anastomotic site demonstrated by multislice computed tomography.	Int J Cardiol	107	130-131	2006

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Somekawa S, Fukuhara S, Fujita H, Masuda M, Saito Y, Mochizuki N.	Enhanced functional Gap junction neofunction by PKA-dependent and Epac-Rap1-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes.	Circ. Res.	92	655-662	2005
Cho CH, Kim KE, Byun J, Jang HS, Kim DK, Baluk P, Baffert F, Lee GM, Mochizuki N, Kim J, Jeon BH, McDonald DM, Koh GY.	Long-term and sustained COMP-Ang1 induces long-lasting vascular enlargement and enhanced blood flow.	Circ Res.	97	86-94	2005
Fujita H, Fukuhara S, Sakurai A, Yamagishi A, Kmioka Y, Nakaoka Y, Masuda M, Mochizuki N.	Local activation of Rap1 contributes to directional vascular endothelial cell migration accompanied by extension of microtubules on which RAP1, a Rap1-associating molecule, localizes.	J. Biol.Chem	280	5022-5031	2005
Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, Saito Y, Kangawa K, Mochizuki N.	Cyclic AMP potentiates VE-cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through Epac-Rap1 signaling pathway.	Mol. Cell Biol.	25	136-146	2005
Lu FZ, Fujino M, Kitazawa Y, Uyama T, Hara Y, Funeshima N, Jiang JY, Umezawa A, Li XK.	Characterization and gene transfer in mesenchymal stem cells derived from human umbilical-cord blood.	J Lab Clin Med.	146(5)	271-8	2005
Matsumoto S, Shibuya I, Kusakari S, Segawa K, Uyama T, Shimada A, Umezawa A	Membranous osteogenesis system modeled with KUSA-A1 mature osteoblasts..	Biochim Biophys Acta	1725(1)	57-63	2005
Matsushita K, Iwanaga S, Oda T, Kimura K, Shimada M, Sano M, Umezawa A, Hata J, Ogawa S.	Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis.	Lab Invest.	85(10)	1210-23.	2005

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Mori T, Kiyono T, Imabayashi H, Takeda Y, Tsuchiya K, Miyoshi S, Makino H, Matsumoto K, Saito H, Ogawa S, Sakamoto M, Hata J, Umezawa A.	Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential.	Mol Cell Biol.	25(12)	5183-95.	2005
Katagiri YU, Kiyokawa N, Nakamura K, Takenouchi H, Taguchi T, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J.	Laminin binding protein, 34/67 laminin receptor, carries stage-specific embryonic antigen-4 epitope defined by monoclonal antibody Raft.2.	Biochem Biophys Res Commun.	15;332(4)	1004-11.	2005
Higuchi A, Shindo Y, Gomei Y, Mori T, Uyama T, Umezawa A.	Cell separation between mesenchymal progenitor cells through porous polymeric membranes.	J Biomed Mater Res B Appl Biomater.	74(1)	511-9.	2005
Kuroda M, Oikawa K, Yoshida K, Takeuchi A, Takeuchi M, Usui M, Umezawa A, Mukai K.	Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL.	Cancer Lett..	18	221(1):21-8	2005
Kawashima N, Shindo K, Sakamoto K, Kondo H, Umezawa A, Kasugai S, Perbal B, Suda H, Takagi M, Katsube K.	Molecular and cell biological properties of mouse osteogenic mesenchymal progenitor cells, Kusa.	J Bone Miner Metab.	23(2)	123-33.	2005

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Terai M, Uyama T, Sugiki T, Li XK, Umezawa A, Kiyono T.	Immortalization of human fetal cells: the life span of umbilical cord blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway.	Mol Biol Cell.	16(3)	1491-9.	2005

G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes

Mutsuo Harada^{1,4}, Yingjie Qin^{1,4}, Hiroyuki Takano^{1,4}, Tohru Minamino^{1,4}, Yunzeng Zou¹, Haruhiro Toko¹, Masashi Ohtsuka¹, Katsuhisa Matsuura¹, Masanori Sano¹, Jun-ichiro Nishi¹, Koji Iwanaga¹, Hiroshi Akazawa¹, Takeshige Kunieda¹, Weidong Zhu¹, Hiroshi Hasegawa¹, Keita Kunisada², Toshio Nagai¹, Haruaki Nakaya³, Keiko Yamauchi-Takahara² & Issei Komuro¹

Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) was reported to induce myocardial regeneration by promoting mobilization of bone marrow stem cells to the injured heart after myocardial infarction, but the precise mechanisms of the beneficial effects of G-CSF are not fully understood. Here we show that G-CSF acts directly on cardiomyocytes and promotes their survival after myocardial infarction. G-CSF receptor was expressed on cardiomyocytes and G-CSF activated the Jak/Stat pathway in cardiomyocytes. The G-CSF treatment did not affect initial infarct size at 3 d but improved cardiac function as early as 1 week after myocardial infarction. Moreover, the beneficial effects of G-CSF on cardiac function were reduced by delayed start of the treatment. G-CSF induced antiapoptotic proteins and inhibited apoptotic death of cardiomyocytes in the infarcted hearts. G-CSF also reduced apoptosis of endothelial cells and increased vascularization in the infarcted hearts, further protecting against ischemic injury. All these effects of G-CSF on infarcted hearts were abolished by overexpression of a dominant-negative mutant Stat3 protein in cardiomyocytes. These results suggest that G-CSF promotes survival of cardiac myocytes and prevents left ventricular remodeling after myocardial infarction through the functional communication between cardiomyocytes and noncardiomyocytes.

Myocardial infarction is the most common cause of cardiac morbidity and mortality in many countries, and left ventricular remodeling after myocardial infarction is important because it causes progression to heart failure. Several cytokines including G-CSF, erythropoietin and leukemia inhibitory factor have beneficial effects on cardiac remodeling after myocardial infarction^{1–5}. In particular, G-CSF markedly improves cardiac function and reduce mortality after myocardial infarction in mice, possibly by regeneration of myocardium and angiogenesis^{1,2,6–8}. G-CSF is known to have various functions such as induction of proliferation, survival and differentiation of hematopoietic cells, as well as mobilization of bone marrow cells^{9–11}. Although it was reported that bone marrow cells could differentiate into cardiomyocytes and vascular cells, thereby contributing to regeneration of myocardium and angiogenesis in ischemic hearts^{12–15}, accumulating evidence has questioned these previous reports^{16–18}. In this study, we examined the molecular mechanisms of how G-CSF prevents left ventricular remodeling after myocardial infarction.

RESULTS

G-CSF directly acts on cultured cardiomyocytes

G-CSF receptor (G-CSFR, encoded by *CSF3R*) has been reported to be expressed only on blood cells such as myeloid leukemic cells,

leukemic cell lines, mature neutrophils, platelets, monocytes and some lymphoid cell lines⁹. To test whether G-CSFR is expressed on mouse cardiomyocytes, we performed a reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) experiment by using specific primers for mouse *Csf3r*. We detected expression of the *Csf3r* gene in the adult mouse heart and cultured neonatal cardiomyocytes (Fig. 1a). We next examined expression of G-CSFR protein in cultured cardiomyocytes of neonatal rats by immunocytochemistry. Similar to the previously reported expression pattern of G-CSFR in living cells¹⁹, the immunoreactivity for G-CSFR was localized to the cytoplasm and cell membrane under steady-state conditions in cardiomyocytes (Fig. 1b). This immunoreactivity disappeared when the antibody specific for G-CSFR was omitted, validating its specificity (Fig. 1b). In addition to cardiomyocytes, we also detected expression of G-CSFR on cardiac fibroblasts by immunocytochemistry (see Supplementary Fig. 1 online) and RT-PCR (Supplementary Fig. 2 online).

The binding of G-CSF to its receptor has been reported to evoke signal transduction by activating the receptor-associated Janus family tyrosine kinases (JAK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cells^{9,10}. In particular, STAT3

¹Department of Cardiovascular Science and Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan. ²Department of Molecular Medicine, Osaka University Medical School, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. ³Department of Pharmacology, Chiba University Graduate School of Medicine, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan. ⁴These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to I.K. (komuro-tky@umin.ac.jp).

