



Transplantation of cardiotrophin-1-expressing myoblasts to the left ventricular wall alleviates the transition from compensatory hypertrophy to congestive heart failure in Dah...

杜， 隆嗣

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2004-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3047

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003047>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 145 】

氏 名・(本 籍) 杜 隆 嗣 (中国)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学 位 記 番 号 博い第1605号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成16年3月31日

【 学位論文題目 】

Transplantation of cardiotrophin-1 expressing
myoblasts to the left ventricular wall alleviates the
transition from compensatory hypertrophy to congestive
heart failure in Dahl salt-sensitive hypertensive rats
(左心室壁へのカルディオトロフィン-1 過剰発現骨格筋芽細胞移植
によりダール食塩感受性高血圧性ラットにおいて代償性心肥大から
うつ血性心不全への移行が抑制される)

審 査 委 員

主 査 教 授 大 北 裕

教 授 秋 田 穂 束

教 授 上 野 易 弘

(緒言)

成熟心筋細胞は分裂能を欠くため、障害心筋への筋原性細胞移植は重症心不全に対する治療法として有望視されている。近年、心筋梗塞後の瘢痕心筋への自家骨格筋芽細胞移植療法の有効性が動物実験で多数報告されており、臨床試験も進行中である。しかし非虚血性心不全に対する同療法の有効性についての検討はほとんどなされていない。

Dahl 食塩感受性高血圧 (DS) ラットは生後 6 週齢より高食塩食を開始すると 11 週齢にて求心性心肥大を呈し、さらに 17 週齢において著明な左室腔拡大と収縮能低下を示す。本研究では高血圧性心不全モデルである DS ラットにおいて、骨格筋芽細胞自家移植により、代償性心肥大から心不全への移行を抑制しうるかを検討した。

一方、同療法は移植細胞を介した局所への遺伝子導入に利用することも可能である。Cardiotrophin-1 (CT-1) は、培養心筋細胞において、肥大を促進するとともに、細胞保護的に作用するサイトカインである。われわれはさらに DS ラットに対し、レトロウイルスを用いて CT-1 を遺伝子導入した骨格筋芽細胞を移植した場合の効果について検討した。

(方法)

ラット CT-1 の full-length cDNA を新生児ラット心室筋細胞の RNA より RT-PCR により獲得した。ラット CT-1 cDNA をコードしたトランスマーカーと gag-pol をコードしたパッケージングベクター及びエコトロピックエンベロープベクターを 293T 細胞ヘリン酸カルシウム法により導入し、CT-1 を組み込んだレトロウイルスを作製した。

DS ラットに 6 週齢より 8% 高食塩食負荷を開始した。骨格筋芽細胞は自己の下肢より採取した骨格筋より単離・培養した。骨格筋芽細胞への CT-1 遺伝子導入には、CT-1 を組み込んだレトロウイルスをポリブレンの存在下で 16 時間感染させた。心エコーにて 11 週齢において求心性心肥大を呈していることを確認後、開胸術下に 10^6 個の CT-1 遺伝子導入した自家骨格筋芽細胞 (MB+CT 群、n=31)、自家骨格筋芽細胞単独 (MB 群、n=31) または PBS (Sham 群、n=24) を左室自由壁に計 10-15ヶ所にわけて直接注射した。

心機能評価のため、11 週齢、15 週齢及び収縮不全を呈する 17 週齢にて心エコーを施行し、また 17 週齢にて左室内圧を測定し、dP/dt_{max} 及び左室拡張末期圧 (LVEDP) を算出した。

移植細胞の宿主心筋内での定着確認のため、移植 6 週後の左室自由壁に対し、ヘマトキシリソ-エオジン (H-E) 染色及び骨格筋特異的ミオシン重鎖に対する組織免疫学的染色を行った。CT-1 の発現程度については左室自由壁より抽出した

タンパクをウェスタンプローティング法により評価するとともに、宿主心筋内で遺伝子導入した移植細胞が実際に CT-1 を発現しているかについて組織免疫学的染色でも評価した。また宿主心筋細胞の形態学的变化を評価するため心筋細胞の横断面積を測定した。

DS ラットにおける心不全への移行にレニン・アンジオテンシン系やエンドセリン (ET) 系などの神経体液性因子の関与が報告されており、アンジオテンシン II (AT II) 及び ET-1 の血清濃度を 13 及び 17 週齢にて測定した。

さらに移植細胞に対する CT-1 の効果を *in vitro* にて C2C12 骨格筋芽細胞を用いて検討した。C2C12 細胞にレトロウイルスで CT-1 遺伝子を導入後、血清存在下並びに非存在下での増殖・生存の程度を WST 法にて非導入 C2C12 細胞と比較評価した。

(結果)

1. 心機能への影響

Sham 群では 11 週齢において求心性心肥大を認め、17 週齢において著明な左室腔拡大と収縮不全を呈した。一方、細胞移植を施行した 2 群では、Sham 群に比し有意に心機能は保たれており、MB+CT 群では MB 群に比べその程度がより大きかった (LVEDD : sham 7.06 ± 0.14, MB 6.51 ± 0.16, MB+CT 6.24 ± 0.07 mm, %FS : sham 32.1 ± 1.4, MB 38.5 ± 1.5, MB+CT 43.2 ± 0.8)。血行動態上も同様の結果が得られた (dP/dt_{max} : Sham 887.8 ± 85.2, MB 1252 ± 35, MB+CT 1849 ± 168 mmHg/s, LVEDP : Sham 14.0 ± 2.9, MB 6.9 ± 2.3, MB+CT 6.8 ± 1.1 mmHg)。

2. 宿主心筋内の移植細胞の定着

移植 6 週後の左室自由壁において、H-E 染色にて骨格筋芽細胞が分化して筋管を形成しているのを認め、さらに同部が骨格筋特異的ミオシン重鎖に対する抗体である MY-32 により免疫染色されることを確認した。

3. 移植後心筋内の CT-1 発現

あらかじめ *in vitro* にて遺伝子導入した骨格筋芽細胞のメディウム中に、CT-1 が分泌されていることをウェスタンプローティング法により確認した。移植後 2 週間の時点での各群の左室自由壁より抽出したタンパクを用い、ウェスタンプローティングを施行したところ、MB+CT 群での CT-1 発現が Sham 群に比べ約 2.3 倍増強していた。また移植後 6 週間の時点でも、MB+CT 群では、移植細胞での CT-1 発現が持続していることが組織免疫学的染色にて確認された。

4. 心筋細胞の組織学的形態変化

in vitro において CT-1 遺伝子を導入した骨格筋芽細胞のメディウムが、新生児ラット心室筋細胞に対し肥大作用を有することを確認した。細胞移植後の宿主心筋細胞の形態学的变化について、組織学的に検討した。Sham 群では 11 週齢

にて 6 週齢に比べ心筋細胞の横断面積は著明に大きくなるも、17 週齢ではやや小さくなる傾向があった。17 週齢において MB 群と Sham 群間での心筋細胞面積に有意な差は認めなかった。一方、同週齢において MB+CT 群では他の 2 群に比べ心筋細胞面積が約 17% 大きくなっていた。また MB+CT 群にて、移植部位である左室自由壁側と非移植部位である中隔側を比較したところ、前者において心筋細胞面積が有意に大きいことより、分泌された CT-1 はパラクライン的に作用していることが推測された。

5. 神経体液性因子への影響

Sham 群では心不全への進行に伴い血清中の AT II および ET-1 濃度上昇が認められた。一方、細胞移植の 2 群ではその発現が有意に抑えられていた。さらに AT II 発現は MB 群に比べ MB+CT 群でより有意に抑制されていた。

6. CT-1 による骨格筋芽細胞の生存効果

CT-1 遺伝子を導入した C2C12 細胞は、血清存在下では有意な差はなかったが、非導入細胞より増殖速度が速くなる傾向を示した。一方、血清非存在下では、非導入細胞では細胞数の減少を示したが、CT-1 遺伝子導入細胞ではむしろ細胞数の増加傾向を示した。

(考察)

自家骨格筋芽細胞移植療法により、高血圧性心不全モデルである DS ラットで代償性心肥大から心不全への移行が抑制されることが示された。さらに CT-1 遺伝子導入の併用によりその効果が増強されることがわかった。骨格筋芽細胞移植による心機能保持効果の正確な機序については不明であるが、移植細胞のガードリング効果により wall stress が低下し、局所での AT II 及び ET-1 などの神経体液性因子の発現亢進が抑制され、心室リモデリングが抑えられた結果ではないかと推測する。一方、宿主心筋細胞との電気機械的同調については現時点では否定的な報告が多いが、移植細胞自身が収縮に関与している可能性もある。CT-1 併用効果の機序については、細胞移植自体の効果に加えて、CT-1 がパラクライン的に移植細胞近隣の心筋細胞を肥大させることにより wall stress をさらに低下させたためと考える。さらに CT-1 が in vitro において骨格筋芽細胞に対し細胞保護的に働くことより、移植細胞の定着率の向上にも関与している可能性がある。

(まとめ)

本研究より、自家骨格筋芽細胞移植療法が虚血性心不全のみならず、非虚血性心不全にも有用であると考えられた。さらに骨格筋芽細胞移植療法と CT-1 遺伝子導入の併用は心不全治療法に有望であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1606 号	氏名	杜 隆嗣
論文題目	Transplantation of cardiotrophin-1 expressing myoblasts to the left ventricular wall alleviates the transition from compensatory hypertrophy to congestive heart failure in Dahl salt-sensitive hypertensive rats 左心室壁へのカルディオトロフイン-1過剰発現骨格筋芽細胞移植によりダール食塩感受性高血圧性ラットにおいて代償性心肥大からうつ血性心不全への移行が抑制される		
審査委員	主査	大内 和也	
	副査	林田 雄一	
	副査	江野 易み	
審査終了日	平成 16 年 3 月 11 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

(目的) 近年、虚血性心不全における自家骨格筋芽細胞移植療法の有効性が報告されている。本研究では非虚血性心不全に対する同療法の有効性を評価する目的で、高血圧性心不全モデルである Dahl 食塩感受性高血圧ラットを用い検討を行った。一方、Cardiotrophin-1 (CT-1)は培養心筋細胞において肥大を促進するとともに、細胞保護的に作用する。われわれはさらに同モデルに対し、レトロウイルスを用いて CT-1 を遺伝子導入した骨格筋芽細胞を移植した場合の効果について検討した。

(方法) Dahl 食塩感受性高血圧ラットに 6 週齢より 8% 高食塩食負荷を開始した。11 週齢において心エコーにて求心性心肥大を呈していることを確認後、左室自由壁に 10^6 個の CT-1 遺伝子導入した自家骨格筋芽細胞 (MB+CT 群、n=8)、自家骨格筋芽細胞単独 (MB 群、n=11) または PBS (Sham 群、n=6) を計 10 ケ所にわけて直接注射した。収縮不全を呈する 17 週齢 (移植 6 週後) に心エコーおよび左室圧測定により心機能を評価した。

(結果) 細胞移植を施行した群ではともに Sham 群に比し有意に心機能は保たれていたが、MB+CT 群では MB 群に比べその程度がより効率的であった (LVEDD : sham 7.1 ± 0.1 MB 6.5 ± 0.2 MB+CT 6.2 ± 0.1 mm, %FS : sham 32.1 ± 1.4 MB 38.5 ± 1.5 MB+CT 43.2 ± 0.8)。血行動態上も同様の結果が得られた (dP/dt_{max} : Sham 887.8 ± 85.2 MB 1252 ± 35 MB+CT 1849 ± 168 mmHg/s, LVEDP : Sham 14.0 ± 2.9 MB 6.9 ± 2.3 MB+CT 6.8 ± 1.1 mmHg)。CT-1 の宿主側の心筋細胞への効果を評価するため、同週齢において組織学的に検討したところ、MB+CT 群では他の 2 群に比べ心筋細胞の横断面積が約 17% 大きくなっていた。一方、同モデルでは心不全への進行に renin-angiotensin および endothelin (ET) system の関与が報告されているが、細胞移植により心不全進行に伴う Angiotensin II (Ang II) 及び ET-1 の血清濃度上昇が有意に抑えられていた。Ang II に関しては MB 群に比べ MB+CT 群でより有意にその活性化が抑制されていた。また CT-1 の移植細胞自身への効果について C2C12 骨格筋芽細胞を用いて in vitro で検討した。血清非存在下では C2C12 細胞は細胞数の減少を示したが、同細胞にレトロウイルスを用いて CT-1 を遺伝子導入したところ、むしろ増殖傾向を示した。

(考察) 自家骨格筋芽細胞移植療法により、Dahl 食塩感受性高血圧ラット収縮不全モデルにおいて代償性心肥大から心不全への移行が抑制されることが示された。さらに CT-1 遺伝子導入の併用によりその効果が増強されることがわかった。そのメカニズムについて細胞移植自体の効果に加えて CT-1 が移植細胞近隣の心筋細胞を肥大させることにより wall stress が低下し、局所での Ang II 及び ET-1 などの神経体液性因子の発現亢進が抑制され、心室リモデリングが抑えられたのではと推測している。さらに CT-1 が in vitro において骨格筋芽細胞に対し細胞保護的に働くことより、移植細胞の定着率の向上にも関与している可能性が示唆された。

本研究は自家骨格筋芽細胞移植療法について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった Dahl 食塩感受性高血圧ラット収縮不全モデルにおいて代償性心肥大から心不全への移行が抑制され、さらに CT-1 遺伝子導入の併用によりその効果が増強されることについ

て重要な知見を得た物として価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。