

GDF11による心臓の若返りの細胞生物学的機序を探る

## 《研究の概要》

老化心筋症とは、加齢により心筋の収縮力やコンプライアンスが損なわれる病態である。2013年、成長分化因子 GDF11 が加齢と共に減少し、老化心筋症の一因となることが示されたが、その機序は不明であった。一方、代表研究者らが同定したヒト心臓幹細胞は多分化能を持ち、心筋や冠血管を再生するが、高齢者では再生機能が不十分で心不全に至る可能性が示された。重症心不全の治療手段は、現状では心臓移植しかないが、高齢者は適応外である。そこで、心臓移植に依らずに心機能を回復する2つの方向性を模索した。即ち、①老化した心筋細胞ないし幹細胞を、*in situ* で直接的に若返らせる方法と、②老化した組織に内在する幹細胞を、体外で若返らせてから心臓に戻す方法である。

まず①の可能性を考慮し、GDF11による個々の幹細胞の増殖促進効果を調べたが、初期の7症例の検討では予想された傾向が見られたものの、28検体に拡大しての解析では有意な影響が見られなかった。更に、細胞老化の指標としてベータ・ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -Gal) や細胞のサイズ分布、アンチエイジング効果が期待される NMN も導入して検討したが、明らかな効果が見られなかった。

②の方向性に関連して、代表研究者らの検討において、*c-kit* のみで選別し培養すると、細胞の多くが「若さ」の指標である IGF-1 受容体も併せて発現していた。そこで、個々の細胞でなく幹細胞集団として若返らせ、これを移植することで心不全の改善を目指すこととした。その前提として、国内で臨床グレードの心臓幹細胞の調製・供給体制の確立に際して想定される課題の内、本研究により【1】2年以上の長期に亘って凍結保存された組織からでも、心臓幹細胞の単離と培養が可能であること、また凍結組織から得られた心臓幹細胞の増殖能力が、新鮮な組織から得られた幹細胞と同等であることを明らかにした。また、【2】細胞継代数の増加は、必ずしも染色体変異の増大を生じず、細胞の調製作業がゲノム多型に寄与している根拠は見出されなかった。更に、【3】共同研究機関であるセルバンク社の認定細胞調製施設（クリーンルーム）内で製造された臨床グレードの幹細胞が、先行する米国での臨床試験に基づいて設定された規格を満たすことを確認し、信頼性のある幹細胞加工体制を確立することが出来た。このクリーンルーム内で調製された細胞を *c-kit* のみで選別後に、代表研究者らが新規に開発した半自動的定量法で調べたところ、IGF-1 受容体の陽性率も高い「若い」形質を有しており、東海大学での結果が再現された。

こうした成果に基づき、特定認定再生医療等委員会で、自家心臓幹細胞移植による重症心不全治療の臨床試験実施について正式な承認を得た。*c-kit* 陽性心臓幹細胞は、虚血性心疾患を初めとする多様な心不全患者への適応が期待され、その波及効果や社会的意義は極めて大きい。

友池 仁暢	日本心臓血圧研究振興会 専務理事	榊原病院の作業監督
井口 信雄	榊原記念病院 内科主任部長、放射線科部長	被験者の同意取得
高梨秀一郎	榊原記念病院 副院長、外科主任部長	心臓組織採取の監督

## 研究報告

### I 研究目的

高齢化が進む我が国では、心不全への有効な治療法の開発が急務である。老化心筋症、即ち加齢により収縮力やコンプライアンスが損なわれた心臓を蘇らせ、心機能を回復する手段は、現状では心臓移植しかない。しかしながら、移植待機者数が臓器提供者数を大きく上回る現在、高齢者は心臓移植の適応外とされており、実質的に有効な治療法が存在しない。

成長分化因子 GDF11 が加齢と共に減少し、老化心筋症の一因となることが 2013 年に示されたが、その機序は不明であった (*Cell* 153:828)。一方、代表研究者らが同定したヒト心臓幹細胞は多分化能を持ち (*PNAS* 104:14069)、心筋や冠血管を生理的に再生している (*Circ Res* 107:305) が、高齢者ではその再生機能が心筋のアポトーシスを代償し切れず、心不全に至る可能性が示された (*Circ Res* 107:1374)。

また、こうした機能異常・不全への対策として、代表研究者らは、HGF と IGF-1 による心臓幹細胞の組織内での活性化が、老化心筋症の治療となり得ること (*Circ Res* 102:597)、ephrin-A1 が同細胞の遊走能を刺激すること (*Circ Res* 108:1071) を示した。更に、重症心不全患者に対する自家心臓幹細胞移植が心機能や自覚症状を改善させる可能性 (*Lancet* 378:1847) や、移植前の幹細胞の IGF-2 刺激により再生組織の成熟が促進されること (*Circ Res* 108:1467) などを明らかにした。

心臓移植に依らずに心筋細胞を「若返らせ」、心機能を回復する方策としては 2 つの方向性が想定される。即ち、①老化した心筋細胞やその元となる幹細胞・前駆細胞に、*in situ* で直接的に働き掛け、個々の心筋細胞を若返らせる方法と、②老化した心筋の一部を体外に取り出し、組織に内在する幹細胞を選別し、若返らせてから心臓内に戻す方法である。

本研究では、まず①の可能性を考慮し、GDF11 による個々の幹細胞の増殖促進効果が、老化心筋症の病態改善に繋がるという仮説の検証を目的とした。後に詳述するが、初年度、少数例の幹細胞サンプルでは予想された傾向が見られたものの、多数例の検討では有意な影響が見られなかった。更に、細胞老化の指標や、若返り効果が期待される別の因子も導入して検討を続けたものの、明らかな効果が見られなかった。

そこで 2 年度目は、上記②の方向性を追求し、更に研究を発展させた。代表研究者の検討では、培養過程における淘汰によって、若い幹細胞が自然に選択され (*J Cardiol Ther* 1:150, *World J Stem Cells* 7:182)、虚血性心不全に対する第 I 相臨床試験での好成績

(*Circulation* 126:S54) に繋がったと推測される。実際、幹細胞の老化は足並みを揃えて進む現象でなく、加齢によりその不均一性が増大することが分かった (*Circ Res* 114:41)。従って、個々の細胞の若返りよりも、population dynamics の発想に基づく幹細胞集団としての若返りを通じ、心不全を軽快させる方向性を模索した。

更に、この治療法の実用化を早めるため、臨床グレードの高品質な幹細胞供給体制の確立を目標とした。企業と連携することによって、自家幹細胞の速やかで安定した調製を目指している。c-kit 陽性心臓幹細胞は、虚血性心疾患を初めとする多様な心不全患者への適応が期待され、その波及効果や社会的意義が極めて大きいと言える。

## II 研究計画及び材料と方法

まず、被験者への文書による説明と同意に基づき、榊原記念病院における開心修復手術の際に切離された心臓組織片を、幹細胞培養液ないし保存液中に無菌的に封入する。これを東海大学に搬送し、心臓組織の細切後、コラゲナーゼ処理を経て、小細胞分画を前培養する。続いてマグネティック・ビーズを用いて、c-kit 蛋白を表面に発現するヒト心臓幹細胞を単離し、更に培養を続ける。細胞の一部を用いて c-kit 抗原に対する免疫細胞染色を行い、細胞選別の特異性を確かめる。

こうして得られた幹細胞を 35mm 培養皿 12 枚に播種し、3 枚ずつ 4 群に分け、それぞれを対照群、GDF11 刺激群、阻害薬添加群、阻害薬添加後 GDF11 刺激群とする。0.5%の低血清培地で一晚処理した後、阻害薬添加群には、GDF11 の受容体を選択的に阻害する SB-505124 を 4 マイクロ M の濃度で加える。本剤添加の 1 時間後、GDF11 刺激群には GDF11 を終濃度 200 nM で追加し、24 時間培養する。4 群それぞれについて、BrdU の短時間投与と免疫染色によって細胞の増殖能を比較検討する。

少数例での検討に続き、その再現性を検証するため、東海大学心臓血管外科の協力も得て、左室形成術症例の右心房及び左心室の組織片を譲り受け、そこから幹細胞を単離・培養し、同様に刺激実験を行う。また、当初は同一条件の皿 3 枚ずつで実験したが、次項で述べるように、GDF11 刺激による幹細胞増殖への影響を示すデータが不安定であったため、まずは効果の有無を判別することを優先して阻害薬のみ添加群を割愛し、同一条件の皿を 4 枚ずつとして、多数の検体を用いた検討を可能とした。

GDF11 による心臓幹細胞の増殖刺激効果の検証実験に続いて、幹細胞のサイズと、細胞老化の指標として一般に用いられるベータ・ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -Gal) の発現が、GDF11 刺激によってどのように変化するかを検討した。

初代細胞の培養・継代を続けると、細胞が徐々に大きくなり、増殖も遅くなることは 1960 年代より指摘され、細胞老化との関連が示唆されている (*Exp Cell Res* 45:336, *Exp Cell Res* 98:298, *In Vitro* 13:297, *Exp Gerontol* 24:383, *Cell Cycle* 10:144)。 $\beta$ -Gal に対する生体染色と併せ、細胞をそのサイズの分布で評価する方法の最大のメリットは、同一の標本を、固定することなく経時的に評価・追跡できる点にある。

まず、幹細胞の培養経過ないし継代によって、これらのパラメータがどのように変化するかを検討する。細胞の撮像・解析には、東海大学の生命科学統合支援センターの協力を

得て、ArrayScan システムを用いる。同機内では、培養皿を保温状態かつ二酸化炭素濃度 5%に維持した撮像が可能であり、処理速度も速く、細胞を固定しない生体染色に好都合である。

更に、幹細胞に対する GDF11 刺激と併行して、最近の研究で、細胞老化に対するアンチエイジング効果が期待されている NMN (Nicotinamide Mononucleotide; *Cell* 155:1624, *PLoS ONE* 9:e98972) を幹細胞に作用させ、対照群と比較して細胞サイズの分布や  $\beta$ -Gal の発現がどのように変化するかを検討する。

前項の研究目的で述べたように、老化した心臓を若返らせるもう一つの戦略として、老化した心臓組織の一部から内在する幹細胞を選別し、若返らせてから心臓内に戻す方策が想定される。GDF11 等の因子を体外から投与し幹細胞を *in situ* で刺激する方法では、潜在性の腫瘍等を活性化してしまう副反応の危険性が懸念される。しかし、心臓幹細胞の移植は、元来心臓内の腫瘍発生が稀である事実からも、こうしたリスクが少ないと期待される。

c-kit による心臓幹細胞の選別自体は、米国での第 I 相臨床試験で用いられた手技であり (*Lancet* 378:1847)、また現在、第 II 相試験も進行中である (*ClinicalTrials.gov* NCT02501811)。この手法を応用して幹細胞を若返らせられるのであれば、細胞加工を手掛ける国内の企業と連携して臨床グレードの細胞調製・供給体制を確立することにより、様々な前臨床あるいは臨床試験の実施が可能となると目される。

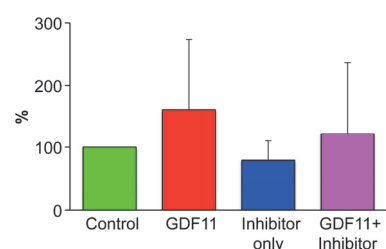
この目的のため、心臓幹細胞の加工調製技術について、共同研究機関であるセルバンク社へ、将来的な細胞調製の委託を見据えて移転を進めた。同社は細胞培養に関する豊富な知識と経験を有し、保有する細胞調製施設 (クリーンルーム) に対して、関東信越厚生局の認可を既に受けている。即ち、同社の施設で調製された細胞は、臨床目的での使用が可能である。

研究材料としては、引き続き、榊原記念病院の共同研究者の協力を得て、同院の開心術で得られる心臓組織片を用いた。代表研究者がセルバンク社と密接に連絡を取り合って技術移転を進め、同社のクリーンルーム内で細胞調製を監督した。更に、凍結心臓組織からの幹細胞調製も再現した。

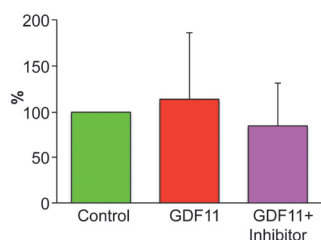
### III 研究成果

当初の計画通り、榊原記念病院で得られた心臓組織サンプルを用いて、東海大学において c-kit 陽性ヒト心臓幹細胞の単離と培養を行った。c-kit 抗原に対する免疫細胞染色によって細胞選別の特異性を調べたところ、概ね 70~90%の陽性率であり、被験者の差異によらず、比較的安定した幹細胞調製が可能であった。

培養幹細胞を 4 群に割り振り、対照群、GDF11 刺激群、阻害薬添加群、阻害薬添加後 GDF11 刺激群とした。各群の条件で 24 時間刺激し、BrdU で細胞の増殖能を評価した。初期の 7 症例での検討では、右図に示す通り、統計学的に有意ではないものの、GDF11 による刺激によって細胞増殖



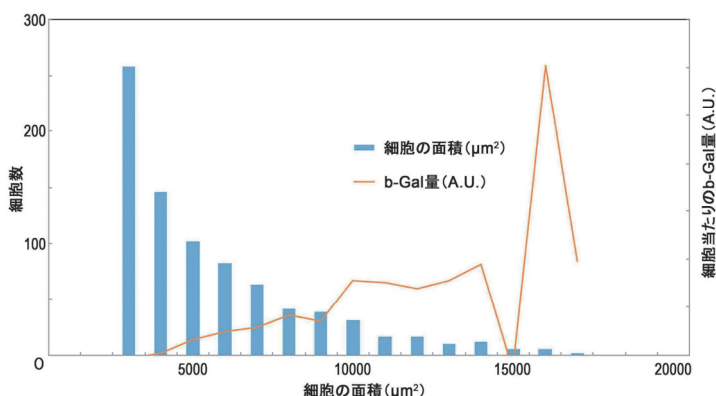
が促進され、この効果は阻害薬の添加によって抑制される傾向が見られた。



東海大学心臓血管外科の協力も得て、より多くの症例からサンプルを入手し、同様に解析を進めた。しかし、GDF11による幹細胞の増殖促進効果が見られたものは、半数程度に留まった。いわゆるレスポナーとノン・レスポナーの間に、細胞の継代数や臨床データの差異等、説明可能な因子は見出せなかった。更に、同一症例について繰り返し実験を試

みたところ、その度に異なる反応を示すサンプルもあり、全体として、延べ 28 検体を用いた検討の末、左上の図に示す通り、有意な効果なしと結論せざるを得なかった。

これに代わる研究の方向性として、幹細胞のサイズと、ベータ・ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -Gal) の発現を検討した。無染色の状態を観察を試みたところ、細胞の辺縁の検出が困難で、サイズの自動計測が不可能であった。そこで、細胞膜成分を染色する WGA (Wheat Germ Agglutinin; 小麦胚芽凝集



素) や、FITC による培養液の蛍光着色等を試みた。WGA の染色で細胞の輪郭が明瞭となり、サイズの解析が可能となった。更に  $\beta$ -Gal との二重染色も機能した。予想された通り、大きい細胞の方が、細胞内の  $\beta$ -Gal の蓄積量も多い傾向が見られ、老化傾向を反映しているものと考えられた。代表的なサンプルについて、二次元的な細胞サイズの度数分布と、細胞当たりの  $\beta$ -Gal の含有量を表したグラフを示す。

WGA による細胞毒性のためか、生体染色・撮像の後に再培養を試みた細胞は、生存率が極端に低下し、信頼性のあるデータを継続的に得ることは困難と考えられた。従って、経時的に 1 つのサンプルを追跡する方向性は断念し、いわゆるエンドポイント評価とした。GDF11 及び NMN での刺激後に WGA と  $\beta$ -Gal で二重染色し、ArrayScan で解析した。各試薬の濃度や刺激時間、細胞の密度等も変更しつつ複数回の実験を試みたが、いずれの刺激によっても、幹細胞の若返りを示唆するデータは得られなかった。

研究目的の項で述べたように、心臓を若返らせる 2 つ目の戦略として、老化した心筋の一部を体外に取り出し、組織に内在する幹細胞を選別し、若返らせてから心臓内に戻す方向性を模索した。この目標を達成するために、国内において臨床グレードの心臓幹細胞の調製・供給体制を確立するに当たり、主として 3 つの課題が想定された。即ち、

【1】従来の新鮮な非凍結の心臓組織片からと同様に、凍結された心臓組織からでも幹細胞の調製が可能であるか。またその性質が同等であるか。

【2】臨床に要する多量の細胞を得るため、長期に心臓幹細胞を培養した際に、染色体等に変異が生じないか。

【3】このような心臓幹細胞の調製が、臨床グレードの細胞調製施設 (クリーンルーム)

内で再現されるか。

【1】に関しては、主として東海大学での実験結果に基づき、2年以上凍結保存された組織からでも、心臓幹細胞の単離と培養が可能であること、また凍結組織から得られた心臓幹細胞の増殖能力が、同一被験者の新鮮な組織から得られた幹細胞と比べて同等であることを明らかにし、学術誌 (*Ann Transl Med* 5:41) に発表した。

【2】の課題に関連して、最近の研究に拠れば、ヒト皮膚の線維芽細胞の約 30%にゲノムのコピー数多型が見られること (*Nature* 492:438)、65 歳以上では、10%のヒトの血球細胞の核に多型が見られること (*N Engl J Med* 372:2477) が報告されている。

実際、代表研究者らの予備的検討において、68 歳男性の非凍結心臓組織由来の第 0 継代細胞の核型解析 (即ち、組織から全ての細胞を単離・培養して解析したもの) では、正常核型が 60% (20 個中 12 個)、Y 染色体の単独欠失が 30%、第 1 染色体内の転座と、第 1・第 3 染色体間の転座がそれぞれ 5%に認められた。従って、上記の報告と同様、心臓組織の体細胞自体にゲノム多型が生じているものと想定された。また、第 4~6 継代の心臓幹細胞 14 サンプルを用いて核型解析を実施したところ、女性では正常核型の割合が平均で 92.1%、男性では 60.0%で、男性由来の幹細胞では Y 染色体の単独欠失が平均で 25.0%に認められた。

こうしたゲノムの多型が、当該被験者の組織内に元来存在していたものか、或いは幹細胞の調製工程で生じたものであるかを検討するため、c-kit で選別前の心臓由来細胞、及び選別後の心臓幹細胞を用いて、それぞれ 4 継代毎 (P4, P8, P12, P16, P20) に核型解析を行い、多型性の推移を調べた。まず 5 症例分の被験者サンプルを用いて検討したが、第 20 継代まで到達できずに細胞増殖が停止した検体もあり、明らかな結論を導き出せなかった。そこで段階的に、4 症例程度ずつ追加し、最終的には 16 症例での検討となった。その結果、第 20 継代の心臓幹細胞でも検査された細胞の全てが正常核型を示す場合があるなど、継代数の増加は、必ずしも多型性の増大に繋がっておらず、細胞の調製作業がゲノム多型に寄与しているとする明らかな根拠は見出されなかった。これについては、今後の臨床試験実施に際しても解析し、継続的に検討して行く予定である。

【3】に関しては、共同研究機関である株式会社セルバンクの全面的な協力を得て、同社内の細胞調製施設 (クリーンルーム) を利用させて頂いた。幹細胞の調製に付随する機能解析は言うまでもなく、衛生環境を評価するための諸検査、組織や細胞搬送中の温度管理などを含め、臨床的に用いる幹細胞に必要と考えられる品質を担保するための検証を行った。そしてこれらの結果が、先行する米国での臨床試験に基づいて設定された規格を満たすことを確認し、信頼性のある臨床グレードの細胞加工体制を確立することが出来た。

こうした成果に基づき、平成 28 年 9 月より特定認定再生医療等委員会で、自家心臓幹細胞移植による重症心不全治療の臨床試験実施について審査を受けた。複数回の慎重な審議の末、翌年 2 月 15 日付けで正式な承認を得られ、現在、関東信越厚生局に申請中である。

#### IV 考察

当研究が依拠していた *Cell* 153: 828 の論文の主旨、即ち、成長分化因子 GDF11 の血中

濃度が加齢と共に減少して老化心筋症の一因となり、この蛋白の補充が心臓を若返らせるとする実験結果に対して、本研究期間中に、他の研究室より下記2つの論文が発表された。

Smith SC, et al. GDF11 does not rescue aging-related pathological hypertrophy. *Circ Res* 117: 926-32.(2015)

Harper SC, et al. Is Growth Differentiation Factor 11 a Realistic Therapeutic for Aging-Dependent Muscle Defects? *Circ Res* 118: 1143-50.(2016)

いずれの論文も、上記 *Cell* の研究結果を否定するものであった。先に述べた通り、当初の作業仮説に基づいて遂行した我々の実験の結果は、多数例での検討において、仮説を支持するものではなかったが、これらの後追い研究は、本研究の成果と方針転換の妥当性を支持するエビデンスと言える。

ところで、インスリン様成長因子 IGF-1 は、心臓幹細胞を増殖させ、アポトーシスを抑制する働きが強い。最近の代表研究者らの研究で、c-kit 陽性幹細胞のうち、IGF-1 受容体を併せ持つ亜分画は、c-kit だけで選別されたものに比べ、増殖能力や再生治療効果が強く、より「若い」幹細胞の表現型を有することが分かった (*Circ Res* 108:1467)。即ち、IGF-1 受容体は、いわば幹細胞の若さのマーカーとして機能している。

よって高品質の若い幹細胞を得るには、c-kit と IGF-1 受容体の両者で選別する方法が合理的と思われる。しかしながら、東海大学での検討で、興味深いことに、c-kit のみで選別し培養すると、細胞の多くが IGF-1 受容体も併せて発現していた。この現象は次のように説明される。心臓内で幹細胞を格納するニッチ構造のうち、より酸素分圧の低いものは活動性が低く、若いまま静止期にある幹細胞を含んでいる。逆に、酸素分圧が高いニッチでは幹細胞が頻繁に分裂して消費され、テロメアが短縮し、老化が進みやすい (*Circ Res* 114:41)。こうして手術組織片から得られた幹細胞には、必然的に様々な若さのものが混在するが、培養されると若い幹細胞は速く増え、老化した細胞は増殖を止めたりアポトーシスで失われたりするため、一定期間後の培養皿は、結果的に若い細胞で占められるものと考えられる (*J Cardiol Ther* 1:150, *World J Stem Cells* 7:182)。

実際、共同研究機関であるセルバンク社内のクリーンルームで調製された幹細胞も、c-kit のみで選別した後に免疫細胞染色法で調べると、IGF-1 受容体の陽性率も高いことが確認され、東海大学での検討結果を再現する成果が得られている。なお、本研究遂行に際して、我々が新規に開発した半自動的定量法を用いて、細胞の表面抗原陽性率を客観的に検討し得たことは特筆に値するであろう。今後、様々な研究での応用が期待される技術である。

先の研究成果で述べた通り、2年以上凍結保存された組織からでも、心臓幹細胞を単離し培養することが可能であること、また凍結組織から得られた心臓幹細胞の増殖能力が、同一被験者の新鮮な組織から得られた幹細胞と比べて劣っていないことを明らかにした。これは、臨床試験の実施に際し、重要なエビデンスとなるデータを提供する研究と言える。また、本研究の一部として臨床試験を実施することは想定していなかったが、当初の研究目的としてこの幹細胞治療の実用化の促進を掲げていた。上記の通り、臨床試験を実施す



るための基盤ないし科学的根拠の提供を通じて、この目標を達成出来たものと評価している。本研究によって、心臓幹細胞治療の適応拡大と、医師主導治験～企業治験～薬事申請（早期承認）のプロセスが飛躍的に加速することが期待される。

## V 研究成果の発表

<主な口頭発表>

### 細田 徹

「心臓再生のお話」

2016年4月6日、榊原記念病院にて講演会

### 細田 徹

「Preservation and Differentiation of Human Cardiac Stem Cells」

2016年5月9日、スイス・ルガノの研究会「Rebuilding the Failing Heart」で招待講演

### 細田 徹

「The Heart Heals Itself」

2016年5月23日、榊原記念病院にて講演会

### 細田 徹

「重症慢性虚血性心不全患者に対する自家心臓幹細胞治療～JOKER試験」

2016年5月30日、AMED主催「再生医療実用化研究事業情報交換会」にて口頭発表

### 細田 徹

「人類を救え！心臓幹細胞」

2016年12月15日、榊原記念病院にて講演

<学術雑誌>

Montagnani S, Rueger MA, Hosoda T, Nurzynska D. Adult Stem Cells in Tissue Maintenance and Regeneration. *Stem Cells Int* 2016:7362879. (2016)

Hosoda T, Iguchi N, Cho Y, Inoue M, Murakami T, Tabata M, Takanashi S, Tomoike H. The proliferative potential of human cardiac stem cells was unaffected after a long-term cryopreservation of tissue blocks. *Ann Transl Med* 5:41. (2017)