

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06828

研究課題名(和文) ヒト皮下脂肪由来エリート間葉系幹細胞の同定とその保有数に影響を与える因子の検証

研究課題名(英文) Identification and validation of the angiogenic adipose-derived stem cells among patients with cardiovascular diseases

研究代表者

井上 己音(Oto, Inoue)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：00781147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織由来間葉系幹細胞ADRCは、重症心臓血管病への新規治療として注目されているが、患者間で効果がばらつくことが問題点である。我々は、20名程度の心臓血管病を有する症例からADRCを分離し、その血管新生能について検討を行った。患者由来ADRCはインスリン抵抗性-脂肪慢性炎症-CD271陽性サブセットの減少、という大まかな流れの中で劣化するという知見を得た。同定されたCD271陽性ADRCは、ADRC自体の増殖能・増殖因子発現量・移植モデルにおける足壊疽治療効果能と有意に相関しており、幹細胞治療の効果に大きな影響を与えるサブセットと考え、解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：Adipose-derived stem cells (ADSCs) have been emerged as an attractive option for regenerative therapy. ADSCs are composed of various subsets and the CD271+ subset is reported to be more primitive and proliferative. ADSCs were isolated from subcutaneous adipose tissue of 20 patients undergoing elective cardiac surgery. The percentages of CD271+ subset in CD45-CD34+ ADSCs were measured by flowcytometer. According to the CD271 frequency, ADSCs samples were divided into two groups ("high" and "low" groups). Nude mice were subjected to hindlimb ischemia and 1 million of ADSCs) were injected into the ischemic muscles. At day 14, neovascularization was evaluated by laser Doppler analysis and histological analysis using fluorescent-labeled lectin perfusion in duplicate. Intramuscular injection of ADSCs of the "high" group demonstrated enhanced neovascularization compared to the "low" group in laser Doppler analysis and also in histological analysis.

研究分野：再生医療

キーワード：脂肪組織由来間葉系幹細胞 血管新生

1. 研究開始当初の背景

本邦においても食生活や生活習慣の欧米化および高齢化社会の進行に伴い、動脈硬化を基盤とする虚血性疾患（虚血性心疾患・末梢動脈閉塞性疾患など）の罹患者数は増加している。虚血性疾患は、動脈の狭窄や閉塞により、末梢の組織が進行性の血行障害が生じ、虚血状態に陥るものである。従来、狭窄した血管を広げる(カテーテル治療)、あるいは別な血管をつなげる(バイパス手術)治療が行われてきたが、糖尿病患者や透析患者などでは、びまん性病変を形成しやすく、血行再建が困難となる重症例や治療抵抗例も多く存在する。このような症例に対する全く新しい治療法として、iPS細胞や間葉系幹細胞を用いた、臓器や新たな血管・血流を生み出す再生医療に、社会的な期待が高まっている。

臓器再生という観点からは、iPS細胞は様々な臓器系統の細胞へ分化することが可能だが、一方で高い腫瘍化(奇形腫)リスクが臨床応用へのハードルとなっている。一方、間葉系幹細胞は骨髄や脂肪組織などの患者臓器に常在する組織固有の幹細胞であり、高い安全性が確認されてきている。多系統の細胞に幅広く分化する能力はiPS細胞に劣るものの、抗炎症性サイトカインや血管新生因子(VEGF など)の分泌能に長けており、心血管疾患を含めた多方面での臨床試験が国際的に開始されている。また、再生医療では必要な幹細胞数の確保が重要なプロセスである。骨髄などから十分な幹細胞を得るには、培養など煩雑な調整作業が必要で、採取時の侵襲性や感染なども問題であり、再生治療法開発の大きな障害となっている。皮下脂肪組織には、脂肪細胞のほか、間質細胞が多数存在し、血管内皮、血管平滑筋、心筋細胞へ分化可能な間葉系幹細胞が含まれておりADRCと呼ばれている。このため、安全に、かつ、培養せずに十分な再生細胞を調整でき、その臨床応用が注目されている。ヒト、マウスのADRCをフローサイトメトリーにより解析し、細胞表面抗原が、骨髄由来幹細胞と酷似しており、脂肪組織単位体積あたり、骨髄の100倍以上の幹細胞を含有していることが確認されている(Panfilov et al. *Methods Mol Biol.* 2013)。

心筋虚血後の心臓リモデリングにおいて、炎症性サイトカインの上昇が注目されている。この点で、申請者らも、マウス心筋虚血モデルにおける炎症性サイトカインを定量し、ADRC投与によるサイトカイン上昇の抑制と、心機能改善を確認した(論文投稿中)。

しかし少数例であるが、臨床試験実施症例の血清サイトカイン濃度の検討を行うとADRC投与による血中サイトカイン濃度(IL-1 β 、IL-6)に与える影響が症例間に差があることが示唆された。この要因の一つに、投与するADRCのプロファイリングが影響している可能性が示唆された。

これまでの臨床試験の結果から、ADRCを用

いた虚血性心不全に対する細胞治療は、投与する細胞の質がその治療効果に影響を与えるとの仮説を立て、より高いサイトカイン抑制能・血管新生能を持つエリート間葉系幹細胞を同定し、その細胞治療効果を検証する目的で本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

我々は厚生労働大臣の承認意見書並びに、特定再生認定再生医療等委員会の認定を受け、虚血性心不全に対する脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADRC)を用いた再生医療の安全性確認臨床試験を実施中である。中間解析において有害事象は認められていないが、症例ごとに左室収縮能の改善効果にばらつきが確認された。自己由来の間葉系幹細胞は、いくつかの表面マーカーによって分類可能な多様な細胞集団であるが、我々の検討でそのプロファイルが患者の基礎疾患などにより異なっており、その多様性が臨床効果に影響を与えている可能性が示唆された。本研究では、より多数例のADRCプロファイルを検討するとともにモデルマウスによる解析をおこない、より治療効果の高いエリート間葉系幹細胞を見出すこと、ならびに幹細胞の質に影響を与える因子を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、ADRC中のエリート間葉系幹細胞を同定しその治療効果を確認するため、以下の項目を明らかにする。

A) 脂肪組織中のエリート間葉系幹細胞数に与える因子の検討：待機的外科手術患者から得られた余剰皮下脂肪組織中に含まれる間葉系幹細胞数を測定し、臨床的背景因子(年齢、生活習慣病(糖尿病・脂質異常症・高血圧)、疾患(心不全)の重症度、BNPやCRPといった血清マーカー)との関連性を検討する。(学内倫理委員会承認済み)

B) エリート間葉系幹細胞の細胞治療効果に与える影響：余剰脂肪組織をホモジナイズし単細胞懸濁液を調整し、磁気細胞分離にてエリート間葉系幹細胞を抽出する。得られた幹細胞の増殖能・分化能・サイトカイン産生能などをin vitroで評価するとともに、モデル動物への移植実験を行い、その血管新生能などを評価する。

4. 研究成果

(1) 同意の得られた心血管病患者20症例の皮下脂肪組織より、ADRCの表面抗原解析を行った。臨床背景のデータと、分離されたADRCのフローサイトメトリーの相関関係を検定解析したところ、インスリン抵抗性指標であるHOMA-IRと、CD271陽性のADRCの陽性率とに有意な負の相関を認めた。尚、CD34陽性CD31陰性のADRC全体の陽性率とは有意な相関は認められなかった(図1)。

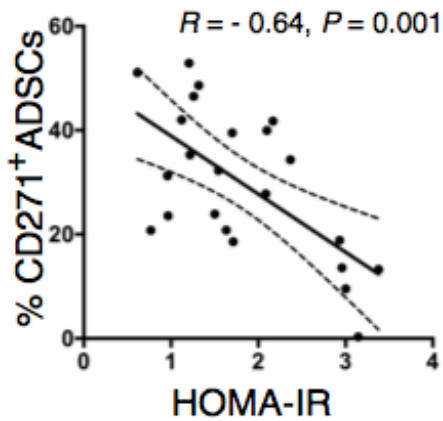


図 1

(2) インスリン抵抗性により CD271 陽性 ADRC が減少する機序の解明を目的として、インスリン抵抗性の病態基盤として注目されている脂肪組織の慢性炎症についても解析を行った。脂肪組織慢性炎症は CD45 陽性 CD14 陽性の脂肪組織マクロファージ分画を、CD11c ならびに CD206 を用いて炎症性/代償性の分極として定量化し、CD271 陽性率と検定解析した。CD271 陽性率は、脂肪組織炎症指標 M1/M2 比と、有意な負の相関を示した(図 2)。

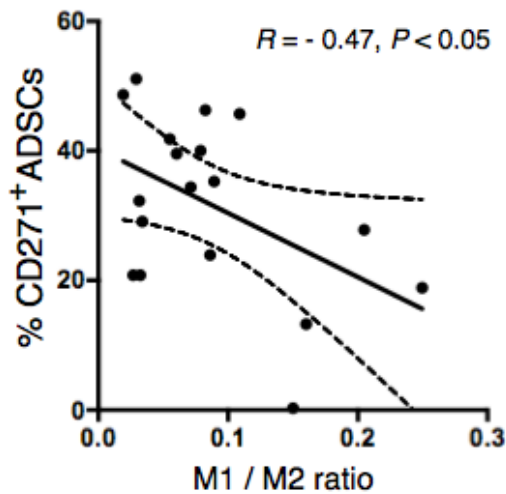


図 2

(3) 先の検討でスクリーニングされた CD271 陽性 ADRC を、血管新生能の高いエリート幹細胞の候補として、下肢虚血モデルを作成した免疫不全マウスに移植実験した。磁気ビーズ法によりヒト CD271 陽性ならびに陰性分画を分離し、培養の上で虚血下肢に筋肉注射投与し、14 日後に新生血管について検討を行った。CD271 陽性 ADRC は CD271 陰性 ADRC に比べ、高い血管新生能を示した。CD271 陰性サブセットはコントロール群 (PBS) と有意な差のない効果であった(図 3)。

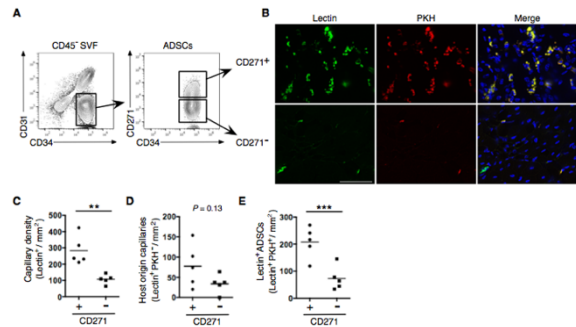


図 3

(4) In vitro で増殖能やサイトカインの再生能力に関して、CD271 陽性 ADRC と CD271 陰性 ADRC を比較したところ、大きな差異を認められたのは、細胞老化・線維化系の遺伝子発現マーカーが、CD271 陽性 ADRC で低く抑えられていた点であった(図 4)。

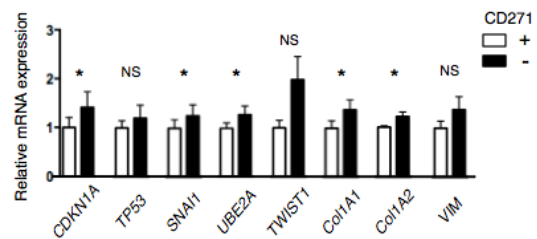


図 4

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 9 件)

(1) 第 17 回再生医療学会総会 (2018 年)

「脂肪組織慢性炎症は脂肪組織幹細胞の血管新生能を低下させる」

井上己音, 竹田悠亮, 五天千明, 野村あやの, 大辻浩, 高島伸一郎, 薄井荘一郎, 金子周一, 高村雅之

(2) ESC Congress 2017 (バルセロナ、2017 年)

「Identification of the angiogenic subset of human adipose-derived stem cells by evaluation of capability to induce M2-dominant macrophage polarization in cell therapy」

Oto Inoue, Soichiro Usui, Ayano, Nomura, Chiaki Goten, Takuto Hamaoka, Hiroshi Ootsuji, Shin-ichiro Takashima, Takeshi Kato, Hisayoshi Murai, Hiroshi Furusho, Kenji Iino, Hirofumi Takemura, Shuichi Kaneko, Masayuki Takamura

(3) 第 81 回日本循環器学会学術総会 (2017 年)

「Chronic Hyperinsulinemia and Adipose Tissue Inflammation Decrease the Yield of

Therapeutic Stem Cells in Patients with Cardiovascular Disease]

Oto Inoue, Soichiro Usui, Hiroshi Ootsuji, Shin-ichiro Takashima, Takeshi Kato, Hisayoshi Murai, Hiroshi Furusho, Kenji Iino, Hirofumi Takemura, Shuichi Kaneko, Masayuki Takamura

(4) 第81回日本循環器学会学術総会(2017年, 同学会2演題)

「The CD271-positive Subset in Human Adipose-derived Stem Cells Influences Therapeutic Neovascularization by Cell Therapy in a Mouse Hindlimb Ischemia Model」

Oto Inoue, Soichiro Usui, Hiroshi Ootsuji, Shin-ichiro Takashima, Takeshi Kato, Hisayoshi Murai, Hiroshi Furusho, Kenji Iino, Hirofumi Takemura, Shuichi Kaneko, Masayuki Takamura

(5) 11th Regenerative medicine & stem cells (シンガポール, 2017年)

「Adipose Tissue Inflammation and the Quality of Adipose-derived Stem Cells in Patients with Cardiovascular Diseases」

Masayuki Takamura and Oto Inoue

(6) AHA Scientific Sessions 2016 (ニューオリンズ, 2016年)

「Human Adipose Tissue Inflammation Decreases CD271-positive Adipose Derived Stromal Cells and Deteriorates Therapeutic Angiogenesis of Cell Transplantation for Critical limb Ischemia」

O. Inoue, S. Usui, S. Takashima, T. Hamaoka, H. Ootsuji, A. Nomura, K. Iino, T. Kato, H. Murai, H. Furusho, H. Takemura, S. Kaneko, M. Takamura

(7) ESC Congress 2016 (ローマ, 2016年)

「Systemic insulin resistance and adipose tissue inflammation predict decreased therapeutic mesenchymal stem cells for autologous transplantation in patients with cardiovascular disease」

O. Inoue, S. Usui, S. Takashima, T. Kato, H. Murai, H. Furusho, H. Takemura, S. Kaneko, M. Takamura

(8) 第80回日本循環器学会学術総会(2016年)

「Insulin resistance predicts the yield of therapeutic stem cells in adipose tissue for autologous grafts in patients with cardiovascular disease.」

Oto Inoue, Soichiro Usui, Mitsuhiro Sugita, Shin-ichiro Takashima, Takeshi Kato, Hisayoshi Murai, Hiroshi Furusho, Hirofumi Takemura, Shuichi Kaneko,

Masayuki Takamura

(9) 第15回再生医療学会総会(2016年)

「脂肪組織慢性炎症が間葉系幹細胞プロファイルに及ぼす影響」

井上 己音, 薄井 莊一郎, 杉田 光洋, 高島伸一郎, 加藤 武史, 村井 久純, 古莊 浩司, 酒井 佳夫, 竹村 博文, 金子 周一, 高村 雅之

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 己音 (INOUE, Oto)

金沢大学附属病院・医員

研究者番号: 00781147

(2) 研究分担者

高村 雅之 (TAKAMURA, Masayuki)

金沢大学附属病院・講師

研究者番号: 60362000

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()