

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19403

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞培養上清を用いた新規動脈硬化性疾患の治療法の開発及び作用機序の解明

研究課題名(英文) Development of novel treatment for ameliorating atherosclerosis by conditioned medium from mesenchymal stem cells

研究代表者

高藤 義正 (Takafuji, Yoshimasa)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：90734864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞培養上清(MSC-CM)の静脈内投与によって、動脈硬化モデルマウスにおける動脈硬化巣の形成が抑制された。MSC-CMは血管内皮細胞(EC)における接着関連分子の発現を抑制し、マクロファージ(M₁)におけるM1マーカーの発現を抑制し、M2マーカーの発現を向上するといった抗炎症作用を示した。さらにこの抗炎症作用における分子機序を明らかにし、MSC-CMに含まれる蛋白質・エクソソームの両者が抗炎症作用に寄与していることも明らかにした。MSC-CMによる抗動脈硬化作用は、EC及びM₁に対する抗炎症作用によってもたらされていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intravenous administration of conditioned medium from cultured MSCs (MSC-CM) decreased the atherosclerotic lesions in model mouse. MSC-CM decreased the expression of cell adhesion molecules in endothelial cells (ECs), and decreased the expression of M1 markers and increased the expression of M2 markers in bone marrow derived macrophages. The anti-inflammatory action against ECs were induced by both proteins and exosomes in MSC-CM via inhibition of MAPK and NFκB pathway, and the M1/M2 polarization of macrophages were induced by proteins in MSC-CM via activation of STAT3 pathway and inhibition of MAPK pathway. The results of this study suggest that humoral factors from MSCs are promising for suppression of atherosclerosis by anti-inflammatory actions.

研究分野：基礎医学

キーワード：間葉系幹細胞 培養上清 動脈硬化 エクソソーム 血管内皮細胞 マクロファージ 抗炎症

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患である虚血性心疾患や脳血管疾患は、本邦の死因の4分の1を占める。動脈硬化は、血管内皮細胞の炎症、免疫細胞の集積などの血管内の環境変化とその反応が複雑に関わって形成され、動脈硬化の進展や破綻によって生じる血栓により動脈が閉塞すると、組織が虚血に陥り、心筋梗塞、脳卒中などの重篤な症状を引き起こす。現在、動脈硬化に対する標準療法はスタチンによるLDL-Cの管理であり、スタチンの投与によって、心血管イベントの発生リスクが約30%低減すると言われている(CH. Ahn et al. Diabetes Metab J, 2015;39(2):87-94)。一方で、スタチン治療で取り除けない残存リスクに対する新しいアプローチも求められており、申請者は動脈硬化性疾患に対する高い安全性、有効性を示す予防法および治療法の開発を目的として、抗炎症、免疫調整作用を示すことが知られている間葉系幹細胞(MSC)に着目した。

MSCは、動脈硬化の終末病態である心筋梗塞部位に注射することで心機能を改善することが臨床試験で示され(Z. Yang et al. Cardiovasc Ther, 2010;28:380-385)、その作用には、MSCが産生する液性因子が関与していると考えられている。しかし、動脈硬化の形成期におけるMSCの作用はほとんど明らかになっていない。また、血中投与したMSCの大部分は短時間で肺に集積する(J. Nystedt et al. Stem Cells, 2013; 31:317-326)ことから、MSCを動脈硬化性疾患の治療に用いる場合、肺塞栓を誘発する懸念がある。そこで申請者は、塞栓誘発の心配が無く、濃縮して高用量の投与が可能なMSC培養上清(MSC-CM)を用いた。これまでにMSC-CMの血中投与は、ラット大腸炎モデル(S. Watanabe et al. Gastroenterol, 2014; 49:270-282)やマウス心筋虚血再灌流モデル(S. Yamaguchi et al. Sci Rep, 2015;5:16295)における障害を緩和することが報告されており、MSC-CMの血中投与は抗炎症作用による動脈硬化の形成、進展を抑制することが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、動脈硬化性疾患に対するMSC-CMの作用を*in vivo*および*in vitro*にて検証し、MSC-CMを用いた動脈硬化性疾患に対する新しい治療および予防法の開発を行うとともに、MSC-CMに含まれる有効成分の同定とその作用機序を解明することを目的として行った。

3. 研究の方法

(1) MSCの採取およびMSC-CMの回収、分画
C57BL/6Jマウス(6~8週齢、雄)から摘出した臀部皮下脂肪をコラゲナーゼ処理した後、遠心を行い、沈降した細胞を培養皿に播種した。10%FBS含有DMEM中で7日間培養

後、接着性細胞をMSCとして継代して用いた。MSC表面抗原の確認のため、各種マーカー分子に対する免疫染色を行い、フローサイトメーターを用いて解析するとともに、MSCの多分化能の確認のため、骨および脂肪分化誘導を行った。MSC-CMの回収について、継代数4のMSCを 2×10^4 cells/cm²で培養皿に播種し、48時間血清存在下で培養した。その後、無血清DMEMに交換し、低酸素(2% O₂)下でさらに48時間培養した上清を限外濾過(MWCO 3000)により10倍に濃縮し、MSC-CMとして用いた。回収したMSC-CMを150,000×g、4で70分超遠心し、上清(MSC-CM supernatant)を回収した。超遠心後に沈降したペレットをPBSで再分散し、同条件で再度超遠心した。超遠心後のペレットを無血清DMEMで再分散したサンプルをエクソソーム画分(MSC-exo)として用いた。MSC-exoをNanosightで解析し、エクソソームの単離を確認した。

(2) 動脈硬化モデルマウスに対するMSC-CMの血中投与試験

5~6週齢のLDLR^{-/-}マウスに高脂肪食を負荷し、2週間馴化後、10倍濃縮MSC-CMもしくはコントロールとして無血清DMEMを尾静脈から週2回、13週間投与し、20~21週齢で解剖した。大動脈を採取し、大動脈の脂肪染色、大動脈弁組織切片の脂肪染色、M特異的抗原(F4/80)、接着関連分子(ICAM-1、VCAM-1)の免疫染色を行った。さらに、血清生化学検査、肝組織切片のHE染色を行った。

(3) 血管内皮細胞に対するMSC-CMの*in vitro*作用検証

ヒト大動脈由来初代培養血管内皮細胞(EC)を、TNF-による炎症性刺激存在下、MSC-CM、MSC-CM supernatant、MSC-exoでそれぞれ培養した。定量RT-PCRにより各細胞の接着関連分子の遺伝子発現を解析し、Western blottingによりNF- κ B、MAPK経路関連蛋白質の発現解析を行った。

(4) Mに対するMSC-CMの*in vitro*作用検証

C57BL/6Jマウス(6~8週齢、雄)から摘出した大腿骨、脛骨由来骨髓細胞を培養皿に播種し、誘導培地(10%マウス線維芽細胞株(L929)培養7日後上清/10%FBS含有RPMI培地)で7日間培養することでMに誘導し、実験に用いた。

Mを、LPSによる炎症性刺激存在下、MSC-CM、MSC-CM supernatant、MSC-exoでそれぞれ培養した。定量RT-PCRにより各細胞のM1、M2マーカーの遺伝子発現を解析し、Western blottingによりMAPK、JAK-STAT経路関連蛋白質の発現解析を行った。また、M培養後の培養液中に含まれる炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6)量をELISAによって測定した。

4. 研究成果

(1) MSCの採取およびMSC-CMの回収、分画
本研究で用いたMSCはCD90, CD44, Sca-1, CD29, CD105陽性、CD14, CD31, CD45陰性であり、脂肪細胞、骨芽細胞への分化能を有しており、MSCとしての特性を備えていると考えられた。

MSC-CM中には直径200 nm以下のナノ粒子が 1×10^8 個/mL含まれており、超遠心によってエクソソームが単離できていることを確認した。

(2) 動脈硬化モデルマウスに対するMSC-CMの血中投与試験

MSC-CM群では、コントロール群と比較して大動脈でのプラーク面積が41%低下した。大動脈弁組織切片では、プラーク面積、F4/80陽性面積がそれぞれ約30%低下し、さらに正常血管壁におけるICAM-1、VCAM-1の発現がそれぞれ49、73%低下した。したがって、MSC-CMはプラークの形成を抑制し、血管壁へのマクロファージ(M₁)の集積、血管壁表面での接着関連分子の発現を低下することが示唆された。

一方で、血清総コレステロール、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、総トリグリセリドの値はいずれも両群間で有意な差が認められず、脂質代謝に対するMSC-CMの作用は認められなかった。また、血清AST、ALTの値及び肝組織切片の病理所見において、両群間で明らかな違いは認められず、MSC-CM投与による肝毒性は認められなかった。

(3) 血管内皮細胞に対するMSC-CMのin vitro作用検証

MSC-CMは、炎症性刺激によって上昇したECにおける接着関連分子(ICAM-1、VCAM-1)の発現を約30%低下し、その抑制作用はMSC-CMの濃縮によって高まった。また、MSC-CM supernatantおよびMSC-exoも、MSC-CMと同様、ECにおける接着関連分子の発現を、対照群(無血清DMEM群)と比較して有意に抑制した。

MSC-CM、MSC-CM supernatant、MSC-exoのいずれもが、炎症性刺激によって惹起されたp65(NF- κ B経路)、JNK(MAPK経路)のリン酸化を抑制した。したがって、MSC-CMはNF- κ B、MAPK経路を阻害することにより、ECに対する抗炎症作用を示し、MSCが産生したエクソソーム、蛋白質両者の寄与が示唆された。

(4) M₁に対するMSC-CMのin vitro作用検証

MSC-CMは炎症性刺激によって上昇したM₁におけるM₁マーカー(TNF- α 、IL-6、Arg2)の発現を抑制し、未刺激下のM₁におけるM₂マーカー(MRC1、SR-A1、Arg1)の発現を有意に上昇した。同様の検討をMSC-CM supernatantおよびMSC-exoを用いて行った結果、MSC-CM supernatantはMSC-CMと同様の抗炎症

作用を示したが、MSC-exoでは認められなかった。また、MSC-CMは炎症性刺激を与えたM₁からのTNF- α 、IL-6の産生量をいずれも有意に抑制した。

MSC-CM、MSC-CM supernatantは、炎症性刺激によって惹起されたJNK(MAPK経路)のリン酸化を抑制し、STAT3(JAK-STAT経路)のリン酸化を上昇した。一方でMSC-exoではMSC-CMと同様の作用は認められなかった。したがって、MSC-CMはMAPK経路の阻害およびJAK-STAT経路の活性化により、M₁からM₂型への転換に関わり、MSCが産生した蛋白質がその作用を担っていることが示唆された。

研究成果のまとめ

MSC-CMの静脈内投与によって、動脈硬化モデルマウスにおける動脈硬化巣の伸展が抑制され、その機序として血管壁近傍における炎症抑制作用が推察された。MSC-CMはECに対して、NF- κ B、MAPK経路の阻害によって接着関連分子の発現を抑制し、M₁に対して、MAPK経路の阻害およびJAK-STAT経路の活性化によってM₁からM₂型への形質転換に寄与した。また、動脈硬化巣の伸展抑制において最も重要と考えられる血管内皮細胞に対しては、MSC-CMに含まれる蛋白質・エクソソームの両者が抗炎症作用に寄与していた。したがって、MSC-CMは、抗炎症作用によって動脈硬化巣の伸展抑制に寄与し、蛋白質・エクソソームの両者が関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[学会発表](計7件)

(1) 高藤 義正、堀美香、斯波真理子、Anti-inflammatory effect of mesenchymal stem cell-conditioned medium (MSC-CM) to cells related to formation of atherosclerotic lesion、第79回日本循環器学会学術集会(ポスター発表)、2015年4月25日、大阪国際会議場(大阪)

(2) 高藤 義正、堀美香、斯波真理子、間葉系幹細胞培養上清(MSC-CM)の動脈硬化性病変を形成する細胞に対する抗炎症作用、第47回日本動脈硬化学会総会(ポスター発表)、2015年7月10日、仙台国際センター(宮城)

(3) 高藤 義正、堀美香、斯波真理子、脂肪由来間葉系幹細胞培養上清のLDL受容体欠損マウスへの血中投与による動脈硬化抑制効果、第15回日本再生医療学会総会(口頭発表)、2016年3月19日、大阪国際会議場(大阪)

(4) 高藤 義正、堀美香、水野敏秀、斯波真理子、間葉系幹細胞培養上清による抗炎症作用を介した動脈硬化抑制効果、第37回日本炎症・再生医学会(ポスター発表)、2016年6月16日、京都市勧業館 みやこめっせ(京都)

(5) 高藤 義正、堀美香、水野敏秀、斯波真理子、間葉系幹細胞培養上清(MSC-CM)の血中投与による LDL 受容体欠損マウスにおける抗動脈硬化作用、第 48 回日本動脈硬化学会総会(ポスター発表)、2016 年 7 月 15 日、京王プラザホテル (東京)

(6) ○ Yoshimasa Takafuji, Mika Hori, Toshihide Mizuno and Mariko Harada-Shiba, Conditioned medium from mesenchymal stem cells repress atherosclerosis by suppression of adhesion molecules in endothelial cells and macrophage accumulation in LDL receptor deficient mice、The 5th International Congress on Lipid Metabolism & Atherosclerosis (口頭発表)、2016 年 9 月 10 日、Conrad Seoul Hotel (Korea)

(7) 高藤 義正、堀美香、斯波真理子、脂肪由来間葉系幹細胞培養上清の抗動脈硬化作用における機序の解析、第 16 回日本再生医療学会総会(ポスター発表)、2017 年 3 月 7 日、仙台国際センター (宮城)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高藤義正 (TAKAFUJI YOSHIMASA)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター研究所・流動研究員

研究者番号：90734864