

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10163

研究課題名(和文) 脂肪組織由来幹細胞を用いた薬剤徐放による肺高血圧増殖病変の制御

研究課題名(英文) Adipose-tissue derived mesenchymal stromal cells containing nanoparticles conjugated with statin for treatment of pulmonary arterial hypertension

研究代表者

根本 慎太郎 (NEMOTO, SHINTARO)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：20237811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：先天性心疾患に高頻度に合併し予後を左右する肺動脈性肺高血圧(PAH)に対する新しい治療を探索する実験研究である。様々な慢性炎症病変に集積し組織再生を促進する脂肪組織由来間葉系幹細胞(AdSC)を細胞増殖抑制などの多様な効果をもつスタチンと抱合させて静脈投与する方法である。VEGF抗体/低酸素誘導PAHマウスでの投与では、PAHに随伴する右心室圧上昇と右心室肥大を無治療またはマウスAdSCのみ投与に比較し有意に抑制した。またラット肺動脈平滑筋細胞を用いたin vitro試験では、スタチン抱合AdSCにより過剰増殖が抑制を確認した。スタチン抱合AdSCはPAHに伴う病変改善に有用と示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PAHに対する薬物治療は進化したもののその効果は残存血管の機能保持に留まり、病変を正常化させる治療効果はない。スタチン抱合AdSC投与がこの課題を解決する可能性を科学的に示された。実用化までには、更なるコンセプト検証、安全性検討、製造体制、そして臨床試験などの多くのステップを乗り越える必要があるものの、PAHの治療に再生医療の応用が選択肢になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Congenital heart disease often causes pulmonary arterial hypertension (PAH) resulting to life-threatening events. The major pathological finding of PAH is severe lumen narrowing by medial smooth muscle hypertrophy and neointimal hyperplasia in the pulmonary arterioles (PA). We hypothesized that adipose-tissue derived mesenchymal stromal cell (AdSCs) with the pleiotropic effects of a statin (simvastatin) could ameliorate the impaired vascular lesions and relating RV hypertrophy leading to heart failure. Murine AdSCs containing nanoparticles conjugated with simvastatin (sim-AdSCs) were prepared and intravenously injected into the VEGF-inhibition/hypoxia-induced PAH mouse. The sim-AdSCs significantly reduced the increased RV pressure and RV mass, compared to vehicle or AdSCs alone. In addition, the sim-AdSCs significantly suppressed the proliferation of the rat PA smooth muscle cells in vitro. Taken together, the sim-AdSCs would be a possible new therapeutic option of PAH.

研究分野：医学

キーワード：先天性心疾患 肺動脈性高血圧 脂肪組織由来間葉系幹細胞 スタチン 再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患に随伴する肺動脈性の肺高血圧症 (CHD-PAH) の多くは、原因となる左 - 右短絡により著しく増加した肺血流により生じた肺血管壁ストレスの上昇による各種分子生物学的修飾因子の増減により引き起こされる。組織学的には肺動脈の中膜平滑筋の肥厚、血管内皮の肥厚と破壊、そして血球成分の沈着などの炎症・増殖性変化が様々な程度に折り重なる所見 (肺動脈リモデリング) が特徴であり、病因の違いがあるものの共通に認められる。

更にダウン症や他の遺伝子的素因を背景とし様々な程度の細胞・組織機能障害が加わるため臨床表現や治療反応性が多様となる。よって CHD-PAH の治療では原因である血行動態の修復に加え、術後に遷延する肺高血圧の重症発作の予防と治療が重要であり、複雑な病態背景に対応した総合的薬物治療を展開する必要性がある。この薬物介入には (1) 肺動脈組織および血中サイクリック GMP およびサイクリック AMP 濃度を増強し中膜平滑筋を弛緩させる肺血管拡張療法、および (2) 肺動脈リモデリングにより形成された肺動脈病変を正常化または進行予防する治療に分類できる。前者 (1) で主軸となるサイクリック GMP 増加治療はニトログリセリン静注に始まり一酸化窒素吸入を経て現在では経口シルデナフィルの応用に至り (Nemoto S, et al. Eur J Cardiothorac Surg 2010; 38:71-77)、その急性、亜急性効果が明らかとなってきた。一方で後者 (2) は未解決課題であり、血管収縮・増殖を惹起するエンドセリン-1 受容体拮抗剤をはじめとする多くの薬剤が臨床応用に加わったが解決されていない。この解決のためには様々な重症度が異なる血管リモデリングがモザイク状に存在する肺動脈内において、より選択的に炎症・増殖性病変のリモデリング過程を修飾し、組織修復が可能な治療法が必要である。前者には候補薬剤の選択的デリバリーと一定期間の徐放が可能、かつ には組織修復再生能を有する治療によって達成出来うると考え“薬剤を内包させた脂肪組織由来間葉系幹細胞 (adipose-derived stromal stem cell: AdSC) の投与”に着目した。

AdSC は脂肪組織から容易かつ多量に分離が可能であり血管系細胞への分化能を有するため (Planat-Benard V, et al. Circulation 2004;109:656-663)、組織再生を目的とした再生医療への応用が期待され、欧米ではすでに虚血性心疾患に対する自家 AdSC 移植による臨床試験が実施されるに至っている (Meliga E, et al. Cell Transplant 2007;16:963-970)。AdSC 細胞が自身の組織再生能に加え、薬剤含有ナノ粒子を細胞内に抱合可能であるため標的組織での薬剤徐放が可能であることが我々の初期研究で認められた。また AdSC は一般的な静脈投与で傷害部位 (虚血、炎症等) と腫瘍に集積する特徴を持つため、炎症・増殖性病変が主体の肺高血圧病変に選択的薬剤デリバリーと徐放が可能と予想できる。

2. 研究の目的

本研究では AdSC のみならず、錯綜する肥大増殖心筋細胞の正常化能 (Mrian AJ, et al. Eur J Clin Invest 2010;40:976-983, Circ Res 2005;97:285-292) や内皮細胞活性化能 (肺高血圧リモデリングでは活性消失) を有するスタチン (高脂血症 LDL 治療薬) を抱合させて静注する新しい肺高血圧治療の可能性を実験的に検討することとした。

3. 研究の方法

(1)スタチン抱合 AdSC の基礎的作用を検証する *in vitro* 試験

肺動脈平滑筋細胞増殖能

マウスの鼠径部皮下から脂肪組織を採取し、細断・コラゲナーゼ処理で得られた細胞浮遊液からマウス脂肪組織由来間葉系幹細胞 mAdSC を分離回収した。

以下の条件で、5 日間 37 で共培養しラット肺動脈平滑筋細胞 (rPASMC) の増殖抑制効果を測

定した。細胞数は吸光度を用いてカウントした。

・ rPASC 2 × 10⁵/well (6 wells を準備)

・ mAdSC 2 × 10⁵ + Simvastatin-PLGA (乳酸・グリコール酸共重合体) 抱合; 0, 25, 50, 100, 200 μg (50 μg/50,000 cells) Simvastatin はスタチンの一つ。

肺動脈平滑筋細胞遊走能

上記の共培養を 37 °C 30 分間行い、遊走した rPASC 数をカウントした。

(2) PAH 動物モデルでのスタチン抱合 AdSC の効果を検証する *in vivo* 試験

PAH 動物モデルの作製

既報告 (Alencar AKN, et al. Front Pharmacol 2018; 9:article 1395, pp1-16) を参考に低酸素飼育と血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 受容体拮抗薬 (SU5416; Semaxanib) 投与を組み合わせ、PAH を誘導するマウスモデルを作製した。10% の酸素濃度に維持した低酸素飼育チャンバー内に雄性 8 週齢のマウスを収容し、収容時および収容後 1 週毎に 2 回の合計 3 回 SU5416 (20mg/kg) を皮下注射した。

低酸素飼育チャンバー (右 : 特注品) と混合ガスボンベ (左)



スタチン抱合 AdSC の投与

PAH 誘導マウスを以下の (A) ~ (D) の各種静注に対する反応を比較検討した。低酸素飼育チャンバー収容後 3 週経過後にマウス尾静脈内に投与した。

(N) ナイーブコントロール (PAH なし、静注なし) n=5

(A) PBS 200 μL のみ n=3

(B) Simvastatin 5 × 10⁴-PLGA/200 μL のみ n=4

(C) mAdSC 1 × 10⁴ 個/200 μL のみ n=3

(D) Simvastatin-PLGA 5 × 10⁴ 抱合 mAdSC 1 × 10⁴ 個/200 μL n=4

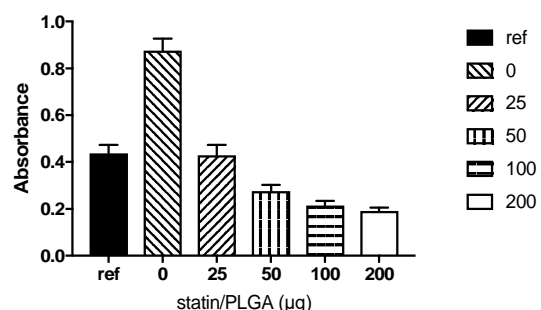
上記静注 3 週間後 (低酸素飼育チャンバー収容 6 週間後) に全身麻酔 (トリプロモエタノールの腹腔内投与) ・気管切開挿管下で開胸し、圧力トランスデューサーを左右心室に刺入し圧力を測定した。肺動脈圧上昇に伴う影響として、収縮期右室/左室圧比を算出した。その後、動物を安楽死させ、心臓を摘出し、右室重量、心室中隔および左室の合計重量を測定し、右室肥大の指標として右室/左室 + 中隔重量比 (Fulton index) を算出した。

4 . 研究成果

(1) *in vitro* 試験

肺動脈平滑筋細胞増殖能

AdSC に抱合する Simvastatin-PLGA の濃度依存性に rPASC の増殖が抑制された。



肺動脈平滑筋細胞遊走能

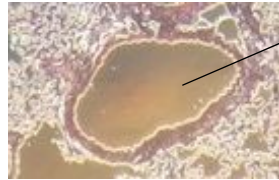
AdSC の有無、そして抱合する Simvastatin の濃度には無関係な遊走結果であった。

(2) *in vivo* 試験

低酸素飼育

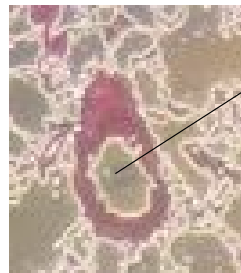
飼育チャンバー収容後 3 週間に採取した肺組織では、PAH に特徴的な肺小細動脈の肺動脈平滑筋細胞の増殖による肺動脈中膜肥厚と血管内腔の狭小化が確認された(モデルの適切性の確認)

通常室内気飼育マウスの肺組織
(HE 染色 弱拡大)



細動脈血管内腔: 正常

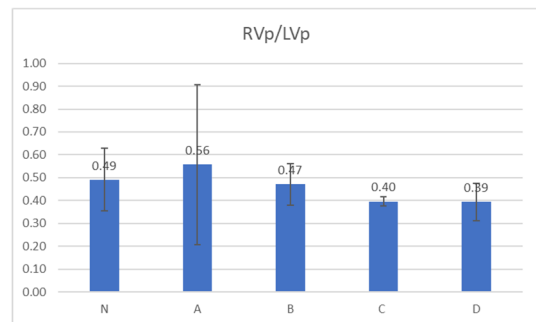
SU5416 投与+低酸素飼育チャンバー飼育
マウスの肺組織 (HE 染色 弱拡大)



狭小化した細動脈血管内腔

②右室/左室圧力比

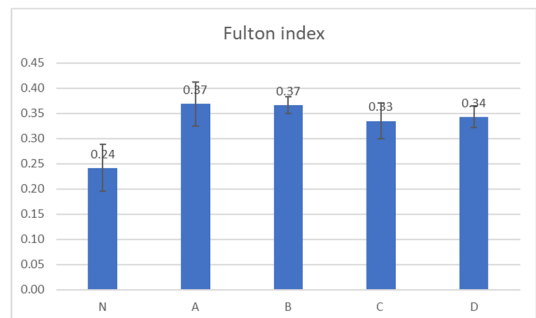
PAH による肺動脈圧上昇を反映し、無治療群 では同比が上昇した。一方で、C 群 (mAdSC 1×10^4 個/ $200 \mu\text{L}$ のみ) と D 群 (Simvastatin-PLGA 5×10^4 + mAdSC 1×10^4 個/ $200 \mu\text{L}$) で右室圧は改善し、ナイーブコントロールと同程度となった。



右室/左室 + 中隔重量比 (Fulton index)

右心室圧上昇を反映した右室肥大を A 群に認めた。スタチンのみではこの肥大抑制効果はなかったが、AdSC の投与により右室肥大の改善傾向が示された。

これらの *in vitro* および *in vivo* の検討では、スタチン抱合の効果は限定的であった。



(3) まとめ

スタチン抱合 AdSC は *in vitro* 試験で直接的に肺動脈血管平滑筋細胞の増殖を抑制する効果を示したが、*in vivo* での効果は AdSC のみで見られた効果を増強させるには至らなかった。今後は、*in vivo* での効果を最大限にする AdSC の投与細胞数、抱合するスタチン量、静注プロトコール等の条件抽出の検討が必要である。

引用文献

Nemoto S, et al. Eur J Cardiothorac Surg 2010; 38:71-77

Planat-Benard V, et al. Circulation 2004;109:656-663

Meliga E, et al. Cell Transplant 2007;16:963-970 Meliga E, et al. Cell Transplant 2007;16:963-970

Mrian AJ, et al. Eur J Clin Invest 2010;40:976-983, Circ Res 2005;97:285-292

Alencar AKN, et al. Front Pharmacol 2018; 9: article 1395, pp1-16

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪医科大学外科学講座胸部外科学教室研究室 小児心臓血管外科 https://www.osaka-med.ac.jp/deps/tho/guide/kenkyu/index.html 大阪医科大学外科学講座胸部外科学教室研究室 小児心臓血管外科 https://www.osaka-med.ac.jp/deps/tho/guide/kenkyu/index.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊井 正明 (II MASA AKI) (10442922)	大阪医科大学・その他部局等・講師 (34401)	
研究分担者	岸 勸太 (KISHI KANTA) (20408503)	大阪医科大学・医学部・助教 (34401)	
研究分担者	島田 亮 (SHIMADA RYO) (60795079)	大阪医科大学・医学部・非常勤医師 (34401)	
研究分担者	小西 隼人 (KONISHI HAYATO) (40821814)	大阪医科大学・医学部・助教 (34401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	永塚 健宏 (NAGATUKA TAKEHIRO) (10860083)	大阪医科大学・研究支援センター・特別職務担当教員（助教） (34401)	