

令和 4 年 9 月 15 日現在

機関番号：84430

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08568

研究課題名(和文)自己免疫性心筋炎に対する活性化MSCを用いた治療法確立

研究課題名(英文) Establishment of treatment method using activated MSC for autoimmune myocarditis

研究代表者

大倉 華雪 (Okura, hanayuki)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪はびきの医療センター(臨床研究センター)・次世代創薬創生センター・研究員(移行)

研究者番号：20589684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性心筋炎の治療戦略は、急性期においては抗炎症、慢性期には心筋組織修復である。抗炎症作用に関し、活性化によりPGE2合成酵素は約10倍以上上昇、心筋細胞を保護するG-CSFは約1000倍超の増加を認めた。活性化MSCを投与したモデル動物投与心臓組織で動脈系血管、静脈系血管、末梢神経マーカーを用い免疫組織的検討を行ったところ、動静脈系の陽性脈管数およびNF68の陽性数は、活性化MSCで有意に高かった。これらのデータは活性化MSCが、慢性傷害組織の修復に不可欠な動静脈と末梢神経支配をも修復再生することを示しており、その再生は自己免疫性心筋炎予後の改善にも寄与すると推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性化MSCは自己免疫性心筋炎への新規治療法となり、急性期の抗炎症、慢性期の血流回復、遠隔期の神経支配回復による予後改善に寄与すると想定される。

研究成果の概要(英文)：Therapeutic strategies for autoimmune myocarditis are anti-inflammatory in the acute phase and myocardial tissue regeneration in the chronic phase. Regarding the anti-inflammatory effect, priming of MSC increased PGE2 synthase and G-CSF about 10 times or more about 1000 times or more, respectively. Arterial and blood vessels, and peripheral nerve were examined by markers in the specimens. The primed MSC administration augmented the number of positive arterial and venous vessels, and NF68 than those of naive MSC administration, indicating that primed MSC repairs and regenerates arteries and veins and peripheral nerve innervation that are essential for repairing chronically injured tissue. These results hinted us that the primed MSC could improve the prognosis of autoimmune myocarditis.

研究分野：再生医療

キーワード：自己免疫性心筋炎 抗炎症 毛細血管再構築 末梢神経再生

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性心筋炎は心筋を主座とする炎症性疾患である。ウイルス感染動物や自己免疫性心筋炎動物などのモデルを用いた解析により、心筋細胞傷害機序が解明されつつある。その発症病理は、ウイルス感染などに続発した心筋細胞死、死滅した細胞に対する炎症細胞浸潤やサイトカイン産生など炎症の惹起、そして心機能障害をきたす NO の放出へと続く。炎症が消退すれば心機能は改善するものの、治療が十分でなく慢性心筋炎や劇症型心筋炎へといたる症例も多く、拡張型心筋症へと経過する症例もある。これら心筋炎の病態生理・自然歴の理解が進む中で、その理解を生かした治療法の開発が待たれていた。

我々は、自己免疫性心筋炎の治療 target を、炎症を制御して細胞死を抑制、血流確保のための毛細血管網とその輸出のための静脈系の構築、組織内圧ホメオスタシス維持のためのリンパ管の構築、末梢神経支配の再構築と想定、iNOS 誘導を含む炎症を抑制し、炎症が抑制された状態で機能的血管・リンパ管網を再生、心機能を制御する末梢神経支配再構築すれば、自己免疫性心筋炎において心筋組織の再生と拡張型心筋症への悪化抑制が期待されるのではないかと想定し、以下の目的で研究を進めることとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MSC が分泌する secretome がいくつかの病態病理 target に作用して治療にいたるよう、病態病理に合わせて MSC を活性化するという新規治療開発戦略が、自己免疫性心筋炎に妥当であると提示することである。

3. 研究の方法

(1) 活性化 ADMPC secretome の自己免疫性心筋炎に対する MOA 検証

投与された活性化 MSC 細胞は 抗炎症効果を発揮し、毛細血管網再生 静脈 リンパ流再生、末梢神経支配の再構築し、これら抗炎症・機能的血流 perfusion を組織学的土台として心筋実質を再生、拡張型心筋症への進展を抑制すると推定される。

その作用機序 (Mode-of-Action) を *in vitro* 機能試験により確認する。

抗炎症作用の検討

抗炎症活性物質分泌 (PGE2) および iNOS 抑制する CXCL1 発現の検証

毛細血管網構築の検討

G-CSF および ELR 陽性 CXCL 分泌と培養 secretome による管腔形成の検討

抗 G-CSF/抗 ELR 陽性 CXCL 中和抗体による培養 secretome の管腔形成抑制の検証

静脈網・リンパ管網構築・末梢神経再生secretomeの検討

Placental GF および G-CSF 分泌の検討

これら結果から、治療 target のうち *in vivo* での作用可能ポイントを推定する。

(2) 活性化 ADMPC のモデル動物での有効性確認

モデル動物に投与された細胞が、毛細血管網再生、静脈、リンパ流再生、末梢神経支配再構築するか、*in vivo* 試験により検討し、Proof-of-Concept を取得する。

毛細血管再生

モデル病巣での SMA 陽性細胞数を組織学的に検討

静脈再生

モデル病巣での EphB4 陽性比率を組織学的に検討

リンパ管再生

モデル病巣での LYVE-1 陽性比率を組織学的に検討

末梢神経再生

モデル病巣での NF68 陽性比率を組織学的に検討

これら結果から、有効性における作用機序であることを示す。

(3) 活性化 ADMPC 安全性評価 (造腫瘍性評価試験)

細胞投与による体内動態試験を行い、STAM121 (ヒト特異的タンパク) 陽性細胞が体内で生存する場合には腫瘍発生の有無を検討する。ADMPC は他 MSC と比較して抗炎症作用が強く、IL-1 にて活性化することで ADMPC の PGE2 発現も増加することから腫瘍発生については重要な concern であり、発生した場合は tumor mass の数と tumor mass の腫瘍径にて評価項目、腫瘍周囲に ADMPC が生着しているかも検討する。

4. 研究成果

(1) 活性化 ADMPC secretome の自己免疫性心筋炎に対する MOA 検証

自己免疫性心筋炎は心筋を主座とする炎症性疾患である。その発症病理は、ウイルス感染などに続発した心筋細胞死、死滅した細胞に対する炎症細胞浸潤やサイトカイン産生など炎症の惹起、そして心機能障害をきたす NO の放出へと続き、拡張型心筋症へと経過する。本研究チームは、自己免疫性心筋炎の治療 target を、炎症を制御して細胞死を抑制、血流確保のための毛細血管網の構築、末梢神経支配の再構築と想定した。これら multitarget な作用機序をもつ modality として細胞治療を選択、これまでのデータから、自己免疫性心筋炎に至適な活性化として IL-1 活性化脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) を用いた。その作用機序 (Mode-of-Action) を in vitro 機能試験により確認した。ADMPC を活性化することで抗炎症活性物質 (PGE2) 合成酵素 PGEST 2 が症状、その分泌が高進すること (図 1)、CXCL1 が発現 (図 1, 2) して心筋の細胞死を惹起する iNOS 抑制することを明らかとなった。急性期に求められる抗炎症作用については、IL-1 活性化により PGEST (PGE2 合成酵素) は約 16 倍上昇していた。心筋細胞保護・増生をもたらす G-CSF に至っては約 1280 倍の増加を認めていた。また、活性化により ELR 陽性 CXCL の産生・分泌が著しく上昇し (図 2)、HUVEC および EPC の管腔形成を更新することも明らかとした。

(2) 活性化 ADMPC のモデル動物での有効性確認

活性化 MSC の作用機序 (MOA) を検証するため、in vitro での細胞特性変化と in vivo での組織学的修復を比較検討、in vitro-in vivo correlation を確認することとした。

モデル動物心臓組織に関し、動脈系血管のマーカーである EphrinB2、静脈系血管のマーカーである APLNR、ならびに末梢神経のマーカーである NF に関し、免疫組織化学的検討を行った。EphrinB2 (動脈系マーカー)、ならびに Apelin Receptor (静脈系マーカー) の陽性数は、活性化 MSC では非活性化 MSC よりも有意に高い事が示された (図 3)。このデータは IL-1 活性化 MSC が、慢性傷害組織の修復に不可欠な動脈 (血液の流入) 静脈 (血液の流出) を修復・再生する能力が高い事を示唆している。組織修復により多くの血流が不可欠であり、IL-1 で処理した ADMPC による動脈・静脈系血管の修復・再生作用が心筋組織の治癒に著しく寄与し、これがコントロールおよび IL-1 で処理していない ADMPC の左室駆出率の改善を凌駕した理由であると推定された。

加えて、細胞が投与された領域での Neurofilament 68(末梢神経マーカー)の陽性数も、活性化 MSC では有意に高いことが示された(図3)。これは、活性化 MSC 投与は末梢神経支配をも修復・再生することを示しており、広く心不全患者において神経支配の回復が予後を規定することから、その再生は自己免疫性心筋炎予後の改善にも寄与すると推測される。

(3) 活性化 ADMPSC 安全性評価 (造腫瘍性評価試験)

細胞が生着するかに関し、ヒト特異的抗体である STAM121 を用いて免疫組織学的検討を行った。モデル動物の細胞投与局所において STAM 陽性細胞は認めず、投与細胞は消失しており、造腫瘍性はないことが明らかとなった。

これら試験成績から、IL-1 活性化 MSC は自己免疫性心筋炎への新規治療法となり、急性期の抗炎症、慢性期の血流回復、遠隔期の神経支配回復による予後改善に寄与すると想定された。

図1 naïve MSC vs primed MSC マイクロアレイ遺伝子発現比較

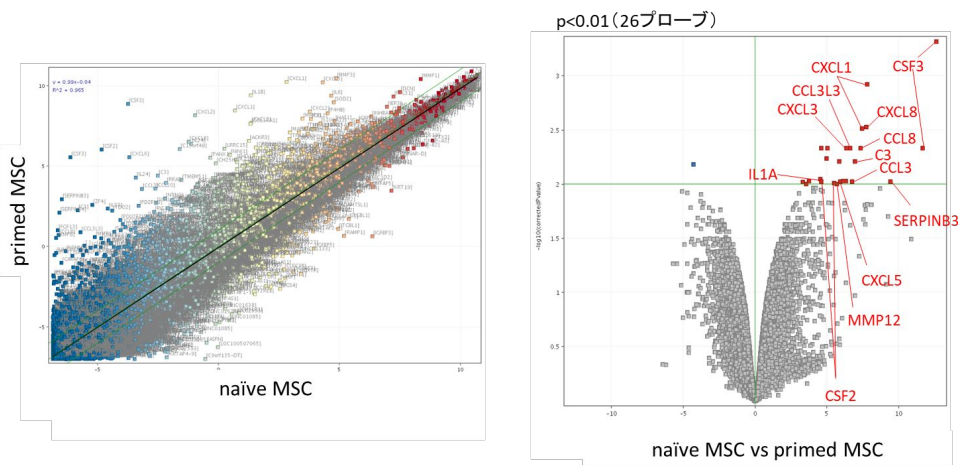


図2 naïve MSC vs primed MSC サイトカインアレイ発現比較

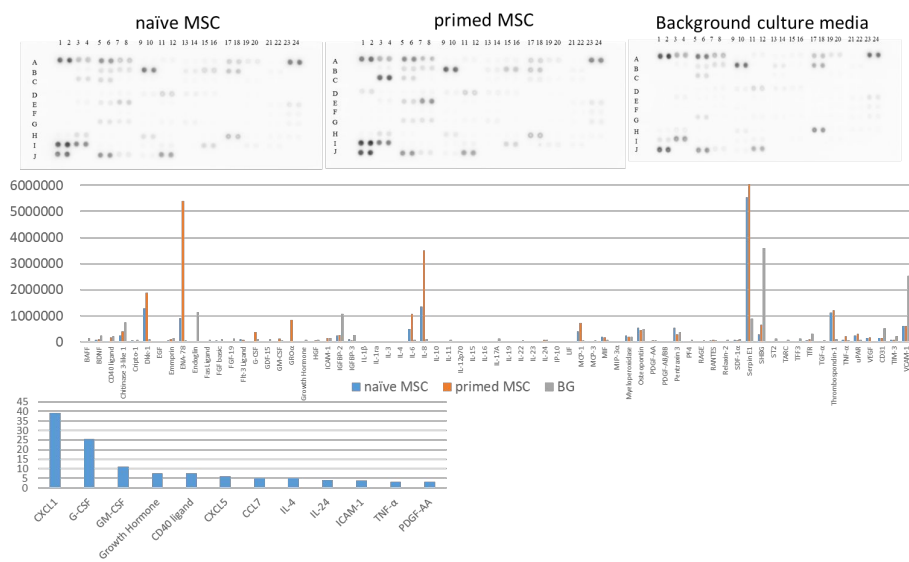
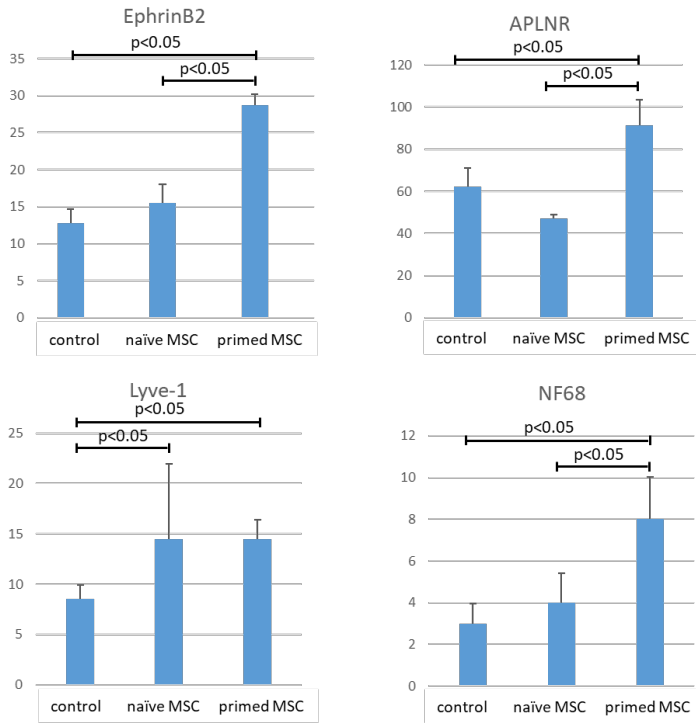


图3 陽性脈管数 (/投与領域視野)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Negoro Takaharu, Okura Hanayuki, Maehata Midori, Hayashi Shigekazu, Yoshida Satoru, Takada Nozomi, Matsuyama Akifumi	4. 巻 4
2. 論文標題 Trends in clinical trials for stroke by cell therapy: data mining ClinicalTrials.gov and the ICTRP portal site	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 npj Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41536-019-0082-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松山晃文・大倉華雪
2. 発表標題 Anti-Solid Tumor CAR-T Platform
3. 学会等名 再生医療Japan2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松山晃文・大倉華雪・吉田悟・高田のぞみ・林重一
2. 発表標題 Genetic instability should be checked in clinical application for pluripotent stem cell-derived clinical products?
3. 学会等名 第57回日本臓器学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松山晃文・大倉華雪・吉田悟・高田のぞみ・林重一
2. 発表標題 Current technical status of the detection methods of potential mass formation caused by impurities of PSCs-derived products.
3. 学会等名 第57回日本臓器学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	松山 晃文 (Matsuyama Akifumi) (10423170)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪はびきの医療センター(臨床研究センター)・次世代創薬創生センター・センター長 (84430)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------