

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17150

研究課題名（和文）重症虚血肢に対する細胞シート技術を応用した細胞塊注入法の再生治療効果の検討

研究課題名（英文）Development of novel cell administration method to augment tissue regenerative effect for critical limb ischemia

研究代表者

三宅 啓介（Miyake, Keisuke）

大阪大学・医学部附属病院・特任助教（常勤）

研究者番号：60774495

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：現状有効な治療法のない虚血性疾患に対しては、再生医療の役割が期待されてきた。一方で、高度の虚血炎症環境においては、投与物質の生着率が低いことが再生治療効果を制限することが問題となってきた。本研究では、高度の虚血炎症環境においても投与細胞の生着率を改善することにより、再生治療効果を向上させようとの仮説のもと研究を行った。本研究では、細胞同士を細胞外マトリックスによって連結した細胞集団として投与することによって、細胞死が生じにくくなり、虚血炎症環境においても、投与細胞が細胞単体投与時に比べて長期間生存し、血管新生、骨格筋再生効果をもたらすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞再生医療を虚血領域に直接投与する場合には、細胞単体投与はほとんど効果がなく、投与方法を改良し、細胞生着率を高める方法を用いなければ、十分な治療効果をもたらすことが難しいが、生着率を高める方法を用いれば、再生治療効果をもたらすことが明らかとなった。本研究は、実臨床での応用が期待される手法であり、今後、臨床試験に向けた手続きを取り組んでいく予定である。

研究成果の概要（英文）：Regenerative therapy has been expected to be a new solution for some ischemic disease that are difficult to treat with current medicine. However, in such ischemic diseases, severe ischemic and inflammatory environment of the disease make administered regenerative agents difficult to survive enough to show regenerative effect. Therefore to develop new and effective regenerative therapy, to solve the low survival rate of administered cells in the harsh environment is a prerequisite.

In this study, we developed a way to improve the cell survival rate in the harsh ischemic and inflammatory environment: clustered cells that are composed of cells connected with extracellular matrices enabled to maximize cell survival rate and therefore showed high regenerative capacity in the severe ischemic status of lower limbs.

研究分野：再生医療

キーワード：下肢虚血

1. 研究開始当初の背景

世界中で閉塞性動脈硬化症(peripheral artery disease, PAD)の罹患者数は増加しており(2億人以上)標準治療である血行再建による治療が困難な症例が増えている。PAD全体の10%強を占めるとされる、重症型の重症虚血肢に対しては、血行再建術が標準治療法とされる一方で、重症虚血肢の20-40%程度は診断時点で標準的血行再建術が適応困難とされ、そうした治療困難例は予後が不良であることが明らかとなっており、有効な治療法がないことから解決策が求められてきた。そうした治療困難例に対する新しい治療法として、細胞再生治療が期待されてきた。これまでに、げっ歯類の急性下肢虚血モデルを用いて、様々な遺伝子治療、細胞治療が非臨床試験での有効性を根拠として、臨床適応が試されてきた。しかしながら、実臨床でのPADに対する再生治療の有効性はほとんど示すことができず、結果的に最近のPAD治療に関するガイドラインにおいて、再生治療は非推奨とされており、治療困難例に対する治療法は未だにないのが現状である。

再生治療が現実のPAD患者において効果が乏しい原因としては、PADの重度虚血・慢性炎症環境が投与物質の生着率を低下させること、および従来の動物虚血モデル(急性炎症・慢性炎症)と実際のPADの病態(慢性炎症・慢性虚血)の乖離が原因と考えられてきた。

2. 研究の目的

本研究においては、ヒトでの虚血炎症状態と、動物での虚血炎症状態の乖離をうめるための、新しい虚血・炎症モデルの作成を行い、そのモデルを用いて、細胞再生治療効果を検証し、ヒトの重症虚血に対して使用可能な細胞再生治療法を開発することを目的とした。本研究においては、細胞シート技術を使用して、作成した、細胞外マトリックスを含有した状態である細胞集塊は虚血炎症環境下においても生着率を高めることが可能であり、結果的に、ヒトに近い状態での虚血炎症環境において再生治療効果を発揮しうるとの仮説のもとに研究を実施した。

3. 研究の方法

本研究においては、PAD患者の虚血状態に近づけるために、マウスの下肢において慢性重症虚血状態を作成した。従来の急性虚血モデルについては慢性的な虚血モデルを作ることが困難なために適応されてきたため、本研究においては、血管の虚血作成方法を複数検証、結紮部位を変化させることにより、虚血の改善と並びに変賞状態の推移を確認した。慢性炎症環境を実現するために、虚血導入後の血管新生状態、ならびにマクロファージに代表される炎症細胞の推移を観察し、最も血管新生が少なく、炎症細胞が遷延する状態のモデルを確認し、本研究で使用する慢性高度虚血モデルとした。

細胞作成については、当教室でこれまでに作成実績のあった、筋芽細胞を用いた細胞シート技術を用いて、細胞集塊を作成した。細胞集塊については、細胞外マトリックスの評価ならびに、細胞集塊でのサイトカインの分泌能等を検証した。この細胞集塊を高度虚血モデルに対して投与することにより、組織学的な評価を実施した。

組織学的な評価として、細胞生着率の検証のためにはGFP陽性の筋芽細胞を使用した。血管新生に加えて、骨格筋再生効果ならびに、炎症の変化についても検証を実施した。骨格筋再生効果の検証については、骨格筋関連の遺伝子発現の変化、形態変化、ならびに骨格筋の前駆細胞である筋芽細胞に対する細胞集塊の効果を検証した。加えて、炎症の変化についてはマクロファージの数的変化、ならびにフェノタイプの変化について検証を行った。

4. 研究成果

本研究において、従来の細胞再生治療効果を検証するモデルと違うモデルを作成し、細胞再生治療効果の違いの検証を行った。本研究で作成した、高度虚血・慢性炎症モデルにおいては、従来有効とされてきた細胞治療は、ヒトでの結果と同様に全く効果を示すことができず、慢性虚血・炎症環境においては、細胞単体投与が治療効果を示すことは困難であるという仮説を裏付ける結果となった。細胞単体投与は、当初の仮説通り、ほとんど生着することができず、術後早期にほとんどが失われており、結果的に再生治療効果はなかった。これは、別

の細胞種をもちいても同様の結果であり、細胞治療全般において、慢性虚血炎症環境は細胞治療効果を示すのには困難な環境であることが明らかとなった。

一方で、細胞を単体で投与するのではなく、集団として連結した状態で投与する、細胞集塊投与法は、細胞単体投与と比較して有意に高い細胞生着効果を示す結果をえた。この理由としては、細胞同士が細胞同士を細胞外マトリックスによって連結することにより、細胞間のシグナル伝達が可能となり、アポトーシス抵抗性となること、また、細胞を取り囲む細胞外マトリックスが投与時の接着因子として作用することで、組織にとどまりやすいこと、また細胞が塊として存在することによって細胞単体と比較して大きいというサイズによる影響によって組織に留まりやすいことが想定された。本研究では、細胞集塊投与方によって、虚血炎症環境においても、投与細胞が細胞単体投与時に比べて長期間生存させることが可能となり、結果的に血管新生、骨格筋再生効果をもたらすことが明らかとなった。

本研究では、細胞再生医療を虚血領域に直接投与する場合には、細胞単体投与はほとんど効果がなく、投与方法を改良し、細胞生着率を高める方法を用いなければ、十分な治療効果をもたらすことが難しいが、生着率を高める方法を用いれば、再生治療効果をもたらすことが明らかとなった。

本研究は、実臨床での応用が期待される手法であり、今後、臨床試験に向けた手続きを取り組んでいく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyake Keisuke, Miyagawa Shigeru, Harada Akima, Sawa Yoshiki	4. 巻 30
2. 論文標題 Engineered clustered myoblast cell injection augments angiogenesis and muscle regeneration in peripheral artery disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 1239 ~ 1251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2022.01.008	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 該当する

1. 著者名 Miyake Keisuke, Miyagawa Shigeru, Sawa Yoshiki	4. 巻 10
2. 論文標題 Method to Improve Administered Cells Via Intramuscular Route to Augment Efficacy of Regenerative Cell Therapy in The Field of Peripheral Artery Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Cell Biology	6. 最初と最後の頁 26 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.53043/2320-1991.acb90020	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三宅 啓介、河村拓史、原田 明希摩、澁谷 卓、宮川 繁
2. 発表標題 マウス下肢虚血モデルにおける筋芽細胞集塊投与の炎症制御・組織修復効果
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2021年 ~ 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------