

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2015
課題番号：25462161
研究課題名(和文) 大動脈瘤に対する幹細胞静脈投与療法の可能性

研究課題名(英文) Stem Cell Therapy for Aortic Aneurysm

研究代表者

成田 裕司 (Narita, Yuji)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60378221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈瘤に対する治療の基本は、破裂を予防するための人工血管置換術である。しかし、時にこの治療法は侵襲が大きく、臨床現場においてリスクの高い患者への手術を躊躇する場合がある。我々は治療の低侵襲化を期待して、大動脈瘤に対する幹細胞療法(大動脈リーバースリモデリング療法)の開発を行ってきた。本研究では、この治療法の最適化を試みた。

骨髄由来間葉系幹細胞の静脈内投与は大動脈瘤発症を予防した。また、大動脈瘤の治療効果も発揮したが2週間でその効力が減退した。細胞源は脂肪由来幹細胞や、皮膚線維芽細胞より、骨髄由来間葉系幹細胞の方が効果的であった。同種間葉系幹細胞を用いた治療でも、一定の効果を発揮した。

研究成果の概要(英文)：We have reported intravenous administration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) reduce the incidence of aortic aneurysm. However, optimal injected cell number, injected interval, timing of administration and optimal cell sources were unknown. In this study, we tried to explore optimal stem cell therapy for aortic aneurysm.

Intravenous administration of BM-MSCs not only prevented growth of aortic aneurysm, but conducted regression of aortic aneurysm. The aortic aneurysm was prevented by every 4 weeks administration of BM-MSC; however, it could not achieve by single administration. The regression of aortic aneurysm was maintained until 2 weeks after administration of BM-MSCs. The administration of BM-MSCs was better for regression of the aortic aneurysm than that of adipocyte-derived MSCs or fibroblast. The administration of allogenic BM-MSCs was effective treatment for aortic aneurysm as same as that of autologous BM-MSCs.

研究分野：心臓外科学

キーワード：大動脈瘤 細胞療法 間葉系幹細胞 同種移植 リバースリモデリング

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化の終末像である大動脈瘤の罹患者は本邦において年々増加しており、手術症例も同様に右肩上がりであり上昇している。標準的な治療法である人工血管置換術は、瘤破裂の予防効果は絶対的であるが、手術侵襲が大きい。特に、胸部または胸腹部大動脈瘤は手術成績も他の心臓血管外科手術に比して悪く、高齢でリスクの高い、これらの疾患を持った患者の対応に苦慮する場合がある。我々はこれまでに『幹細胞』が有する抗炎症作用や免疫抑制作用、傷害組織への集積作用に着目し、骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)シート移植による大動脈瘤治療の有効性を明らかにしてきた。しかし、シート移植に伴う手術侵襲が懸念されるため、本研究ではより簡便で低侵襲な治療方法として、BM-MSC 静脈投与による大動脈瘤治療を試みる。これまでに BM-MSC の 1 回静脈投与を試みてきたが、治療効果が一定でないことが分かった。従って、本研究では大動脈瘤治療に適した投与回数最適化を図る。加えて、BM-MSC 以外の細胞源や allogenic MSC による大動脈瘤治療も試みる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大動脈瘤の幹細胞治療において、よりよい細胞の投与方法や細胞種の選定を比較検討し、大動脈瘤の幹細胞治療における最適な条件を見いだすことである。

3. 研究の方法

(1)大動脈瘤予防モデルにおける、投与回数最適化: BM-MSC の 1 回投与方法と毎週 4 回投与方法との比較し投与回数を最適化する。

- ①大動脈瘤発症率
- ②エラスチン量の計測
- ③マクロファージの浸潤割合
- ④マトリクスメタロプロテアーゼ計測 (Zymography)
- ⑤炎症性ケモカイン・サイトカイン定量

(2)大動脈瘤治療モデルにおける細胞投与間隔最適化: 大動脈瘤形成後、BM-MSC を投与、2、4、8 週で評価を行い、投与間隔を最適化する。

- ①大動脈瘤発症率および大動脈瘤径の計測
- ②エラスチン量の計測
- ③マクロファージの浸潤割合
- ④マトリクスメタロプロテアーゼ計測 (Zymography)
- ⑤炎症性ケモカイン・サイトカイン定量

(3)細胞種・細胞源における細胞療法効果の差異 (BM-MSC vs 脂肪細胞由来 MSC vs 線維芽細胞)

- ①大動脈瘤発症率および大動脈瘤径の計測
- ②エラスチン量の計測
- ③マトリクスメタロプロテアーゼ計測 (Zymography)

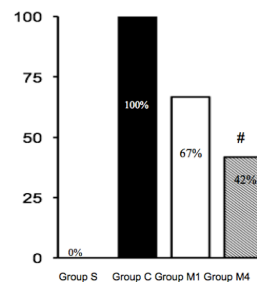
- (4)同種 BM-MSC を用いた治療
C57BL6 のマウスに BALB/C マウス由来の BM-MSC を用いた大動脈瘤治療を試みた。
①大動脈瘤発症率および大動脈瘤径の計測
②マトリクスメタロプロテアーゼ計測 (Zymography)

4. 研究成果

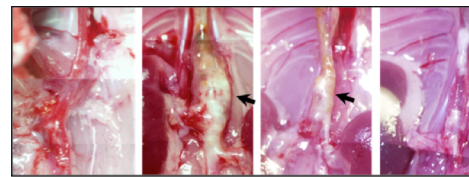
(1)大動脈瘤予防モデルにおける投与回数最適化: 1 回投与方法 vs 4 回投与方法

①大動脈瘤発症率

A Incidence of aortic aneurysms



発症率は 4 回投与で有意に低くなった。

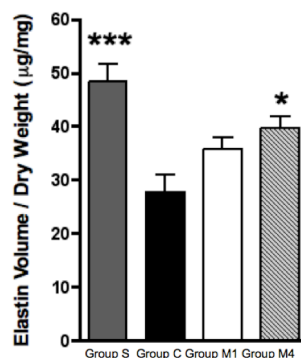


Group S Group C Group M1 Group M2

このように大動脈瘤は細胞投与回数に依存して発症しづらくなった。

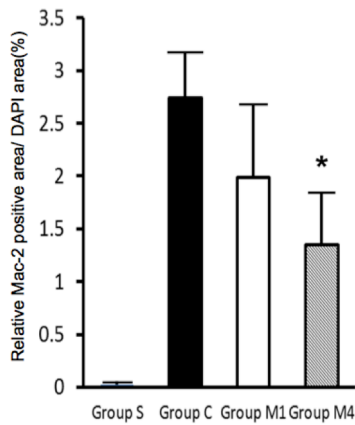
②大動脈壁エラスチン量の計測

Elastin content



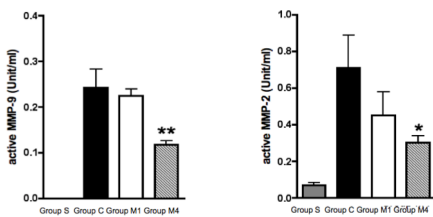
エラスチン量は 4 回投与で有意に維持された。

③マクロファージの浸潤割合



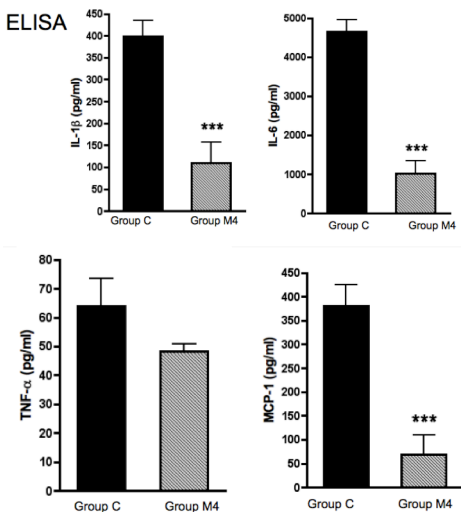
マクロファージも4回投与で有意に浸潤量が減少した。

④マトリクスメタロプロテアーゼ(MMP-9, MMP-2) 計測 (Zymography)



MMP-9 および MMP-2 は4回投与で有意に低下した。

⑤炎症性ケモカイン・サイトカイン定量

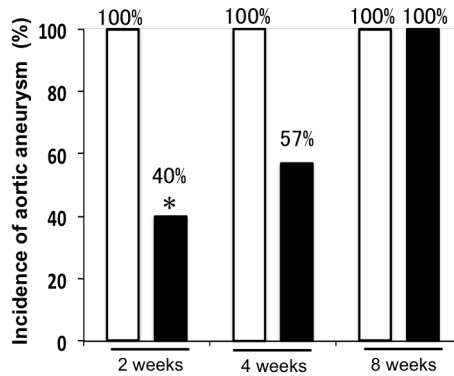
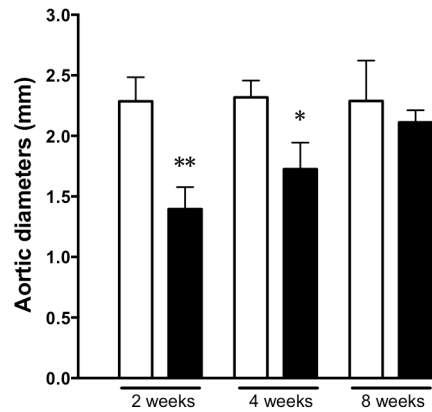


IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1 は有意に4回投与で低下していた。

小括：投与回数は4回投与が優れている。

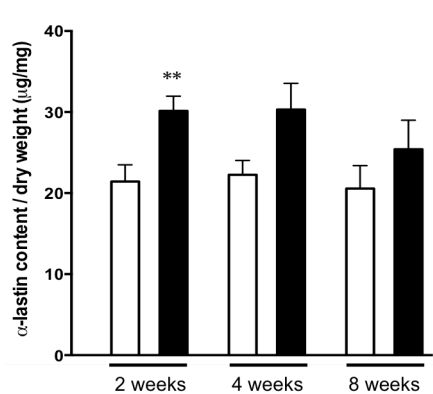
(2)大動脈瘤治療モデルにおける細胞投与間隔の最適化：2週 vs 4週 vs 8週

①大動脈瘤発症率および大動脈瘤径の計測



瘤径も発生率も2週で有意に低下していた。

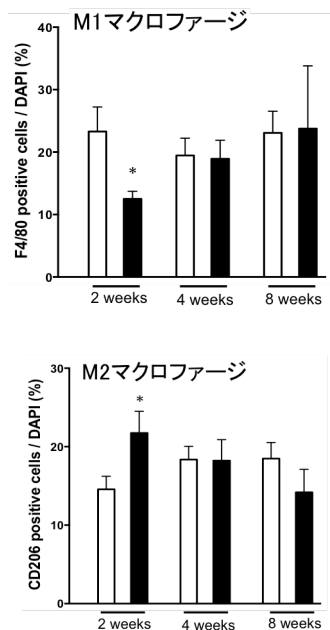
②エラスチン量の計測



□生食群 ■BM-MSC群

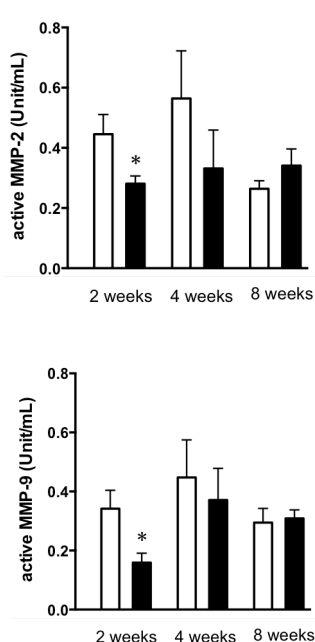
大動脈瘤壁中のエラスチン量は2週で有意に増加していた。

③マクロファージの浸潤割合



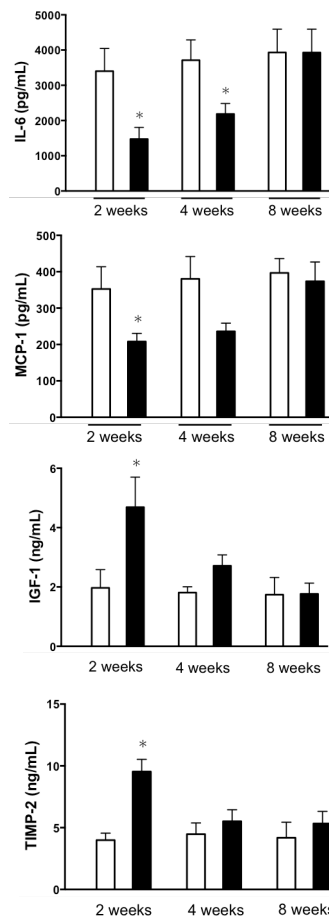
大動脈壁において、炎症性マクロファージ (M1)は、2週で有意に低下し、抗炎症性マクロファージ(M2)は、2週で有意に増加していた。

④マトリクスメタロプロテアーゼ計測 (Zymography)



大動脈壁の MMP-2, MMP-9 活性は、ともに2週で有意に低下していた。

⑤炎症性ケモカイン・サイトカイン定量

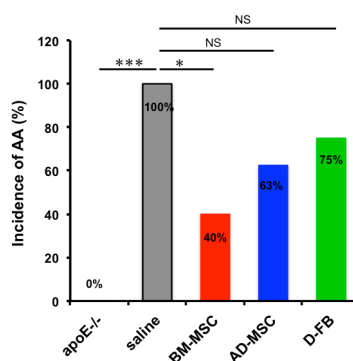


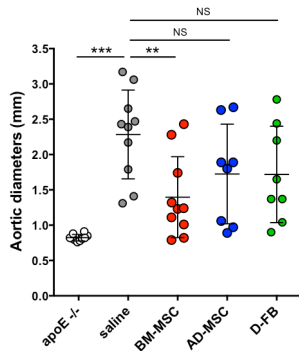
2週の時点で、炎症性サイトカイン・ケモカインは有意に低く、エラスチン合成促進因子、分解抑制因子は有意に高くなった。

小括：細胞治療は2週間維持された。従ってこの細胞数で治療した場合、投与間隔は2週間と判断できた。

(3)細胞種・細胞源における細胞療法効果の差異 (BM-MSC vs 脂肪細胞由来 MSC (AD-MSC) vs 皮膚由来線維芽細胞(D-FB))

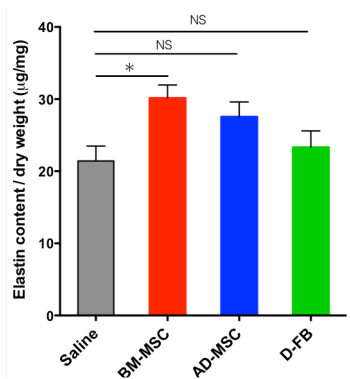
①大動脈瘤発症率および大動脈瘤径の計測





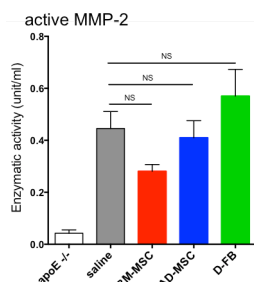
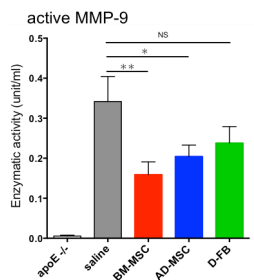
BM-MSC の投与が、大動脈瘤発症率・瘤径ともに低い傾向にあった。

② エラスチン量の計測



BM-MSC 投与は、大動脈壁のエラスチン量が多い傾向にあった。

③ マトリクスメタロプロテアーゼ計測 (Zymography)

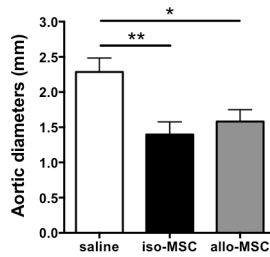
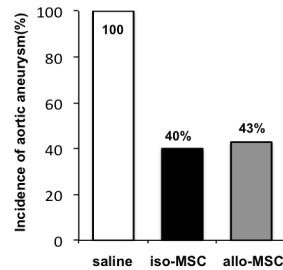


大動脈瘤壁における MMP-9 および MMP-2 の活性は、BM-MSC 投与群で低下している傾向にあった。

小括：どの細胞源も大動脈瘤に対する効果はあるが、BM-MSC が最も有効であることが示唆された。

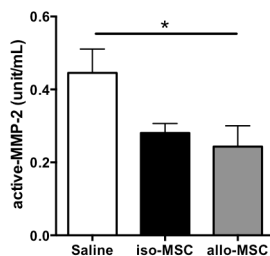
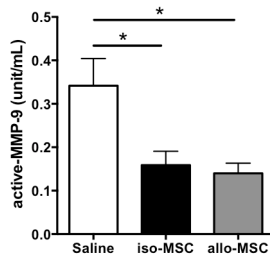
(4) 同種 BM-MSC を用いた治療
C57BL6 のマウスに BALB/C マウス由来の BM-MSC を用いた大動脈瘤治療。

① 大動脈瘤発症率および大動脈瘤径の計測



allogenic-MSCs を用いた治療でも、大動脈瘤発症率の低下および瘤径の縮小を認めた。

② マトリクスメタロプロテアーゼ計測 (Zymography)



MMP-9、MMP-2 ともに同種 MSCs で自己 MSC と同等の抑制効果があった。

小括：同種 MSC でも自己 MSC と同等の大動脈瘤治療効果があった。

*総括：大動脈瘤の間葉系幹細胞を用いた治療の開発において、細胞投与回数、投与間隔、細胞源、同種細胞などに関してある程度の最適化を行うことができ、本治療法の可能性に新たな側面を加えることが出来た。

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 2 件)

1. Yamawaki-Ogata A, Fu XM, Hashizume R, Araki Y, Oshima H, Narita Y*, Usui A. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in formed aortic aneurysm of mouse model. Eur J Cardiothorac Surg 2014;45:e156-65 (査読有)
2. Yamawaki-Ogata A, Hashizume R, Fu XM, Usui A, Narita Y* Mesenchymal stem cells for treatment of aortic aneurysm. World J Stem Cells 2014;6:278-287. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1. 緒方藍歌、小坂井基史、伊藤英樹、成田裕司、碓氷章彦 「間葉系幹細胞エクソソームによる大動脈瘤治療の可能性」 第 15 回日本再生医療学会総会 大阪国際会議場 大阪府大阪市 2016 年 3 月 17-19 日
2. Kozakai M, Yamawaki-Ogata A, Ito H, Oshima H, Narita Y, Usui A. 「Alternative Therapeutic Strategy for Aortic Aneurysm Using Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes」 52nd The Society of Thoracic Surgeons Annual meeting, Phoenix USA, 2016.1.23-27.
3. Yamawaki-Ogata A, Kozakai M, Usui A, Narita Y. Exosomes obtained from mesenchymal stem cells as a novel therapeutic tool for aortic aneurysm 4th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) World Congress, Boston USA, 2015.9.8-11
4. Yamawaki-Ogata A, Usui A, Narita Y. BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS TREATED AORTIC ANEURYSM VIA NF-KB AND AKT SIGNAL PATHWAY IN MICE」 International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 13th Annual meeting, W-1495, Stockholm, Sweden, 2015.6.24-27.
5. 成田裕司、緒方藍歌、橋詰令太郎、符顕

明、大島英揮、碓氷章彦. 大動脈瘤に対する再生医療的アプローチ -治療の低侵襲化を目指して- 第 45 回日本心臓血管外科学会 シンポジウム 4 心血管領域における再生医療の最前線 国立京都国際会館 京都府京都市 2015 年 2 月 16-18 日

6. 緒方藍歌、成田裕司、佐藤恵一、大島英揮、碓氷章彦. 大動脈瘤に対する細胞治療におけるシグナル伝達機構 第 14 回日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市 2015 年 3 月 19-21 日
7. 成田裕司、緒方藍歌、六鹿雅登、荒木善盛、阿部知伸、大島英揮、碓氷章彦. 大動脈瘤に対する幹細胞療法 -投与細胞による治療効果の差異- 第 67 回 日本胸部外科学会 福岡国際会議場 福岡県福岡市 2014 年 9 月 30 日-10 月 3 日
8. 成田裕司、緒方藍歌、符 顕明、荒木善盛、阿部知伸、大島英揮、碓氷章彦. 大動脈瘤に対する幹細胞療法 -投与法による大動脈瘤進展抑制効果の違い- (会長要望演題 ; 口演) 第 44 回日本心臓血管外科学会 ホテル日航熊本 熊本市 2014 年 2 月 19-21 日
9. Narita Y, Yamawaki-Ogata A, Fu X, Araki Y, Oshima H, Usui A. Stem cell therapy for treatment of aortic aneurysm in mice. 27th EACTS, Vienna, Austria, Oct. 7-9, 2013

6. 研究組織

(1)研究代表者

成田 裕司 (NARITA, YUJI)
名古屋大学・医学系研究科・講師
研究者番号：60378221

(2)研究分担者

碓氷 章彦 (USUI, AKIHIKO)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：30283443

大島 英揮 (OSHIMA, HIDEKI)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40378188

緒方 藍歌 (OGATA, AIKA)
名古屋大学・医学系研究科・研究員
研究者番号：70718311
(平成 26 年度-平成 27 年度)

岡田 正穂 (OKADA, MASAHO)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号：20566989
(平成 26 年 9 月まで分担)