

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293184

研究課題名(和文)自己脂肪組織由来幹細胞を用いた心血管系再生医療の総合的開発研究

研究課題名(英文)Therapeutic angiogenesis using autologous adipose-derived regenerative cells

研究代表者

室原 豊明(MUROHARA, TOYOAKI)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90299503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、糖尿病・脂質異常症などに起因する動脈硬化症や、強皮症などの膠原病・国の指定難病のバージャー病などで末梢の動脈が閉塞し、安静時の痛みや皮膚の潰瘍などがある患者さんに対する「血管再生医療」に関して研究を行った。患者自身から採取した間葉系の幹細胞である「皮下脂肪組織由来再生細胞(ADRC)」を虚血骨格筋内に細胞移植し、毛細血管を再生させて潰瘍や痛みなどを治療する再生医療である。すでに臨床応用には至っているが、依然血管再生機序に関わる疑問点や、治療に反応する患者の予知等に関する基礎的な検討を継続している。また、他の分子(硫化水素など)による関連した血管再生研究も同時に行った。

研究成果の概要(英文)：Our final goal of this research series is to establish the clinical therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia manifesting rest pain and/or ischemic skin ulcer due to atherosclerotic disease, Burger's disease and connective tissue diseases such as scleroderma (PSS). To this end, we have established mouse, rat and rabbit model of hind limb ischemia, and we examined the effects of the implantation of autologous adipose-tissue derived regenerative cells (ADRCs), one of the mesenchymal stem cell class, on limb blood perfusion and angiogenesis in these animal models. We also tested the effects of combination of several drugs and ADRCs, H₂S on angiogenesis in hind limb ischemia model. We have already performed clinical cases using ADRC injection to patients with critical limb ischemia, and examined the possible biomarkers that can predict the salutary efficacy of this procedure. For example, we are focusing on the role of VEGF-A165b and circulating CD34+ cells.

研究分野：循環器内科学

キーワード：再生医療 血管再生療法 幹細胞 四肢虚血 脂肪組織由来幹細胞 血管内皮細胞 皮下脂肪組織 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

1990年代から血管内皮増殖因子(VEGF-A)などの遺伝子や蛋白を用いた血管再生療法に関する治療研究がスタートし、その後浅原博士や我々のグループが血管内皮前駆細胞(Endothelial progenitor cell: EPC)の存在に関する知見を発表した(*Science*. 1997)。その後EPCが骨髄から動員されることが証明され、その成果をもとに、重症虚血肢患者に対して自己骨髄単核球細胞移植による血管再生療法をTR研究として立ち上げて来た。これらの研究は一定の成果を見せたが(*Lancet*. 2002)、骨髄細胞による再生治療には、重症糖尿病や透析患者などの治療不応例も存在することが判明した。また自己骨髄液を採取するという侵襲的な処置もあるために、全身状態の悪い患者には適応できない。以上より我々は骨髄単核球以外の移植細胞源を探索してきた。

2001年にZukらにより、皮下脂肪組織中には多分化能を有する間葉系幹細胞が存在することが報告された。骨髄細胞に比べこの脂肪組織由来幹細胞(adipose-derived regenerative cell: ADRC)は、比較的容易に採取できること、また骨髄由来細胞とほぼ同等の組織再生能力を持っていることなどから、自己骨髄に代わる新たな体性幹細胞の起源として期待されるようになった。マウスモデルでは、皮下脂肪由来ADRCの移植は虚血組織の血管再生を増強させた(Kondo K. et al. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 2009)。その後我々は、TR研究として自己ADRC移植に寄る血管再生療法のヒトへの応用を試みた。

2. 研究の目的

今回の申請研究では、自己皮下脂肪組織由来間葉系再生細胞(ADRC)を用いた心臓血管系組織の総合的な再生医学研究を行う。

さらに重症末梢動脈疾患および虚血性心疾患に対する血管再生療法の開発を目指す。

(1) すでにADRC移植による重症下肢虚血患者の血管再生医療は開始しているが、「臨床と基礎研究の往還」は極めて重要な研究手法であり、引き続き臨床での疑問点は、基礎医学的手法を用いて平行して検討を進める。

(2) 下肢虚血・重症心筋虚血モデルにおいて、ADRC移植による血管再生研究を推進する。特に心筋虚血では、独自の細胞シートの作成を行い、動物における応用研究を行う。

(3) 临床上問題となっている、術後リンパ浮腫に焦点を当て、ADRC移植によるリンパ管再生・リンパ浮腫の改善効果について小・大動物を用いた実験系の確立と効果判定実験を行う。

3. 研究の方法

重症四肢虚血患者に対するADRC移植の血管再生療法については、以前に我々は厚生労働省「ヒト幹細胞臨床研究審査会」から承認を得た。また平成26年度はこの臨床研究をさらに推進し、データの収集を行った。途中で余儀なく下肢切断があったような場合の組織の病理学的検討等については、本研究費により進めた。また、「臨床と基礎研究の往還」は、重要な研究手法であり、引き続きADRC移植による血管再生のメカニズム研究、長期効果などについては平行して研究を進めた。ADRCは間葉系の細胞であり、骨格筋細胞の刺激・再生作用を介した効果や、末梢神経機能に対する影響等も検討した。具体的には、ウサギ片側下肢虚血モデル作製7日後に、ウサギを無作為に3群に分け、それぞれにADRC、骨髄単核球(陽性コントロール)、陰性コントロールとして生理食塩水を虚血骨格筋内へ移植し、移植4週間後に有効性と安全性の評価を行った。評価項目は、虚血組織における血管新生効果、虚血/正常下腿血圧比の測定、下肢血管造影、CD31免疫染色による毛細血管密度の定量評価、組織中サイトカイン・成長因子の定量などを行った。

また心筋組織のADRC移植による血管再生療法についても、実験モデルを立ち上げた。またマウス心筋梗塞モデルを作製し、無作為に2群に分け、それぞれにADRC、陰性コントロールとして生理食塩水を筋肉組織へ移植した。移植2週間後に心臓を摘出し、免疫染色により左室エリア、虚血エリア、梗塞エリアを同定し、心筋梗塞サイズの定量評価を行った。併せてTUNEL染色による心筋細胞死の観察、免疫組織染色による毛細血管密度の定量評価を行った。加えて移植したADRCから産生されるVEGF-A、bFGF、SDF-1などの各種増殖因子やケモカインをDNAマイクロアレイおよびサイトカインアレイを用いて網羅的に解析した。またこの後に述べるADRC細胞シートを作成し、同様のマウス心筋梗塞モデルを作成し、細胞シート移植群、細胞浮遊液注入群、生理食塩水群に分けて、それぞれ同様の効果を判定した。特に細胞シート移植群では、移植した細胞片の組織内定着、毛細血管再生、細胞の停留度合い、長期効果について検討を行った。マウスの心筋梗塞モデル作

製については、すでに当科では実績がある。

引き続き、マウス心筋梗塞モデルを作成し、ADRC 細胞シートを作製し、これによる血管再生研究を行った。細胞シート移植群、細胞浮遊液注入群、生理食塩水群に分けて、それぞれの効果を判定した。細胞シート移植群では、移植した細胞片の組織内定着、毛細血管再生、細胞の組織内存在、長期効果について検討を行った。さらに、ADRC 移植後に懸念されるなんらかの腫瘍や移植後不整脈の発生などの危険性について、遺伝子および病理学的検査、心電図検査を用いて安全性の確認を行った。

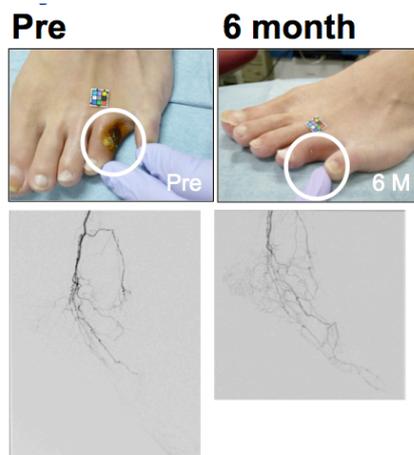
マウスにて有効性及安全性を確認された後に、大型動物（ミニブタ）を用いて、急性心筋梗塞モデルに対する ADRC 移植の有効性を確認する前臨床試験を行う予定であった。ミニブタ心筋梗塞モデルは既に確立していた。

4. 研究成果

我々のグループではこれまでに、従来治療法では四肢切断が余儀なくされると判断された Fontaine 3~4 度の重症虚血肢を有する 8 症例に対して、本血管再生療法を実施し、施行後の追跡調査を 6 ヶ月間行った。今回、いずれの症例も Buerger 病または PSS や SLE などの膠原病に伴う難治性皮膚潰瘍を有する Fontaine 4 度の患者であった。細胞移植治療後、安静時および歩行時の疼痛の改善（VAS score）、皮膚潰瘍の縮小ないし消失、SPP 検査においても血流改善を示唆する所見などが認められた。現時点において、8 症例とも出血、感染、肺塞栓症などの周術期合併症や血管新生に伴う有害事象の発生を認めていない（図 1、2 に代表的な症例の潰瘍写真を提示する）。



(図 1)

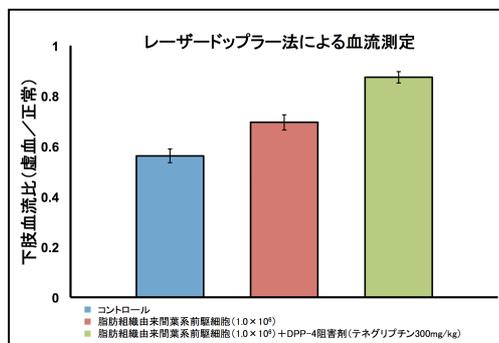


(図 2)

平成 28 年度からは、症例数のさらなる増加を図るため、名古屋大学を統括研究機関とした多施設共同臨床研究（信州大学、金沢大学、聖マリアンナ医科大学、千葉大学、獨協医科大学、久留米大学、福岡徳洲会病院の 8 大学（施設））で、全国協働臨床研究体制に移行した。本形態になってからの臨床研究に関しては、再生医療等の安全性の確保等に関する法律（いわゆる再生医療新法）に準拠した形で本臨床研究の再生医療等計画書を作成し、平成 27 年 11 月名古屋大学特定再生医療等委員会に承認を得た後、東海北陸厚生局に届け出し受理された。本臨床研究の質と安全性を担保するため、各共同研究施設で本治療が初めて行われる際は、共同研究施設に名古屋大学から研究開発分担者を派遣している。平成 28 年度からの本試験移行後では、すでに 7 症例の ADRC 細胞移植血管再生治療を終了している。これらの成果に関しては、将来論文等で報告する予定である。

本治療の該当患者は、糖尿病、高血圧、脂質代謝異常をはじめとする生活習慣病危険

(図 3)



因子を有していることが多いため、各種生活習慣病やそれらの治療薬と ADRC 移植における血管再生効果の相互作用の有無などにつき動物モデルを用いて検討している。これ

までの我々の研究から、ADRC は SDF-1 を高濃度産生していることが明らかにされている (Kondo K. et al. ATVB. 2009)。また SDF-1 は、インクレチンを分解する事で有名な DPP4 の基質にもなっている。このため、マウス下肢虚血モデルに糖尿病治療薬である DPP4 阻害剤を ADRC 移植の際に投与したところ、その血管新生効果が増強することが確認された (論文準備中) (図 3)。DPP-4 阻害剤が ADRC 細胞移植の血管新生効果を増強させる可能性が示唆された。

また我々は平行して ADRC の細胞シート作製を試み、実際にマグネタイト・リポソーム系を用いた細胞シート作製に成功した。この細胞シートをマウス心筋梗塞モデルに移植したところ、心筋組織の線維化の減少、組織内血管再生の増強効果がみられ、これらは心筋梗塞後の心機能の有意な回復につながった (Ishii M et al. Int. J. Cardiol. 2014)。将来的に、自己 ADRC を細胞シート化し、心筋梗塞後の心機能低下例に応用出来る可能性がある。

5. 主な発表論文等 (全て査読あり)

(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 7 件)

1. Hayashida R, Kondo K, Morita S, Unno K, Shintani S, Shimizu Y, Calvert JW, Shibata R, Murohara T. Diallyl Trisulfide Augments Ischemia-Induced Angiogenesis via an Endothelial Nitric Oxide Synthase-Dependent Mechanism. *Circ. J.* 2017 in press. doi: 10.1253/circj.CJ-16-1097.
2. Sawaguchi S, Varshney S, Ogawa M, Sakaidani Y, Yagi H, Takeshita K, Murohara T, Kato K, Sundaram S, Stanley P, Okajima T. O-GlcNAc on NOTCH1 EGF repeats regulates ligand-induced Notch signaling and vascular development in mammals. *eLife.* 2017;6. pii: e24419. doi: 10.7554/eLife.24419
3. Ohashi K, Enomoto T, Joki Y, Shibata R, Ogura Y, Kataoka Y, Shimizu Y, Kambara T, Uemura Y, Yuasa D, Matsuo K, Hayakawa S, Hiramatsu-Ito M, Murohara T, Ouchi N. Neuron-derived neurotrophic factor functions as a novel modulator that enhances endothelial cell function and revascularization processes. *J. Biol. Chem.* 2014;289(20):14132-14144. doi: 10.1074/jbc.M114.555789.
4. Ishii M, Shibata R, Shimizu Y, Yamamoto T, Kondo K, Inoue Y, Ouchi N, Tanigawa T, Kanemura N, Ito A, Honda H, Murohara T. Multilayered adipose-derived regenerative cell sheets created by a novel magnetite tissue engineering method for myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 2014;175(3):545-553. doi:

10.1016/j.ijcard.2014.06.034.

5. Hao C, Shintani S, Shimizu Y, Kondo K, Ishii M, Wu H, Murohara T. Therapeutic angiogenesis by autologous adipose-derived regenerative cells: comparison with bone marrow mononuclear cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2014;307(6):H869-879. doi:10.1152/ajpheart.00310.2014.
6. Ishii M, Shibata R, Kondo K, Kambara T, Shimizu Y, Tanigawa T, Bando YK, Nishimura M, Ouchi N, Murohara T. Vildagliptin stimulates endothelial cell network formation and ischemia-induced revascularization via an endothelial nitric-oxide synthase-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 2014;289(39):27235-27245. doi: 10.1074/jbc.M114.557835.
7. Kikuchi R, Nakamura K, MacLauchlan S, Ngo DT, Shimizu I, Fuster JJ, Katanasaka Y, Yoshida S, Qiu Y, Yamaguchi TP, Matsushita T, Murohara T, Gokce N, Bates DO, Hamburg NM, Walsh K. An antiangiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease. *Nat. Med.* 2014;20(12):1464-1471. doi: 10.1038/nm.3703.

[学会発表] (計 9 件)

1. 近藤和久、林田 竜、柴田 玲、室原豊明
Therapeutic Angiogenesis using Somatic Stem Cells for Critical Limb Ischemia-From Bone Marrow to Adipose 第 24 回日本血管生物医学学会学術集会 2016 年 12 月 8 日~10 日 長崎ブリックホール (長崎県長崎市)
2. 柴田 玲、室原豊明: Therapeutic angiogenesis by iPS cells: 第 79 回日本循環器学会学術集会: 2015 年 4 月 24 日~26 日 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

[図書] (計 1 件)

1. Murohara T, Kondo K. Therapeutic Angiogenesis With Adipose Tissue-derived Regenerative Cells. in [*Therapeutic angiogenesis*] Edited by Higashi Y. & Murohara T. Springer. 2017 in press. (印刷中)

6. 研究組織

(1)研究代表者

室原 豊明 (MUROHARA, Toyoaki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 90299503

(2)研究分担者

柴田 玲 (SHIBATA, Rei)
名古屋大学・医学部・寄附講座准教授
研究者番号 : 70343689

新谷 理 (SHINTANI, Satoshi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号 : 20309777

(平成 27 年 10 月まで研究分担者)

近藤 和久 (KONDO, Kazuhisa)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号 : 90644659