

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462012

研究課題名(和文) 炎症性腸疾患患者に対する自己脂肪由来幹細胞治療の安全性と有効性に関する研究

研究課題名(英文) Feasibility and efficacy of autologous adipose-derived stem cell therapy for inflammatory bowel disease patients

研究代表者

水島 恒和 (Mizushima, Tsunekazu)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：00527707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患(IBD)患者の皮下脂肪組織に含まれる脂肪由来幹細胞数は非 IBD 患者に比し、有意に多かった。術後難治性腸管皮膚瘻に対する自己皮下脂肪組織由来幹細胞移植術は IBD 患者 6 例に対して安全に実施可能であり、短期的に有効であった。マウス脂肪由来幹細胞を用いた実験では、TNF- α の添加により有意に増殖能、運動能が更新した。

研究成果の概要(英文)：The number of adipose-derived stem cells contained in the subcutaneous adipose tissue of inflammatory bowel disease (IBD) patients was significantly larger than that of Non-IBD patients. Autologous subcutaneous adipose tissue derived stem cell transplantation for refractory postoperative enterocutaneous fistula could be safely performed on IBD patients and was effective in the short term. In experiments using murine adipose-derived stem cells, proliferation and motility were significantly enhanced by the addition of TNF- α .

研究分野：医歯薬学

キーワード：炎症性腸疾患 潰瘍性大腸炎 クローン病 脂肪由来幹細胞

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) として総称される潰瘍性大腸炎 (UC)、クローン病 (CD) は若年層を中心として好発する腸管の難治性慢性炎症性疾患である。IBD の発症には遺伝的素因と環境的要因が関与していると考えられているが、その病因は未だ完全に解明されていない。以前は、IBD の治療としてアミノサリチル酸製剤やステロイドといった非特異的抗炎症薬や完全静脈栄養、成分栄養剤による腸管安静といった疾患非特異的な治療が行われていた。近年の研究により、消化管における腸内細菌叢に対する免疫応答の異常が、IBD の病因に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある (Hugot JP., et al. Nature, 2001, Ogura Y., et al. Nature, 2001)。それに伴い治療法も変化し、炎症反応を引き起こす免疫異常の抑制を目的としたアザチオプリン、6-MP など免疫調節薬や、炎症の中心分子である TNF- α を標的とした抗 TNF- α 製剤の投与が行われるようになり、治療成績も大きく向上している (Sandborn WJ., et al. Am J Gastroenterol, 1996, Targan SR., N Engl J Med, 1997)。その結果、治療の目標も従来の臨床的寛解 (患者さんが症状なく日常生活を送ることができる状態)、血清学的寛解 (血液検査上炎症反応なくコントロールされた状態) から内視鏡的寛解 (内視鏡で粘膜治癒が得られた状態) へと変化しつつあり、内視鏡的寛解が達成できれば長期的な予後の改善 (再燃率、手術率の低下) が期待しうることとも報告されている (Neurath MF, Travis SP. Gut, 2012)。しかし、この様に疾患のメカニズムに基づく治療の導入にもかかわらず、IBD 患者における粘膜治癒の達成は依然として困難である。

難治性疾患に対する幹細胞の応用が開始されており (Venkataramana NK. Et al., Transl Res, 2010, Perin EC. et al., Am Heart J, 2012) 様々な疾患に対する適応拡大が期待されている。幹細胞には、受精卵由来の胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell、ES 細胞)、胎児由来の胎性生殖細胞 (Embryonic Germ Cell、EG 細胞)、組織幹細胞の 3 種類がある。これらの幹細胞は多分化能と自己複製能を有し、このため生体は常に細胞を補給できる仕組みを持っていることになる。皮膚、腸管上皮、骨髄血などでは常に細胞が分裂・分化して組織の恒常性を維持しており、組織における再生の主役的役割を果たしているのが「組織幹細胞」であると考えられている。間葉系幹細胞の 1 つである脂肪由来幹細胞 (ADSCs) も脂肪のみでなく心筋、骨、軟骨、神経、肝臓などに分化する多能性を有していることが明らかになった (Zuk PA., et al. Tissue Eng, 2001)。脂肪組織は骨髄に比べはるかに多くの幹細胞を含み、培養が不要であり、採取に伴う患者への侵襲が少ないなどの利点がある。また、ADSCs は抗炎症作用や血管新生作用を有す

ることも報告されており、炎症や血流障害を伴う病態に対する応用も期待されている (Murohara T. et al., J Cardiol, 2009)。

2. 研究の目的

本研究は臨床研究「消化器外科手術に伴う難治性皮膚瘻に対する自己脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた組織再生医療の臨床応用」(UMIN000007316) に参加した IBD 患者に対する自己 ADSCs 治療の安全性、有効性を検討し、IBD 患者と非 IBD 患者の ADSCs の特性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

消化器外科手術に伴う臓器、体腔内感染、縫合不全に起因する皮膚瘻を有し、ドレナージ、洗浄、搔爬、抗生剤投与や人工肛門造設などによる治療を行っても 1 ヶ月間以上治癒が得られていない IBD 患者 6 名に幹細胞治療を実施した。

[細胞の採取方法] 手術室において、全身麻酔下に患者自身の腹壁もしくは臀部から大腿部に数 mm 程度の小切開を加え、生理食塩水で希釈したエピネフリン液を皮下に注入する。小切開部より、通常美容外科で行われているシリンジおよびカニューラを用いた手技的な手技で、最大 360mL の脂肪組織を吸引採取する。脂肪採取後は、脂肪吸引部を圧迫固定する。

[調製方法] Celution®800/CRS 自動細胞処理装置 (Cytori Therapeutics 社製) を用いて、採取した脂肪組織に対し洗浄、細胞の分離、濃縮処理を無菌的かつ自動的にを行い、濃縮細胞液 (2-5mL) を調製する。

[移植・投与方法] 濃縮細胞液は、瘻孔内の搔爬、洗浄を行った後、体表から移植する。移植は以下の方法で行う。

濃縮細胞液の移植に際しては、血管内への迷入のないことを十分に確認する。

準備した濃縮細胞液の半量を注射針で皮膚瘻周囲組織内に全周性、等間隔となるように 4-8 分割して移植する。

残り半量の濃縮細胞液で希釈し調製したトロンピン溶液 (トロンピン溶液の希釈倍数は 20 倍以下) とフィブリノゲン溶液とを 1 対 1 で混合し、皮膚瘻の容量になるように調製したフィブリン糊 (販売名: ポルヒール®、特定生物由来製品 (別添 1 参照)) で充填する。

内視鏡にて瘻孔を確認できる症例は、皮膚瘻周囲組織内に移植する濃縮細胞液を 2 分し、内視鏡下に瘻孔周囲の粘膜下にも濃縮細胞液を移植する。(濃縮細胞液の 4 分の 1 量を皮膚瘻周囲組織内、瘻孔周囲粘膜下にそれぞれ移植する。)

[主要評価項目] 本研究における有害事象の有無、程度 (CTCAE v4.0 の Grade)、重篤か否か、発現頻度及び発現期間

[副次評価項目] 自己脂肪組織由来間葉系前駆細胞移植療法の完遂、皮膚瘻の閉鎖率

手術症例 (IBD 患者、非 IBD 患者) から採取された皮下脂肪組織内に存在する ADSCs およびマウス ADSCs の特性についての検討を実施した。

採取細胞 1×10^6 に対して APC-抗 CD34 抗体、PE-抗 CD31 抗体、抗 FITC-CD45 抗体で染色を行い、FACS Arial で CD45 (-)、CD31 (-)、CD34 (+) の比率を計測した。採取した脂肪の重量、細胞の数から ADSC の数を算出した。

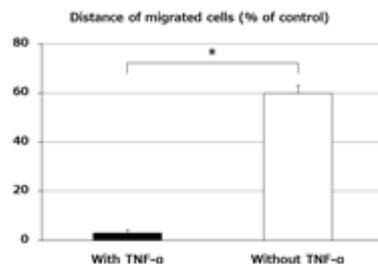
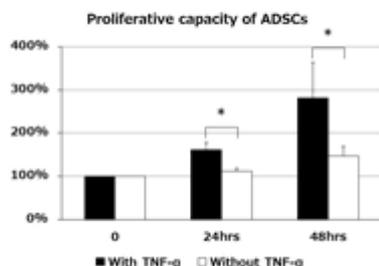
マウス (Balb/c) 鼠径部皮下脂肪から採取した ADSCs、 2×10^5 /well に対して TNF- α 5ng/ml で 24 時間暴露し 36 時間後、72 時間後に細胞数を測定した。10cm dish に 5×10^6 個の ADSCs を散布し単一層になるまで培養。Wound field を作成し TNF- を 5ng/ml で暴露し 12 時間後に観察した。

4. 研究成果

臨床研究の対象症例は潰瘍性大腸炎 (UC) 4 例 (直腸カルチノイド術後 1 例)、クローン病 (CD) 2 例であった。全例で脂肪組織の採取、自己脂肪組織由来間葉系前駆細胞濃縮細胞 (adipose-derived regenerative cells: ADRCs) 液調整、移植手術が実施可能であり、重篤な合併症は認めなかった。調整された濃縮細胞液の解析の結果では、ADRCs 数は中央値 7.59×10^7 (9.60×10^6 - 1.42×10^8)、細胞生存率中央値 89.2% (84.3-93.0%)、CD45-CD31-CD34+ 細胞割合は中央値 24.2% (1.9-49.7%) であった。瘻孔閉鎖率は 4 週、12 週が 83.3% (5/6 例)、24 週が 100% (6/6 例) であった。幹細胞治療実施後に実施する CT 検査では、治療直後の瘻孔充填部位は確認可能であったが、経過中に瘻孔充填部位が不明瞭となる症例が大半であり、画像による組織再生評価は困難であった。一時的人工肛門が造設されていた 5 例中 4 例で人工肛門の閉鎖を実施した。

IBD 患者 5 例 (UC2 例、CD3 例)、非 IBD 患者 6 例の皮下脂肪組織内に存在する ADSCs の特性の検討では、1g の皮下脂肪組織あたりの ADSCs が IBD 患者 4.2×10^4 、非 IBD 患者 0.8×10^4 と IBD 患者で有意に高く、CD45-CD31-CD34+ 細胞割合が IBD 患者 11.39%、非 IBD 患者 3.1% と IBD 患者で有意に高かった。

マウス ADSCs を用いた実験では、TNF- の添加により有意に増殖能、運動能が更新した。



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)

Mizushima T, Takahashi H, Takeyama H, Naito A, Haraguchi N, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. A clinical trial of autologous adipose-derived regenerative cell transplantation for a postoperative enterocutaneous fistula. Surg Today 46 (7) 835-842, 2016

Takeyama H, Mizushima T, Takahashi H, Haraguchi N, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. Adipose-derived stem cells ameliorate experimental murine colitis via TSP-1-dependent activation of latent TGF- β . Online First, 2017

[学会発表](計 4 件)

水島恒和, 術後難治性皮膚瘻に対する自己脂肪組織由来間葉系前駆細胞移植療法 of 臨床応用. 第 69 回手術手技研究会 (高崎市), 5.15-16, 2015

水島恒和, 消化器外科手術に伴う難治性皮膚瘻に対する自己脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた組織再生医療の臨床応用. 第 74 回日本癌学会学術総会 (横浜市), 10.8-10, 2015

水島恒和, 竹政伊知朗, 畑 泰司, 西村潤二, 原口直紹, 高橋秀和, 竹山廣志, 内藤 敦, 深田唯史, 山本浩文, 土岐祐一郎, 森 正樹, 術後難治性皮膚瘻に対する自己脂肪組織由来間葉系前駆細胞移植術の臨床応用. 第 116 回日本外科学会定期学術集会 (大阪市), 4.14-16, 2016

水島恒和, 土岐祐一郎, 森 正樹, 術後難治性皮膚瘻に対する自己脂肪組織由来間葉系前駆細胞移植術の臨床応用. 第 102 回日本消化器病学会総会 (東京都), 4.22-24, 2016

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水島 恒和 (Mizushima, Tsunekazu)
大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授
研究者番号：00527707

(2) 研究分担者

西村 潤一 (Nishimura, Junichi)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：20379209

飯島 英樹 (Hideki, Iijima)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：90444520

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()