

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月14日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659251

研究課題名（和文） アディポネクチン産生細胞シートを用いた心不全治療法の開発

研究課題名（英文）：Development of Targeted Adiponectin Delivery System by Using Induced Adipocyte Cell-sheet

研究代表者

澤 芳樹 (SAWA YOSHIKI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00243220

研究成果の概要（和文）：200字程度

我々は、脂肪組織由来間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化を誘導することで、アディポネクチン産生細胞シートを開発した。本シートはアディポネクチンや肝細胞増殖因子(HGF)などの心筋保護因子の産生能を有し、T細胞性自己免疫を主病態とするラット自己免疫性心筋炎においてCD4陽性エフェクターT細胞/CD68陽性マクロファージの減少による免疫抑制効果、Foxp3陽性制御性T細胞による免疫寛容を誘導し、心筋炎の進展を抑制した。以上のことからアディポネクチン産生シートが、予後不良な劇症型心筋炎において有効な治療法となる可能性が示唆され、そのような点で本研究の社会的意義・貢献は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We hypothesized that cell sheet-based delivery system of adiponectin might induce immune-tolerance and functional recovery in experimental autoimmune myocarditis (EAM) in rat. Scaffold-free induced adipocyte cell-sheet (iACS) was generated by inducing differentiation of syngeneic cultured adipose tissue-derived stem cells into the adipocytes on the temperature responsive dishes. Supernatants of iACS contained a high level of adiponectin and hepatocyte growth factor (HGF), and reduced proliferation of CD4-positive T cells that were sorted from splenocytes of the EAM rats, *in-vitro*. This tissue-engineered iACS treatment suppressed intramyocardial T cell activity and inflammation by persistently supplying adipocytokines to the heart, consequently inducing functional recovery in the EAM rat model. The findings support possible translation of this strategy into the clinical arena.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,100,000 | 0 | 2,100,000 |
| 2011年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,900,000 | 240,000 | 3,140,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：Drug delivery system、劇症型心筋炎、アディポネクチン、Cell therapy

1. 研究開始当初の背景

ヒト劇症型心筋炎は、症例により病状はさまざまであるが、各種治療（ステロイド等）抵抗性で心移植に至る症例も少なくない。

重症化例では依然不明な点もあるが、T細胞性の自己免疫が関与していると考えられ、心筋炎組織中のCD4陽性ヘルパー1及び17T細胞(Th1及びTh17)の増加やFoxp3陽性制御性T細胞の低下が確認されている。

近年、脂肪細胞から産生されるアディポネクチンや肝細胞増殖因子(HGF)が抗炎症および免疫寛容/抑制を誘導し、T細胞性自己免疫を主病態とするラット自己免疫性心筋炎の進展を抑制することが報告されている。

一方、多くの実験系ではこれらのサイトカインデリバリー法として、遺伝子導入や組み換え蛋白が用いられおり、臨床応用の面で問題があると考えられる。

我々は、脂肪組織由来間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化を誘導することで、アディポネクチン産生能を有する分化型脂肪組織由来細胞シートを開発した。さらに本シートが抗炎症、免疫抑制効果を介してマウス急性心筋梗塞の進展を抑制することを証明し、報告した(Y. Imanishi, Y. Sawa et al. Circulation 2011)。

したがって炎症を主病態とするラット実験的自己免疫性心筋炎においても産生されたアディポネクチンなどの心血管保護因子を介して抗炎症効果、免疫抑制/寛容作用を誘導し、その進展を抑制することを仮説とした。

2. 研究の目的

本検討の目的は、ラット自己免疫性心筋炎に

おけるアディポネクチン産生細胞シートの治療効果を検討することである。

3. 研究の方法

アディポネクチン産生分化型脂肪組織由来細胞シートは3週齢のロイスラットの脂肪組織から単離した脂肪前駆細胞(2 x 10⁶ per dish)を35mm温度感応性培養皿(CellSeed, Tokyo, Japan)上で2週間培養し、さらに成熟脂肪細胞への分化を誘導することで作成した。分化誘導剤としてはInsulin(10mg/ml)、5mM pioglitazone、2mM Dexamethazone、125mM isobuthylmethylthansine(Sigma-Aldrich, St Louis, MO)を使用した。分化誘導前の未分化脂肪前駆細胞シート、分化誘導後の脂肪細胞シートをoil red O染色すると、分化誘導後ではoil red O陽性の脂肪滴を有し、成熟脂肪細胞に分化していることを確認した。

自己免疫性心筋炎ラットは6-8週齢のロイスラットをブタ心臓から精製した心筋ミオシン(Sigma)及びComplete Rreund's adjuvant(Difco)で感作することで導入した。感作後1週間後、全身麻酔下で左室前壁に分化型脂肪組織由来細胞シート(計3枚)(iACS群)及び分化誘導前の未分化脂肪前駆細胞シート移植(計3枚)(SVFCS群)、sham手術(sham群)を行った。1週間ごとにエコー検査を実施、42日目にsacrifice、病理組織学的、分子生物学的検討を行った。

またIn vitroのT cell proliferation assayを用いて本シートより産生されたアディポネクチンやHGFのラット自己免疫性心筋炎におけるCD4陽性T細胞活性化に対する効果を検証した。自己免疫性心筋炎を導入したラッ

ト脾臓より MACS にて CD4 陽性 T 細胞および樹状細胞を単離後、共培養を行った。培養 5 日後、分化型脂肪組織由来細胞シート上清あるいは組み換えアディポネクチン蛋白、組み換え HGF 蛋白存在下で特異的抗原であるミオシンを加えた後、T 細胞活性化を MTT assay で定量化した。また ELISA 法にて培養上清中の Th1 サイトカイン(IFN γ)、Th17 サイトカイン(IL17)を測定した。

4. 研究成果

In vitro の細胞シート上清を用いたサイトカイン産生能の評価上、分化誘導前の未分化脂肪前駆細胞シート (1.1 \pm 0.4 ng/ml) はアディポネクチン産生能が極めて低かったのに対し、分化型脂肪組織由来細胞シート (63.4 \pm 13.1 ng/ml、P<0.05) は高いアディポネクチン産生能を有していた。一方で HGF 産生能は 2 群間で同等であった (iACS 群: 5 \pm 1ng/ml、SVFCS 群: 4 \pm 1ng/ml)。

T cell proliferation assay において、アディポネクチン産生分化型脂肪組織由来細胞シートの細胞上清及び組み換えアディポネクチン蛋白および組み換え HGF 蛋白は心筋炎における CD4 陽性 T 細胞活性化及び Th1/Th17 産生サイトカイン産生を有意に抑制した (P<0.05)。

In vivo 心筋炎組織中のアディポネクチンは移植後より 35 日間、分化型脂肪組織由来細胞シート移植群で他 2 群に比し有意に高値であった (P<0.05)。一方、移植後 14 日目における HGF は両シート群で sham 群に比し同等に高値であった。

心筋炎急性期 21 日目の HE 染色では分化型脂肪組織由来細胞シート群で他 2 群に比し有意に炎症細胞浸潤は抑制された (Myocarditis Severity Score iACS 群: 1.17 \pm 0.39%^{##}、SVFCS: 1.75 \pm 0.62%^{*}、sham 群: 2.42 \pm 0.51%、

P<0.05 vs. sham, [#]P<0.05 vs. SVFCS)。抗 CD4/CD68/Foxp3 免疫染色では、分化型脂肪組織由来細胞シート群では sham 群に比し、有意に CD4 陽性 T 細胞の減少 (iACS 群: 619 \pm 175/mm^{2}、SVFCS 群: 837 \pm 259/mm^{2*}、sham 群: 1392 \pm 299/mm²、*P<0.05 vs. sham) および CD68 陽性マクロファージの減少 (iACS 群: 1258 \pm 324/mm^{2*#}、SVFCS 群: 2505 \pm 407/mm^{2*}、sham 群: 4029 \pm 419/mm²、*P<0.05 vs. sham、[#]P<0.05 vs. SVFCS)、Foxp3/CD4 細胞比の増加 (iACS 群: 15 \pm 3%^{*}、SVFCS 群: 13 \pm 3%^{*}、sham 群: 7 \pm 2%、*P<0.05 vs. sham) が認められた。

心筋炎慢性期 42 日目において、分化型脂肪組織由来細胞シートは sham 群に比し炎症部から離れた残存心筋細胞周囲の線維化 (iACS 群: 5 \pm 2%^{*}、SVFCS: 6 \pm 2%^{*}、sham 群: 21 \pm 6%、*P<0.05 vs. sham) や心筋細胞の肥大 (iACS 群: 23 \pm 6 μ m^{##}、SVFCS 群: 37 \pm 5 μ m、sham 群: 39 \pm 8 μ m、*P<0.05 vs. sham、[#]P<0.05 vs. SVFCS) を有意に抑制した。

心機能評価上、56 日目における分化型脂肪組織由来細胞シート群の EF (55.8 \pm 3.8%) は、未分化脂肪前駆細胞シート (47.0 \pm 5.0%) / Sham 群 (35.3 \pm 3.8%) に比し有意に高値であった (P<0.05)。

以上のことから、分化型脂肪組織由来細胞シートは、CD68 陽性マクロファージ/CD4 陽性エフェクター T 細胞の免疫抑制、Foxp3 陽性制御性 T 細胞による免疫寛容導入、左室リモデリング抑制効果を介して自己免疫の関連したヒト劇症型心筋炎の進展を抑制する可能性が示唆された。また効果の機序としては分化型脂肪組織由来細胞シートから産生されるアディポネクチンや HGF のパラクライン効果によるものと考えられた。

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1件)

①雑誌名 : Circulation 2011;124【suppl 1】:S10-S17.

演題名 : Induced Adipocyte Cell-Sheet Ameliorates Cardiac Dysfunction in a Mouse Myocardial Infarction Model: A Novel Drug Delivery System for Heart Failure.

発表者 : Yukiko Imanishi, Shigeru Miyagawa, Norikazu Maeda, Satsuki Fukushima, Satoru Kitagawa-Sakakida, Takashi Daimon, Ayumu Hirata, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano, Iichiro Shimomura, Yoshiki Sawa.

[学会発表] (計2件)

①学会名 : アメリカ心臓病学会

発表年月日 : 2011年11月12日

発表場所 : Orland, USA

演題名 : A Targeted Delivery of Adipocytokines into the Heart by Transplantation of Induced Adipocyte Cell-sheet Yields Immuno-tolerance and Functional Recovery in Autoimmune-Associated Myocarditis in Rat.

演者 : Sokichi Kamata, Shigeru Miyagawa, Satsuki Fukushima, , Yukiko Imanishi, Atsuhiko Saito, Norikazu Maeda, Yoshiki Sawa.

②学会名 : アメリカ心臓病学会

発表年月日 : 2010年11月13日

発表場所 : Chicago, USA

演題名 : Induced Adipocyte Cell-Sheet Ameliorates Cardiac Dysfunction in a Mouse Myocardial Infarction Model: A Novel Drug

Delivery System for Heart Failure.

演者 : Yukiko Imanishi, Shigeru Miyagawa, Norikazu Maeda, Satsuki Fukushima, Satoru Kitagawa-Sakakida, Takashi Daimon, Ayumu Hirata, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano, Iichiro Shimomura, Yoshiki Sawa.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤 芳樹 (SAWA YOSHIKI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号 : 00243220

(2) 研究分担者

倉谷 徹 (KURATANI TORU)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号 : 90448035

上野 高義 (UENO TAKAYOSHI)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号 : 60437316

坂口 太一 (SAKAGUCHI TAICHI)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号 : 10467574

白川 幸俊 (SHIRAKAWA YUKITOSHI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 20457013

吉川 泰司 (YOSHIKAWA YASUSHI)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 40570594

山内 孝 (YAMAUCHI TAKASHI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 20527999

(H22 まで研究分担者として参画)

島村 和男 (SHIMAMURA KAZUO)
大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教
研究者番号：10507205

(3) 連携研究者

()

研究者番号：