

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月20日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26713043

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞による大動脈瘤治療の臨床応用を目指した研究

研究課題名(英文) Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for treatment of aortic aneurysm

研究代表者

緒方 藍歌 (Ogata, Aika)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：70718311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈瘤に対する人工血管置換術は、瘤破裂の予防効果は絶大だが、手術侵襲が大きいため、新たな低侵襲治療法の開発が望まれている。我々は、間葉系幹細胞が有する抗炎症作用・免疫寛容に着目し、骨髄由来間葉系幹細胞の静脈内投与による大動脈瘤治療効果を示してきた。本研究では、超音波診断装置を用いた同一個体の継時的評価を行い、瘤径縮小効果があることが示された。また、治癒メカニズムの解明として、NF- $\kappa$ B, STAT, Smad3, Aktリン酸化シグナル伝達経路の関与、MSCエクソソーム静脈内投与による大動脈瘤縮小効果、MSC培養上清中に大動脈瘤形成抑制に働くことされるmicroRNAsの存在を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者・メタボリック症候群人口の増加を背景に、大動脈瘤罹患患者数は年々増加している。65歳以上の6-9%に腹部大動脈瘤が形成されているとの報告がある。標準的な治療法は人工血管置換術で、瘤破裂の予防効果は絶大だが、特に上行・弓部や胸腹部大動脈の人工血管置換術は、非常に手術侵襲が大きく、手術死亡率・合併症発症率も高い。従って、大動脈瘤治療の低侵襲化は国民的課題である。本研究では、成人の骨髄などに存在する間葉系幹細胞を利用し、静脈内投与することにより、抗炎症作用等を介した大動脈瘤径の拡大抑制効果が得られたことを明らかにした。この成果は、大動脈瘤に対する間葉系幹細胞治療の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：An aortic aneurysm (AA) develops as a result of atherosclerosis and chronic inflammation. Surgical repair of AA is effective treatment to prevent rupture. However, the surgical procedures for thoracic and thoracoabdominal AA are extremely invasive and associated with high mortality and morbidity. We have reported that intravenous injection of mesenchymal stem cells (MSCs) could reduce the morbidity rate of aortic aneurysm by anti-inflammatory and tissue repair properties of MSCs. In this study, echographic measurements showed that the maximum aortic diameters of MSC-treated mice were significantly shorter than saline injection throughout 1 week after injection. In addition we demonstrated that the therapeutic mechanism of MSC-mediated AA regression contributed to regulation of the NF- $\kappa$ B, STAT, Smad3 and Akt signaling pathways, MSC-derived exosomes, and microRNAs secreted from MSC.

研究分野：再生医学、心臓血管外科

キーワード：大動脈瘤 間葉系幹細胞 シグナル伝達 エクソソーム 抗炎症作用 microRNA 超音波診断装置

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 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は、高齢者・メタボリック症候群の増加に伴って、罹患患者数が増加している。日本胸部外科学会の年次報告でも胸部大動脈瘤手術は増加傾向を示し、手術対象症例は年々高齢化している。大動脈瘤に対する人工血管置換術は瘤破裂予防効果は絶大だが、侵襲が大きい。近年、より低侵襲なステントグラフト内挿術が数多く行われるようになったが、適応が限られており万全とは言いがたい。

大動脈瘤病変部位では慢性炎症を呈しており、病理像では血管壁強度を担うエラスチン繊維の構造破壊が顕著に観察される。また、マクロファージ(M $\phi$ )を中心とした炎症性細胞が集積し、炎症生サイトカイン(IL-1, IL-6、腫瘍壊死因子：TNF- $\alpha$ )やケモカイン(マクロファージ走化因子：MCP-1)などを介し、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-2,9やエラスターゼなどの酵素を産生する。これら酵素によってエラスチンを破壊された大動脈は強度を失い瘤状変性することが分かっている。

一方、抗炎症作用・免疫抑制能を有する間葉系幹細胞(MSC)による炎症抑制療法は、移植片対宿主病(GVHD)などを対象にした臨床研究で有効性が報告されている。そこで我々はこれを大動脈瘤治療に応用し、apolipoprotein E 遺伝子欠損マウスにAngiotensin-II(ATII)負荷による大動脈瘤モデルマウスに対しMSC静脈投与を行ったところ、大動脈瘤発症予防および大動脈瘤径の縮小効果が得られたことをこれまでに報告してきた。これまでの検討でMSCによる大動脈瘤治療法の可能性が示唆されたが、大動脈瘤の縮小効果の証明が十分ではなく、治癒メカニズムも不明なままであった。

### 2. 研究の目的

これまでに行ってきた大動脈瘤径計測のエンドポイントは、すべて屠殺後で血圧不可のない状態での評価であり、病態を正確に反映しているとは言いがたい。細胞治療の効果を正確に評価するためには、同一個体の連続した計測が必要であることから、本研究では、一個体の継続的な観察による大動脈瘤径縮小効果の確認を行う。また、治癒メカニズムの解明を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 同一個体による超音波診断装置を用いた大動脈瘤径の継続的測定

大動脈瘤モデル：24週齢以上、雄のApolipoprotein E 遺伝子欠損マウスの背部皮下に、1000ng/kg/day angiotensin II(ATII)を4週間持続注入(持注)する浸透圧ポンプ(Osmic Pump, Alzet 2004)を埋植することによる大動脈瘤モデルマウスを作成した。ATII持注前(pre-ATII)、持注4週間後(post-ATII)に、超音波診断装置(GE Healthcare, LOGIQ e Premium, 14.4 MHz probe)を用いて、横隔膜下大動脈径を計測した。

MSC樹立：4-6週齢Apolipoprotein E 遺伝子欠損マウスの両大腿骨から骨髓を採取し、密度勾配遠心法にて単核球層を取り出し培養した。継代を繰り返して樹立したMSCは、フローサイトメトリーにて特異的表面抗原マーカーSca-1, CD29, CD44, CD106陽性およびCD11b, CD31, CD34, CD80, CD86, CD117陰性であることを確認した。また、分化誘導培地を用いて骨芽細胞・脂肪細胞・軟骨細胞への分化能を認めた。

投与と評価：ATIIを4週間持注後、 $1 \times 10^6$ 個MSCを0.2mL生理食塩水に懸濁し、尾静脈内投与した(MSC群)。比較対象群として0.2mL生理食塩水を投与した(saline群)。投与2, 4週間後に超音波診断装置を用いて、横隔膜下大動脈径を計測した。

#### (2) 投与細胞数の違いによる治療効果の検討

(1)と同様のモデルマウスを用い、MSC投与数をそれぞれ $1 \times 10^4$ 個、 $1 \times 10^5$ 個、 $1 \times 10^6$ 個とし、0.2mL生理食塩水に懸濁して尾静脈内投与した。比較対象群として0.2mL生理食塩水を投与した。投与2, 4週間後に超音波診断装置を用いて、横隔膜下大動脈径を計測した。

#### (3) メカニズム解明：シグナル伝達経路

(1)と同様のモデルマウスを用い、ATIIを4週間持注後、 $1 \times 10^6$ 個MSCを0.2mL生理食塩水に懸濁し、尾静脈内投与した。比較対象群として0.2mL生理食塩水を投与した。投与2週間後に横隔膜下から腎動脈下までの大動脈瘤組織を採取し、タンパク抽出した。ウエスタンブロットにてリン酸化シグナル(JNK, NF- $\kappa$ B, STAT1, STAT2, Smad2, Smad3, 44/42 ERK, Akt)を検出し、比較検討した。In vitroでは、TNF- $\alpha$ で炎症を惹起した炎症性マクロファージ(M $\phi$ , J774A.1 cell line)またはマウス大動脈を組織培養し樹立した血管平滑筋細胞(VSMC)とMSCsを24時間共培養したのち、細胞内タンパク質を抽出し、前述と同様にウエスタンブロットにてリン酸化シグナルを検出した。比較対象群には、M $\phi$ またはVSMCs単独培養(単培養)を用いた。

#### (4) メカニズム解明：MSCエクソソーム

MSCによる治癒メカニズムの解明として、MSCが産生する因子；エクソソームに着目した。エクソソームは、細胞外微小胞で内部に様々なタンパクやmicroRNAなどを含み、細胞間情報伝達物質として働くことが知られている。無血清培地で48時間培養したMSC培養上清から、超遠心法にてエクソソームを回収した。(1)と同様の大動脈瘤モデルマウスに対し、 $10 \mu$ g MSCエクソソームを静脈内投与した(MSC-exo群)。比較対象群として0.2mL生理食

塩水を投与した (saline 群)。投与 1 週間後に超音波診断装置を用いて、横隔膜下大動脈径を計測した。また、屠殺後に顕微鏡下で大動脈瘤径計測を行った。

(5) メカニズム解明：microRNA の同定

80%コンフルエントに達した MSC を無血清培地で 48 時間培養したのち、培養上清を遠心濃縮し、AGPC 法にて RNA を抽出した。得られた RNA は、Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0 Array (Affymetrix, Inc)を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 同一個体による超音波診断装置を用いた大動脈瘤径の継続的測定

図 1 A に超音波診断装置による所見を示す。両群ともに、大動脈径は pre-ATII (MSCs 群 :  $1.38 \pm 0.13$  mm, saline 群 :  $1.35 \pm 0.13$  mm) から post-ATII (MSCs 群 :  $2.08 \pm 0.32$  mm, saline 群 :  $2.17 \pm 0.28$  mm) と 1.5 倍以上の拡大を認めた。Saline 群では、2 週後で  $2.41 \pm 0.33$  mm、4 週後で  $2.48 \pm 0.26$  mm と継続的に拡大していったのに対し、MSC 群では、2 週後で  $1.74 \pm 0.25$  mm、4 週後で  $1.80 \pm 0.26$  mm となり、saline 群と比較して有意に瘤径が縮小した (2 週 \*  $P < 0.05$ , 4 週 \*  $P < 0.05$ , 図 1 B)。

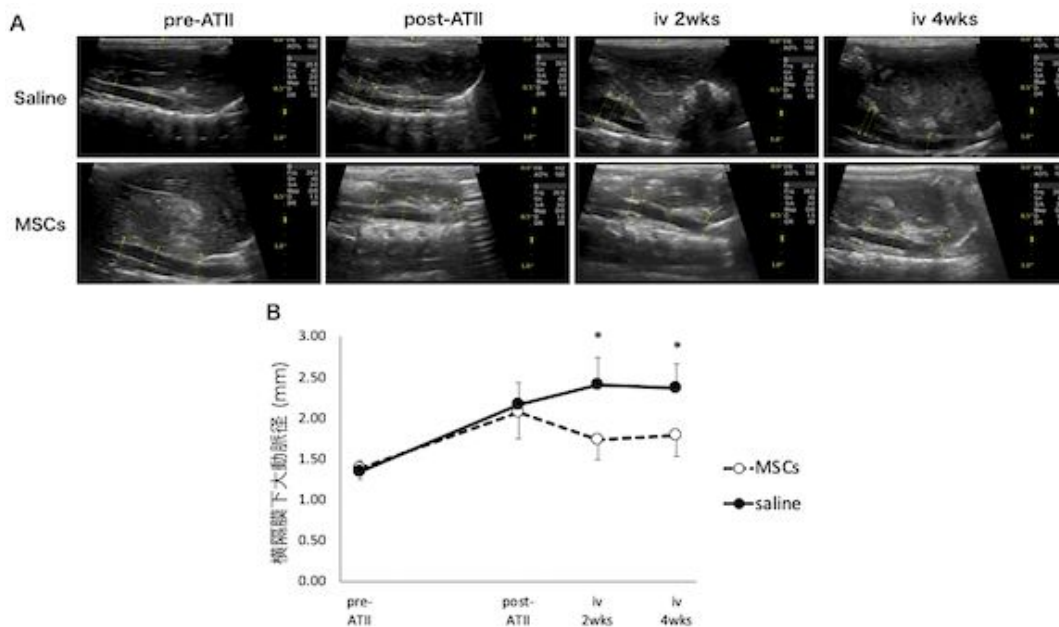


図 1 超音波診断装置による大動脈径の継続的計測

(2) 投与細胞数の違いによる治療効果の検討

MSC 投与数  $1 \times 10^4$  個、 $1 \times 10^5$  個では、投与 2 週後および 4 週後において saline 群と同様に継続的に大動脈径の拡大を認めた (2 週 :  $1 \times 10^4$  MSCs;  $2.47 \pm 0.39$  mm,  $1 \times 10^5$  MSCs;  $2.5 \pm 0.17$  mm, saline;  $2.41 \pm 0.33$  mm、4 週 :  $1 \times 10^4$  MSC;  $2.64 \pm 0.17$  mm,  $1 \times 10^5$  MSCs;  $2.53 \pm 0.1$  mm, saline;  $2.48 \pm 0.26$  mm、図 2)。一方、 $1 \times 10^6$  個 MSC では有意に瘤径拡大を抑制したことから、MSC 投与細胞数の違いによって大動脈瘤に対する治療効果に差が生じることが分かった。

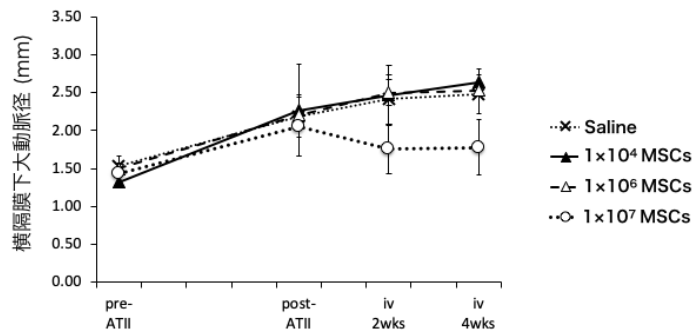


図 2 投与細胞数依存性による大動脈径縮小効果

(3) メカニズム解明：シグナル伝達経路

Saline または MSC 投与 2 週間後の大動脈瘤組織から抽出したタンパクからリン酸化シグナルを調べたところ、JNK, STAT3, Smad2, P44 ERK, p42 ERK は変化がみられなかったが、Saline 群に比べ MSCs 群では、NF- $\kappa$ B, STAT1 のリン酸化シグナルの低下および Smad3, Akt のリン酸化

シグナルの亢進を認めた (pNF-kB:  $0.16 \pm 0.02$  versus  $0.41 \pm 0.05$ ,  $P < 0.01$ , pSTAT1:  $0.009 \pm 0.003$  versus  $0.04 \pm 0.01$ ,  $P < 0.05$ , pSmad3:  $1.07 \pm 0.09$  versus  $0.47 \pm 0.17$ ,  $P < 0.05$ , pAkt:  $0.13 \pm 0.01$  versus  $0.07 \pm 0.01$ ,  $P < 0.01$ ). 図 3、Yamawaki-Ogata A, et al. Cytotherapy 2017;19:1167-1175 より引用)。また、pNF-kB, pSTAT1, pSmad3, pAkt は、大動脈瘤径と有意に相関していた (図 4、Yamawaki-Ogata A, et al. Cytotherapy 2017;19:1167-1175 より改変)。

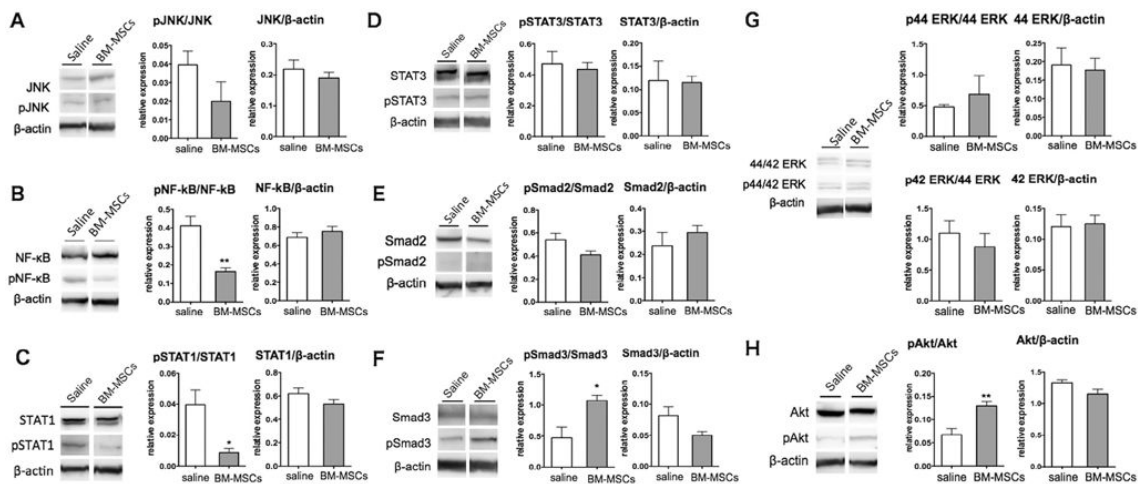


図3 大動脈瘤に対するMSCs治療におけるリン酸化シグナルの変化

また、細胞レベルでのリン酸化シグナルの変化を調べたところ、MSC と共培養した M は、M 単培養群に比べ、pNF-kB, pSTAT1 が有意に低下し、pSmad3 は亢進していた (pNF-kB:  $0.2 \pm 0.02$  versus  $0.34 \pm 0.05$ ,  $P < 0.01$ , pSTAT1:  $0.2 \pm 0.03$  versus  $0.29 \pm 0.03$ ,  $P < 0.001$ , pSmad3:  $1.46 \pm 0.36$  versus  $0.42 \pm 0.15$ ,  $P < 0.05$ )。一方、MSC と共培養した SMCs は、SMCs 単培養群に比べ、pAkt が有意に亢進していた (pAkt:  $1.3 \pm 0.1$  versus  $0.92 \pm 0.04$ ,  $P < 0.01$ 、図 5、Yamawaki-Ogata A, et al. Cytotherapy 2017;19:1167-1175 より改変)。

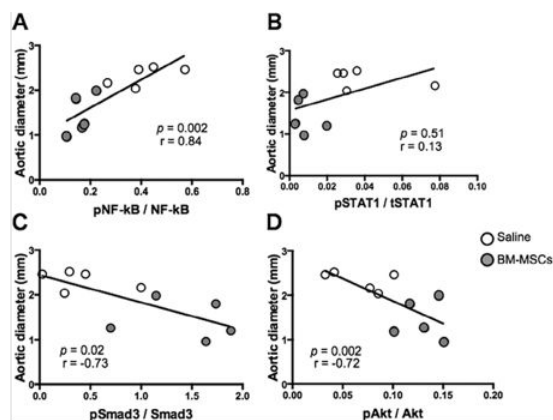


図4 MSCs治療後のリン酸化シグナルと大動脈瘤径の相関性

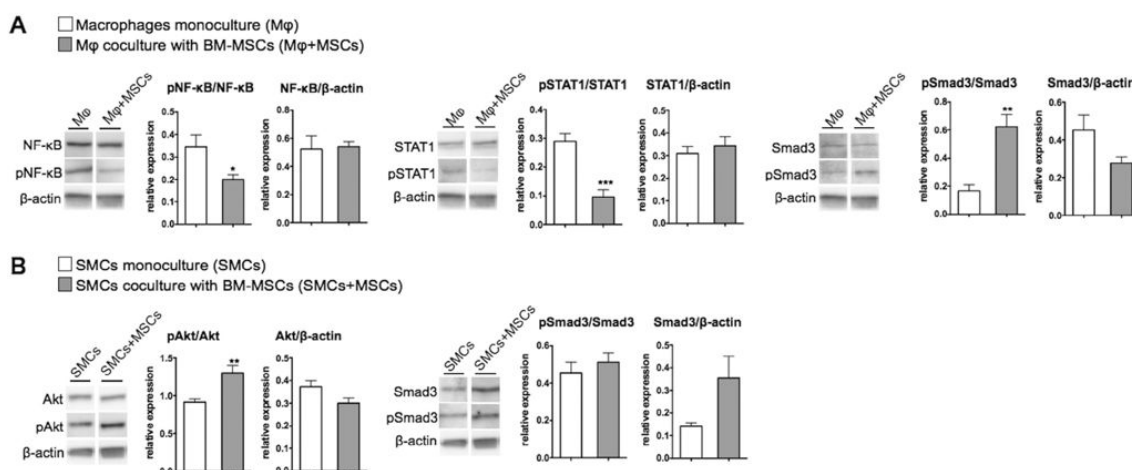


図5 MSCs共培養によるmacrophageまたはSMCs内のリン酸化シグナル変化

#### (4) メカニズム解明：MSC エクソソーム

Saline 群では継時的に大動脈瘤径が拡大していったのに対し、MSC-exo 群では大動脈瘤径が縮小した (saline 群: pre-ATII  $1.31 \pm 0.04$  mm, pre-iv  $1.85 \pm 0.13$  mm, post-iv  $2.19 \pm 0.18$  mm, MSC-exo 群: pre-ATII  $1.31 \pm 0.05$  mm, pre-iv  $1.93 \pm 0.10$  mm, post-iv  $1.63 \pm 0.08$  mm, saline vs MSC-exo at post iv:  $p = 0.0026$ )。屠殺後の顕微鏡下観察では、saline 群  $2.04 \pm 0.20$  mm に対し、MSC-exo 群  $1.34 \pm 0.13$  mm と有意に大動脈瘤径が短かった。また、大動脈瘤形成率は、saline 群 100% に対し、MSC-exo 群は 50% と有意に低下した (図 6)。

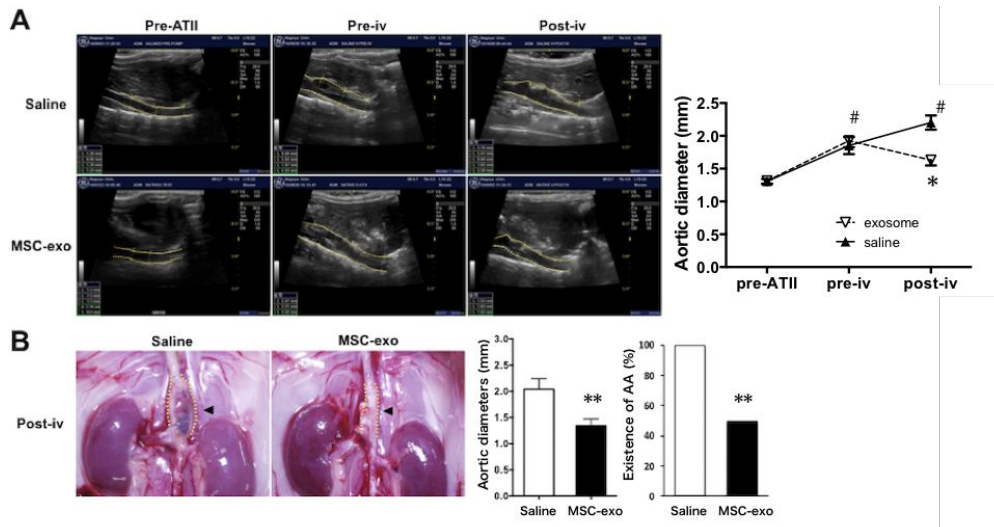


図6 MSC-エクソソーム静脈内投与による大動脈瘤縮小効果

(5) メカニズム解明：microRNA の同定

MSC 培養上清から抽出した RNA からアレイを用いて microRNA を同定したところ、大動脈瘤促進に働くと考えられる microRNA 6 種類が同定されたが、一方で大動脈瘤形成を抑制するとされている microRNA 13 種類(miR-21a, miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-27a, miR-23b, miR-91, miR-143, miR-145, miR-155, miR-181b, miR221, miR-222) が同定され、発現強度が高かった(図7)。

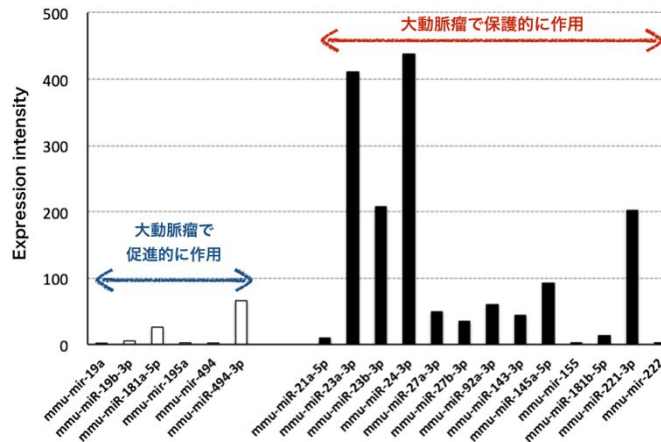


図7 MSC培養上清に含まれるmicroRNAsの同定

以上の結果から、本研究では、超音波診断装置を用いることで一動物の継続的な観察ができ、大動脈瘤の縮小効果があったことを明らかにした。治癒メカニズムの解明として、動物組織レベルおよび細胞レベルにおいて、MSC 治療にはリン酸化シグナル伝達経路 NF-κB, STAT1, Smad, Akt が関与していることが示唆された。MSC が産生するエクソソームの静脈内投与により大動脈瘤径が縮小し、エクソソームによる治療効果を示した。また、MSC 培養上清中には、大動脈瘤形成抑制に働くことが報告されている microRNAs を同定した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Aika Yamawaki-Ogata, Hideki Oshima, Akihiko Usui, Yuji Narita. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells regress aortic aneurysm via the NF-κB, Smad3 and Akt signaling pathways. *Cytotherapy* 2017;19:1167-1175. 査読有り

[学会発表](計 5 件)

- 第 16 回 再生心臓血管外科治療研究会 2016 年 幹細胞による大動脈瘤治療における作用機序と新たな治療戦略への展望 緒方藍歌、碓氷章彦、成田裕司
- 第 14 回日本再生医療学会総会 2015 年 大動脈瘤に対する細胞治療におけるシグナル伝達機構 緒方藍歌、成田裕司、佐藤恵一、大島英揮、碓氷章彦
- 第 36 回 日本炎症・再生医学会 2015 年 間葉系幹細胞を用いた大動脈瘤治療における分子メカニズムの解明 緒方藍歌、大島英揮、碓氷章彦、成田裕司
- The 13<sup>th</sup> annual meeting, The International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2015 年 Bone marrow derived mesenchymal stem cell treated aortic aneurysm via NF-κB and Akt signal pathway in mice. Aika Yamawaki-Ogata, Akihiko Usui, Yuji Narita.

The 4<sup>th</sup> world congress, Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) 2015年 Exosomes obtained from mesenchymal stem cells as a novel therapeutic tool for aortic aneurysm. Aika Yamawaki-Ogata, Motoshi Kozakai, Akihiko Usui, Yuji Narita.

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。