

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09561

研究課題名(和文) 脂肪間葉系幹細胞シート移植による動脈硬化治療開発のための基礎検討

研究課題名(英文) The development of a novel vascular regenerative therapy for arteriosclerosis using adipose derived stem cell sheet

研究代表者

本間 順 (Homma, Jun)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：50507366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化に合併する血管狭窄に対する治療後の再狭窄抑制が重要である。本研究では、血管外膜側からの間葉系幹細胞移植で細胞懸濁液法と細胞シート法の2つの移植法の検討で下記の研究成果を得た。ラット大腿動脈傷害モデルを用い、実験は3条件(未治療・細胞懸濁液・細胞シート)で比較を行った。結果：新生内膜増生は内膜/中膜比で、細胞シートが他に比べ弱かった。移植細胞生着実験では細胞シート法が細胞懸濁液より良好な生着を認めた。更に、細胞シート法は血管内膜再内皮化率が高かった。本成果から、間葉系幹細胞シートは新規血管再生療法となり得ると考えられた。また、動脈硬化における血管傷害モデルでは更なる検討が必要となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管外膜側からの間葉系幹細胞移植による血管狭窄抑制効果は、細胞シート法による移植で高く発揮された。また、細胞シート法の方が細胞懸濁液よりも移植後の細胞の生着・血管への限局性が良好であった。細胞シート法の細胞懸濁液移植法に対する生着率に関する優位性は心臓では報告されているものの血管では初めての成果である。この細胞シートのもつ移植細胞の生着率の高さと限局性が、細胞シートからの分泌因子の効果を高め、障害内膜の再内皮化、そして、新生内膜での血管平滑筋細胞増殖抑制効果を示す。そして、最終的に血管狭窄抑制効果を発揮した。本研究成果から、間葉系幹細胞シート移植は再発性血管狭窄の治療になりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The progression of restenosis in the long term is major problem. In this study, to establish MSCs therapy, comparison of anti-stenosis effect between the transplantation method of cell sheet and that of suspension cell was done.

Method: The rat arterial impairment model was made on femoral artery. As a MSCs source, adipose-derived stem cells (ASCs) were used. The Cell sheet and the suspension cell were prepared and the transplantation was performed on the same day of making the model. The three groups were compared; Cell sheet group, single cell group and no treatment groups. Results: The intima / media ratio of the cell sheet group was significantly less than that of the other groups. The transplantation method of cell sheet had significantly better engraftment ability on arterial lesion more than that of cell suspension. The cell sheet group was significantly better reendothelialization. MSCs sheet transplantation from adventitia side is a promising therapy for arterial anti-stenosis.

研究分野：再生医療

キーワード：血管狭窄抑制 間葉系幹細胞 細胞シート 血管新生因子 血管障害モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化症に続発する血管狭窄・閉塞は各臓器で重篤な病態を引き起す。治療はカテーテル治療、外科的血管内膜剥離術、血管バイパス術が一般的である。しかし、動脈硬化は慢性炎症による内皮障害を基礎としているため狭窄の解除のみでは血管自体の病態は回復せずになかなか再発し、狭窄及び臓器障害の増悪をきたす。動脈硬化を基礎とする再発性の動脈狭窄に対する根治的な治療はなく、新規治療法の開発が待たれている。

2. 研究の目的

動脈硬化は高脂血症・高血圧を誘因とする血管内膜の炎症と、続発する血管内皮細胞障害、血管平滑筋細胞の増殖が基礎病態である。間葉系幹細胞は抗炎症・血管内皮細胞誘導の効果を持つ因子を分泌することが、これまで報告されており、動脈硬化の病態を改善し得る細胞と考えられる。但し、間葉系幹細胞が分泌する因子の効果を高めるには、移植細胞が長期・多量に対象血管周囲に生着していることが必要であり、細胞懸濁液による移植法では効果が発揮できない可能性がある。そこで、移植法として血管外膜側への細胞シート貼付法を用いる。本研究では動脈硬化を基礎疾患とした血管狭窄病態に対して間葉系幹細胞シートが再狭窄抑制効果を発揮できるかを検証するとともに、治療効果因子を探索することで、血管再生治療への臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

細胞源としては比較的低侵襲に得られ、臨床実績が多い脂肪間葉系幹細胞(ASCs)を用いた。

1) *in vitro* での狭窄抑制効果因子の検証には、ラット脂肪間葉系幹細胞を用い、次世代シーケンサーで発現遺伝子を網羅的に解析した。

2) *in vivo* 実験では、まず *wild rat* と *nude rat* で血管障害モデルに対する再狭窄抑制効果を検証した。動脈障害はラット大腿動脈に対しガイドワイヤーで作成した。実験は 3 条件 (No treatment group・Single cell group・Cell sheet group) で比較を行った。間葉系幹細胞は、Luc 発現細胞・自己組織由来細胞を用いた。細胞シートは温度応答性培養皿を用いて脂肪間葉系幹細胞で作製し、移植は 3 枚積層化した後に 2 セット (total 6×10^6 cells) 移植した。細胞懸濁液は 6×10^6 cells を 100 μ l の生食へ懸濁し移植した。間葉系幹細胞の移植は障害直後に行い、細胞生着・新生内膜増生は 2 週後に、血管内膜再内皮化は 1 週間後に評価した。

3) 2)の実験後に動脈硬化モデルを SHRSP/Dmcr へ高脂肪食を 4 週間与えることで誘導した。4 週後に大腿動脈を剥離し、外膜側から圧迫することで血管障害を与えた。細胞シートは GFP 発現細胞を用いて上記 2)と同様の方法で作製、移植を行った。血管狭窄抑制効果の検証に関しては、2 週後に組織学的に評価を行った。

4. 研究成果

(1) 移植前のラット脂肪間葉系幹細胞を網羅的な遺伝子解析成果

血管新生因子: VEGF・angiopoietin1、抗炎症因子: PGE 合成酵素・IL-1 レセプター拮抗因子、血管平滑筋細胞分裂抑制因子: Follistatin-like1 等の発現が高いことが分かった。脂肪間葉系幹細胞は、これらの分泌因子を分泌することで協調的に血管炎症・内皮細胞障害・血管平滑筋増殖を抑制し動脈硬化の病態を改善したと考えられる。長期的な効果に関しては更なる検討が必要である。

(2-1) 脂肪間葉系幹細胞シートの血管外膜側移植は血管狭窄を抑制する

血管障害・ASCs 移植後 2 週間の動脈切片の HE 染色で内膜/中膜比を比較したところ、Cell sheet group は、他の 2 群比べて優位に低く新生内膜の増生が抑制されていることが分かった。また、内弾性板で囲まれた面積のうち開存している面積の割合を表した内腔開存率に関しても Cell sheet group は、No treatment group に比べて優位に開存率が高かった。しかし、I/M 比・内腔開存率ともに Single cell group と No treatment group では優位差認めなかった（右図上）。

	Intima/Media ratio	Patency rate (%)
No treatment group (n=7)	1.34 ± 0.51	19.4 ± 6.0
Single cell group (n=6)	1.14 ± 0.28	21.7 ± 3.7
Cell sheet group (n=6)	0.55 ± 0.31	45.1 ± 8.7

Mean ± S.E. ** P < 0.01, * P < 0.05

(2-2) 移植した脂肪間葉系幹細胞の生着は細胞シート法の方がよい

移植 ASCs の生着を評価するために Luc 陽性 ASCs を移植し、2 週間後に Cell sheet group と Single cell group の血管周囲の発光強度を測定した。結果は、Cell sheet group の血管周囲での発光強度は Single cell group の発光強度と比較して 2.2 倍と優位に強い発光強度であった。さらに、Single cell group では、発光部位が鼠径部まで及んでいるのに対して、Cell sheet group では、血管周囲に発光が限局していた（右図中）。

	Total flux (photon/sec)
Single cell group (n=4)	4.9 ± 1.4 × 10 ⁷
Cell sheet group (n=4)	10.8 ± 2.2 × 10 ⁷

Mean ± S.E. ** P < 0.01

この結果より細胞シートでの移植法は、移植 MSCs の生着に有利に働き、治療目的部位である血管周囲に限局して移植・生着をさせることが可能であることが示された。細胞シート法の細胞懸濁液移植法に対する生着率に関する優位性は心臓では報告されているものの血管では初めての成果である。

(2-3) 血管外膜側からの脂肪間葉系幹細胞シート移植は障害内膜の再内皮化を促進する

ASCs 移植後 1 週間の切片をラット血管内皮細胞マーカーである RECA1 で免疫蛍光染色を行い、開存血管内腔の全周における RECA1 陽性内腔の割合を算出し比較を行った（右図下）。結果としては、Cell sheet group は、他群に比べて優位に血管内皮細胞被覆率が高かった。これにより、血管外膜側からの細胞シート移植により障害血管後の再内皮化が促進されることが分かった。

	Reendothelialization (%)
No treatment group (n=5)	55.1 ± 6.2
Single cell group (n=5)	55.2 ± 7.4
Cell sheet group (n=5)	81.2 ± 6.1

(3) 動脈硬化モデルに対する血管障害後の再狭窄抑制効果

動脈硬化ラットの大腿動脈傷害後の細胞シート移植では、移植群・未治療群ともに、狭窄の進行を認めなかった。理由として、(2)とは異なる方法で傷害を与えたため、傷害が軽微で狭窄が進行せず、両群に差を認めなかったと考えた。動脈傷害作製法の再検討が必要と考える。

本研究成果をまとめると、血管外膜側からの間葉系幹細胞移植による血管狭窄抑制効果は、細胞シート法による移植で高く発揮された。また、細胞シート法の方が細胞懸濁液よりも移植後の細胞の生着・血管への限局性が良好であった。この細胞シートのもつ移植細胞の生着率の高さと限局性が細胞シートから分泌されるパラクリン因子の効果を高め、障害内膜の再内皮化、そして、新生内膜での血管平滑筋細胞増殖抑制効果を示し、最終的に高い血管狭窄抑制効果を発揮していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Homma Jun, Sekine Hidekazu, Matsuura Katsuhisa, Kobayashi Eiji, Shimizu Tatsuya	4. 巻 24
2. 論文標題 Mesenchymal Stem Cell Sheets Exert Antistenotic Effects in a Rat Arterial Injury Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 1545 ~ 1553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.tea.2018.0030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本間順、関根秀一、松浦勝久、小林英司、清水達也
2. 発表標題 血管外膜側アプローチによる間葉系幹細胞の移植法による血管狭窄抑制効果の比較
3. 学会等名 第17回再生医療学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----