

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591047

研究課題名(和文) 拡張不全心への再生医学的治療戦略

研究課題名(英文) Therapeutic approach for diastolic heart failure through regenerative medicine

研究代表者

新谷 理 (Shintani, Satoshi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座・准教授

研究者番号：20309777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：左室心筋圧負荷モデルとして、大動脈結紮モデル(TAC)を作成して、ADRC移植を行ったが、有意な改善は得られなかった。そこで、脂肪由来間葉系幹細胞(ADRC)と骨髄単核球細胞(BM-MNC)移植ではどのような違いがあるかについて実験を行った。

ADRCは、BM-MNSと同様な血管遊走能、抗アポトーシス作用を示し、より強い抗炎症作用を示した。下肢虚血モデルに移植したところADRC移植筋組織では、M2マクロファージの遊走が多く見られ、抗炎症性サイトカインであるIL-10等が多く分泌されており、これらがADRCの抗炎症効果作用を惹起するメカニズムと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Transplantation of adipose-derived regenerative cell (ADRC) enhances ischemia-induced angiogenesis, but the underlying mechanism remains unknown. Here, we compared the efficacy between ADRC and bone marrow mononuclear cell (BM-MNC) on cell migration, apoptosis and anti-inflammation. ADRC had as great angiogenic and anti-apoptotic effect as BM-MNC. However, anti-inflammation effect was stronger in ADRC than that in BM-MNC. In mice studies, we presented that ADRCs polarized into the IL-10-releasing M2 macrophages through PGE2-EP2/4 axis and suppressed the expressions of TNF- and IL-6 in the ischemic muscle. Gene expressions of several angiogenic cytokines were amplified in the macrophages cultured in ADRC-CM rather than BM-MNC-CM.

研究分野：再生医療

キーワード：脂肪由来間葉系幹細胞 血管新生 抗炎症作用 M2マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

急性心不全患者の約40%は、拡張障害に起因することが明らかになっており、これらの患者に対する治療法開発は臨床上大きな意義がある。これまでにこれらの患者群を対象に、アンギオテンシン阻害剤やβブロッカーを用いた臨床試験が施行されたが、十分な治療効果は確認されなかった。このように、左室拡張障害による心不全患者に対する治療は、左室収縮障害による心不全に対する治療とは根本的に異なる可能性が示唆された。一方で、我々はこれまでに脂肪由来間葉系前駆細胞(ADRC)は、目的臓器に移植することで、血管新生作用、リンパ管新生作用、抗炎症作用などを示すことを報告してきた。

2. 研究の目的

左室拡張障害を有する不全心に ADRC を移植することで、その病状改善効果があるかを検討する。また、有効性が確認された場合、どのような機序で心不全改善効果が示されるのかを検討する。

3. 研究の方法

左室心臓圧負荷モデルを作成し、皮下脂肪から ADRC を分離しそれを心筋内に移植することで、左室拡張能改善に寄与するか検討する。また、ADRC と骨髄由来単核球細胞(BM-MNC)を比較し、その有効性について検討する。また、抗炎症効果や血管新生作用が惹起されるメカニズムについても検討する。

4. 研究成果

左室心筋圧負荷モデルとして、大動脈結紮モデル(TAC)を作成して、ADRC 移植を行ったが、左室重量の低減、血清心不全マーカーの改善、生命予後ともに有意な改善は得られなかった。

そこで、ADRC がこれまでに血管新生作用を有する BM-MNC 移植と比べて、どのような違いがあるかについて、*in vitro* 実験でまず検証を行った。その結果を以下に示す。

(1)まず ADRC は HUVEC のチューブ形成に共役して働くことを *in-vitro* で確認した。またその際に ADRC は CD-31 を発現していることを確認した (Fig.1-2)。

(2)マトリジェルアッセイを行った結果、ADRC は BM-MNC と同程度の血管遊走能を有することを確認した (Fig.3)

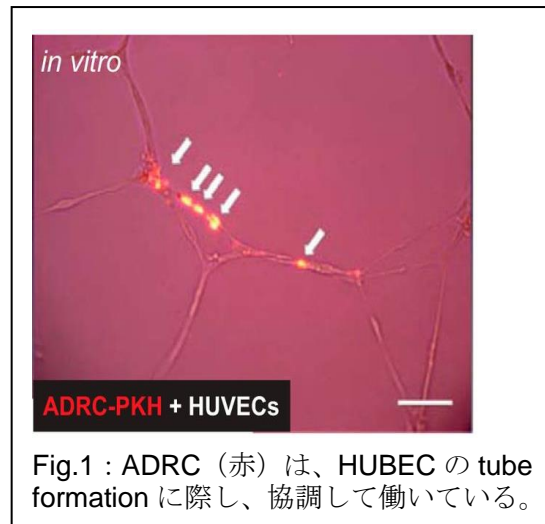


Fig.1 : ADRC (赤) は、HUVEC の tube formation に際し、協調して働いている。

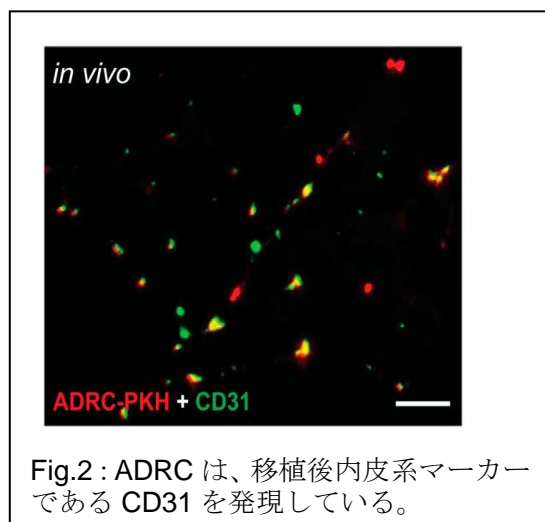


Fig.2 : ADRC は、移植後内皮系マーカーである CD31 を発現している。

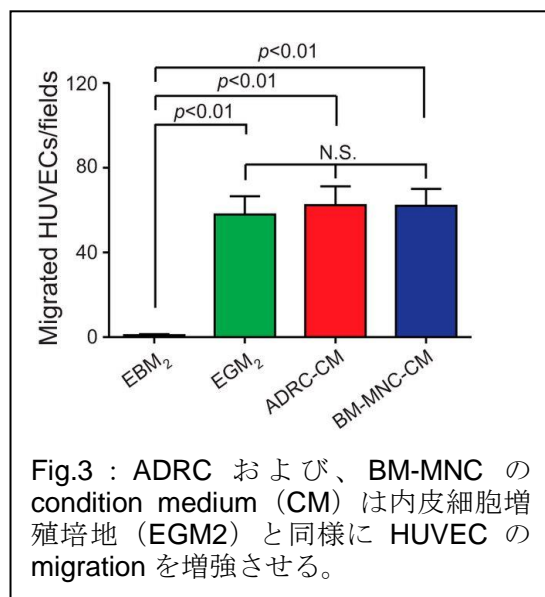


Fig.3 : ADRC および、BM-MNC の condition medium (CM) は内皮細胞増殖培地 (EGM2) と同様に HUVEC の migration を増強させる。

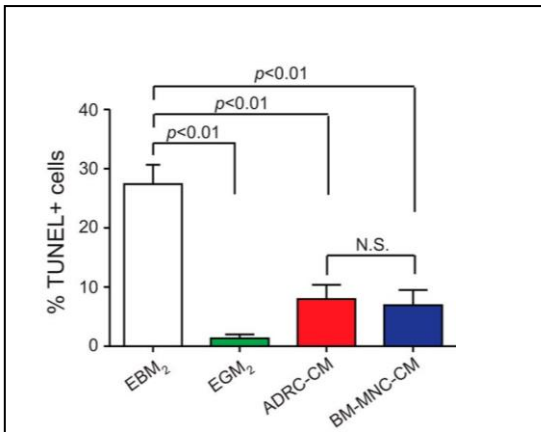


Fig.4: ADRC および BM-MNC の CM は、アポトーシスを抑制する。

(3) タネルアッセイの結果、ADRC は BM-MNC と同程度の血管新生効果及び抗アポトーシス効果を示すことを示唆していたため、その機序がどのようなメカニズムに起因するかを明らかにするため、マウス下肢虚血モデルを作成し、さらなる検討をおこなった。

以上の結果は、ADRC が BM-MNC と同程度の血管新生効果及び抗アポトーシス効果を示すことを示唆していたため、その機序がどのようなメカニズムに起因するかを明らかにするため、マウス下肢虚血モデルを作成し、さらなる検討をおこなった。

(4) 下肢虚血モデルでは、術後 35 日の時点で、対照群と比べて有意に ADRC 群と BM-MNC 群にて血流改善効果があることが示された (Fig.5)

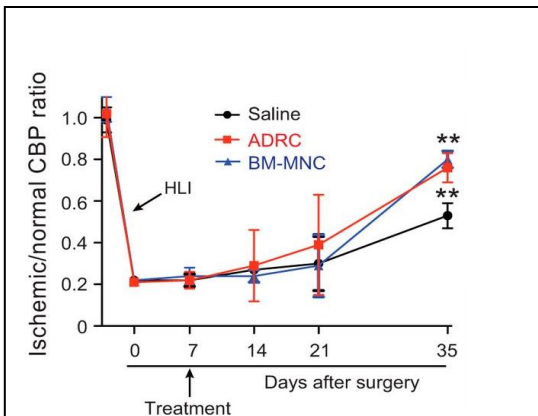


Fig.5 : 下肢虚血モデルにおいて ADRC と BM-MNC 移植は、有意に血流を回復させた。

(5) 次に、この下肢血流改善効果は、両細胞治療群で同様の機序によるのかを検討するために、それぞれの細胞が、低酸素や抗原物質などの存在下でどのように反応を示すか検討をおこなった。ペトリ皿上で ADRC と BM-MNC それぞれ培養し、低酸素環境下で抗原に暴露させた時の PGE₂ の分泌能を測定した。その結果、BM-MNC に比べて、ADRC にてより多く PGE₂ を分泌していることが確認された (Fig.6)

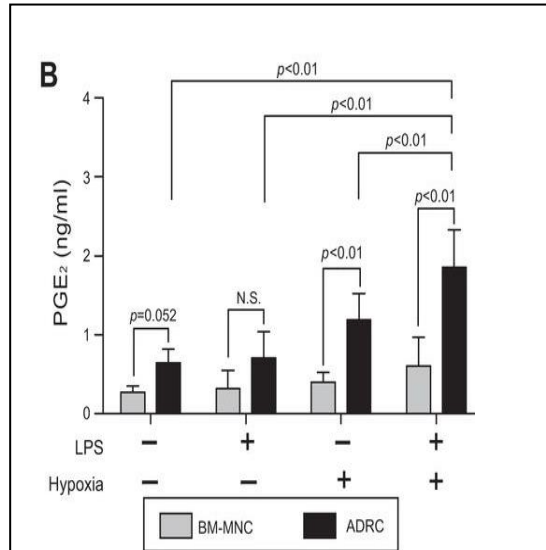


Fig.6 : ADRC は BM-MNC に比べより多くの PGE₂ を分泌しており、Hypoxia や LPS に反応してその分泌を増加させる。

この結果より、ADRC は BM-MNC に比べ、抗炎症作用が強い可能性が示唆された。そこでそれぞれのコンディションメディウムで単球細胞を培養した。その結果、ADRC は有意に抗炎症作用をもつ M2 マクロファージを増加させることがわかった (Fig.7)。

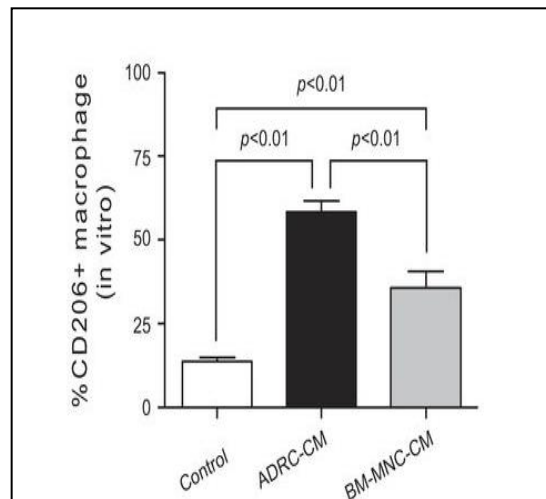


Fig.7 : BM-MNC に比べ ADRC の培養液で治療すると、マクロファージの中で特に抗炎症作用を有する M2 マクロファージ (CD206 陽性) が増加する。

(6) 次に、VEGF や HGF などの血管増殖因子や、IL-10 などの抗炎症物質が ADRC 移植組織にて増加しているかを検討した。その結果、ADRC は BM-MNC に比べ抗炎症作用が強いことがわかった (Fig.8-9)。

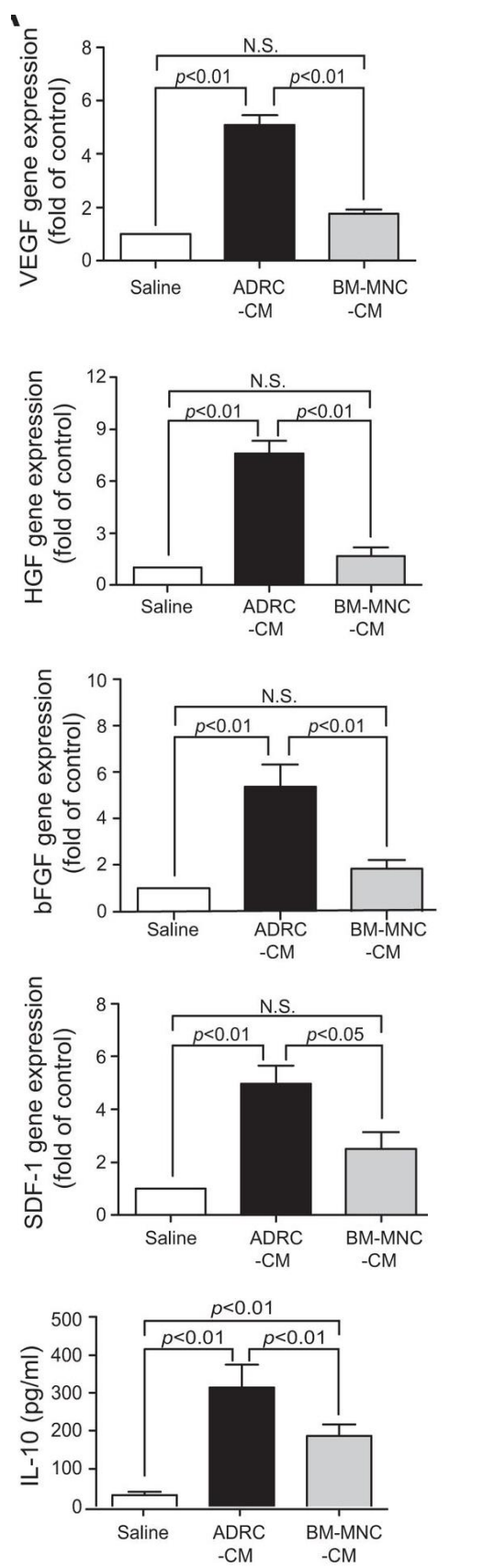


Fig. 8 : ADRC は BM-MNC に比べ VEGF や HGF などの血管新生因子や、IL-10 などの抗炎症サイトカインを多く分泌する。

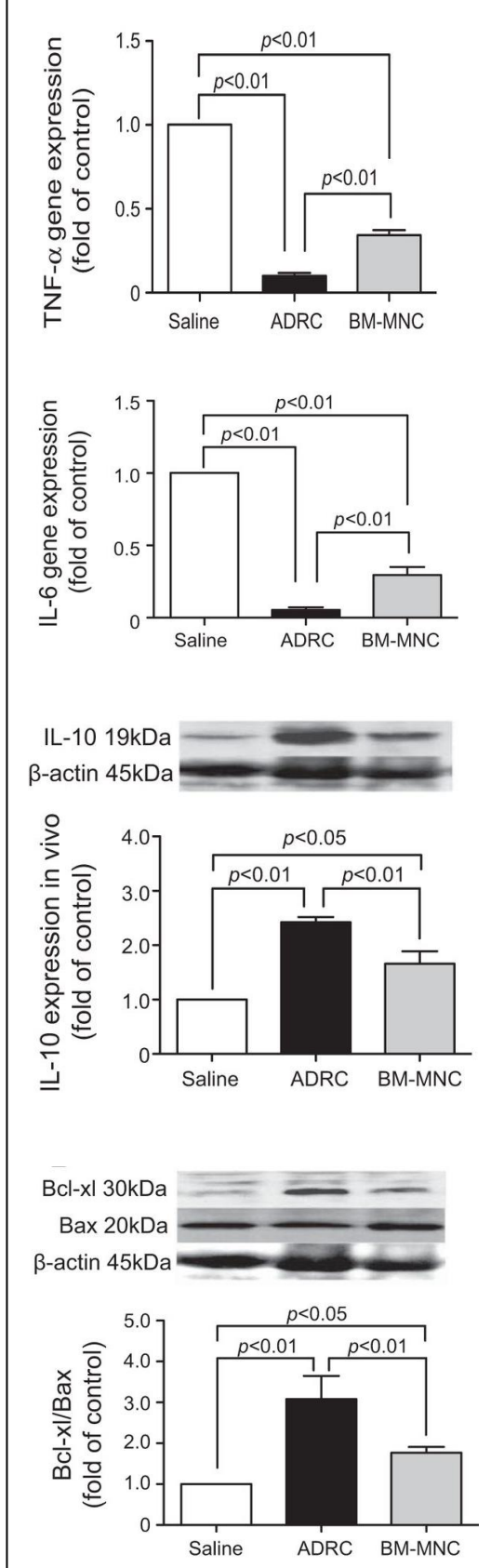


Fig.9 : ADRC 移植により、炎症反応は抑制され、抗炎症作用は亢進する。

これにより、ADRC は有意にアポトーシスを抑制していることが明らかになった。

(7) これまでに、ADRC は PGE2 分泌を促し、これが M2 マクロファージを誘導し、M2 マクロファージが IL-10 などの抗炎症サイトカインを分泌させることで血管新生作用が起こることを示した。そこで、この系に IL-10 が強く関与しているか検証するために、IL-10 の中和抗体を用いて、下肢虚血モデルを評価した。その結果、ADRC を移植しても、IL-10 を中和すると、血流改善効果は減弱した (Fig.10)。

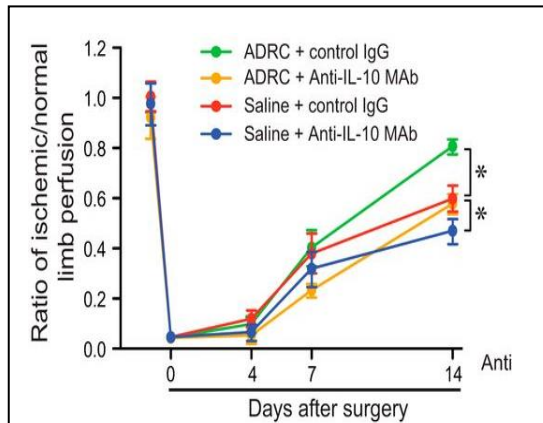


Fig.10 : ADRC 移植による血管新生効果は、抗炎症サイトカインである IL-10 の中和抗体によりキャンセルされる。このことから、ADRC は M2 マクロファージを介する IL-10 分泌を促進することで、血管新生に作用する。

Fig.11 に今回の研究で明らかになった ADRC の血管新生メカニズムのまとめを示す。

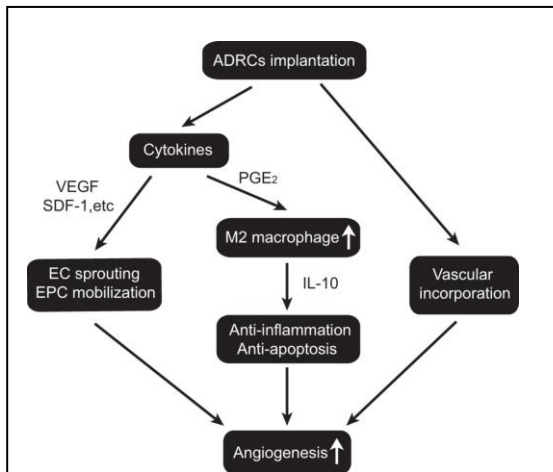


Fig.11 : ADRC は血管増殖因子を分泌し、更に抗炎症効果および、内因性血管新生細胞の動因を惹起することにより、血管新生を促進する。

今回の研究のまとめ

- ADRC は BM-MNC と同等以上の血管新生効果を示す可能性が示唆された。
- 移植された ADRC は細胞自体が新生血管に組み込まれている可能性が示唆された。
- ADRC の血管新生作用は、VEGF などの血管新生因子を分泌するだけでなく、M2 マクロファージの誘導とこれに続く IL-10 による抗炎症効果を示すことで、移植細胞及び組織の障害を低減させている可能性が示唆された。
- 当初、左室拡張障害心不全に対する ADRC 移植治療の有効性について検討したが、初期段階で有効性は乏しいという結果になった。今回の研究で、新たに ADRC 移植は強い抗炎症効果を示すことが証明できなため、今後は、ウイルス性や自己免疫機序による心筋炎に有効な治療として有用であるか検討していきたい。

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)

1. Hao C, Shintani S, Shimizu Y, Kondo K, Ishii M, Wu H and Murohara T.

Therapeutic angiogenesis by autologous adipose-derived

regenerative cells: comparison with bone marrow mononuclear cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.

2014;307:H869-79.

DOI: 10.1152/ajpheart.00310.2014、

(査読あり)

2. Ryo Hayashida, Kazuhisa Kondo, Sumio Morita, Satoshi Shintani, Yuuki Shimizu, John W. Calvert, Rei Shibata and Toyoaki Murohara. Diallyl trisulfide augments ischemia-induced angiogenesis via an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. In

press. (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

1. Shintani S. Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation. ISHR 2014, at Wink Aichi, Nagoya, Aichi, 2014.11

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新谷 理 (SHINTANI, Satoshi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座・准教授
研究者番号 : 20309777

(2) 研究分担者

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