

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860549

研究課題名(和文)心不全及び背景疾患が脂肪由来間葉系幹細胞の再生誘導効率に与える影響についての検討

研究課題名(英文)Impact of clinical characteristics on the yield of therapeutic adipose-derived mesenchymal stem cells in a cardiovascular disease

研究代表者

高島 伸一郎(Takashima, Shinichiro)

金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任助教

研究者番号：60547165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：心血管疾患に対する待機的手術を受けた患者17例を対象に、手術時に得た余剰皮下脂肪組織1-2gを酵素処理し、フローサイトメトリー法にて皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞のプロファイリングを施行し、背景疾患との関連を検討した。17例の平均年齢は72歳(男性は12例)、背景疾患の内訳は高血圧94%、脂質異常77%、糖尿病59%であった。左室駆出分画が40%未満の低心機能患者は24%であった。注目すべきことに再生治療効果が高いとされるCD271陽性細胞の含有比率は症例ごとに特に大きなばらつきを認め、個々の背景が皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞プロファイリングに影響し、治療効果に影響を及ぼす可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The problem of autologous stem cell therapy for cardiovascular disease is that a large variability of therapeutic effects among patients. We conducted a clinical study to examine the variation in yield of therapeutic stem cells in subcutaneous adipose tissue (SAT) among patients. From 17 patients who underwent cardiac surgery, 1-2g of SAT was obtained and digested with collagenase to isolate stromal vascular fraction (SVF). Mesenchymal stem cell markers in SVF were analyzed by flow cytometry. The frequency of the patients with hypertension, dyslipidemia and diabetes was 94%, 77% and 59%, respectively. Interestingly, the content of CD271-positive cells that is reported as a specific marker of therapeutic stem cells largely varied among patients and was associated with the specific clinical feature. These indicated that the clinical background would impact on yield of therapeutic stem cells in SAT and efficacy of cardiac stem cell therapy.

研究分野：再生治療

キーワード：間葉系幹細胞 皮下脂肪 心血管疾患

1. 研究開始当初の背景

- (1) 2002年以降、急性心筋梗塞あるいは慢性虚血性心不全に対する体性幹細胞(間葉系幹細胞)を用いた心臓再生治療に関する研究が進んでいる。自己骨髄由来幹細胞を急性心筋梗塞患者に冠動脈内投与すると慢性期の左室駆出分画(LVEF)を3%改善させたとメタ解析で報告されている。骨髄由来幹細胞は治療に用いる量を確保するには体外培養が必要であるが、皮下脂肪組織には骨髄と比較し約100倍の間葉系幹細胞が含まれており、低侵襲的に治療に必要な量の幹細胞を一挙に採取することが可能である利点があり、2012年に欧州で急性心筋梗塞患者に対するFirst-in-Manの第1相臨床試験結果が報告された(APOLLO試験)。治療後6ヶ月目の心筋梗塞巣を50%減少させたことが示された。
- (2) 金沢大学システム生物学(前恒常性制御学講座)・循環器内科では、厚労大臣からヒト幹細胞を用いる臨床研究の指針に基づく承認を得て、2013年より虚血性心不全に対する自己皮下脂肪由来間質細胞の冠動脈内移植の国内初安全性評価臨床試験を行っており、2015年11月には再生医療新法に則り、特定認定再生医療等委員会の審査を経て、厚労省より本研究の継続の承認を得ている。6症例の予定のうち、現在3症例について6ヶ月フォローアップまで終了している。興味深いことに当該3症例の脂肪組織由来間質細胞のフローサイトメトリーによる中間解析では、良質の間葉系マーカーとされる表面CD抗原のプロファイルは、症例間で大きく異なることが示された。
- (3) 以上より、個々の症例によって、脂肪組織由来幹細胞として分離する細胞集団の再生誘導効率が一定ではないことを意味し、治療効果のばらつきの一因になっている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

脂肪組織由来間質細胞に含まれる間葉系幹細胞のプロファイルに変化を与えうる候補としては、疾患背景(急性疾患:急性心筋梗塞、慢性疾患:虚血性心不全)や患者背景(糖尿病、高血圧、脂質異常、喫煙、肥満、加齢など)が考えられるが、高い再生治療効率を期待できる幹細胞集団の多寡を規定する要因は何かを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 当初の予定では、マウスの生活習慣病モデルマウスを作成し、フローサイトメトリー解析を行い、間葉系幹細胞マーカーの頻度の比較を行う計画であったが、マ

ウスモデルの作成が予定通りに進まなかったことから、金沢大学医学倫理委員会の承認を得て、ヒトの皮下脂肪組織の間葉系幹細胞のプロファイリングと背景疾患との関連を調べる臨床研究を実施することとした。

- (2) 学内倫理委員会承認をえて、待機手術患者の通常術式に際して、破棄される予定であった余剰皮下脂肪組織より、間葉系幹細胞を分離精製した。
- (3) 単細胞混濁液を、フローサイトメトリーを用いて細胞表面抗原解析を行い、間葉系幹細胞プロファイルを明らかにした。間質細胞群の表面抗原(CD34, CD90, CD31, CD44, CD271)を測定し、余剰皮下脂肪組織中に含まれる間葉系幹細胞の解析を行った。

4. 研究成果

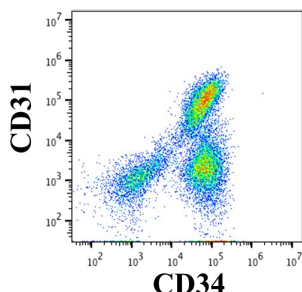
- (1) 心血管疾患に対する待機的手術を受けた患者17例をエントリーした。17例の平均年齢は72.2歳、男性12例、女性5例。高血圧94%、脂質異常77%、糖尿病59%、喫煙者65%であった。左室駆出分画が40%未満の低心機能患者は24%、有症候性心不全患者(NYHAII-III)は35%であった(下図)。

No. of Patients	17
Age, yr (min - max)	72.2 (55-84)
Gender, female, n (%)	5 (29%)
Body mass index, kg/m ²	24.8 ± 2.4
Heart failure (NYHA class II - III), n (%)	6 (35%)
Reduced ejection fraction (<40%), n (%)	4 (24%)
Ejection Fraction (%)	59.7 ± 16%
Hypertension, n (%)	16 (94%)
Dyslipidemia, n (%)	13 (77%)
Diabetes Mellitus, n (%)	10 (59%)
Chronic Kidney Disease, n (%)	8 (47%)
Smoking history, n (%)	11 (65%)
WBC (10 ³ /μL)	5570 ± 1112
Hb (g/dL)	12.6 ± 1.5
Plt (10 ⁴ /μL)	21.2 ± 5.5
Cr (mg/dL)	0.97 ± 0.63
eGFR (mL/min/1.73m ²)	68.3 ± 28.0
HbA1c (%)	6.1 ± 0.5
FBS (mg/dL)	103.8 ± 14.1
IRI (μU/mL)	6.9 ± 3.3
HOMA-IR	1.78 ± 0.87
LDL-C (mg/dL)	90.2 ± 28.4
HDL-C (mg/dL)	44.5 ± 9.7
hsCRP (mg/dL)	0.21 ± 0.28
BNP (pg/mL)	156.4 ± 195.4

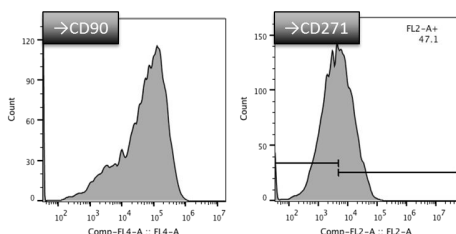
- (2) 以上の症例に対して、手術時に得た余剰皮下脂肪組織 1-2g を酵素処理して、

フローサイトメトリー法にて間質細胞群の表面抗原 (CD34, CD90, CD31, CD44, CD271) を測定した (下図)。

SVF cells are divided into 3 fractions
 1) CD31+/CD34+ = Endothelial Lineage
 2) CD31-/CD34+ = Mesenchymal Lineage
 3) dead cell, remained RBC, etc.



- (3) その結果、症例ごとに間質細胞群の表面抗原プロファイリングが大きく異なることが分かった。注目すべきは再生治療効果が高いとされる CD271 陽性細胞の含有比率 (CD34 陽性細胞に対する比) が症例ごとに特に大きくばらつきを認め、個々の背景が皮下脂肪由来間葉系幹細胞プロファイリングに影響し、治療効果に影響を及ぼす可能性が示唆された (下図)。



- (4) 得られた成果は第 80 回日本循環器学会学術集会 (一般演題ポスター発表) ならびに第 15 回日本再生医療学会総会 (一般演題口演) で発表した。

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)

- (1) de Jong R, van Hout GP, Houtgraaf JH, Takashima S, Pasterkamp G, Hoefler I, Duckers HJ.
 Cardiac function in a long-term follow-up study of moderate and severe porcine model of chronic myocardial infarction.
 Biomed Res Int. 2015;2015:209315.
- (2) Rho-kinase activation in leukocytes plays a pivotal role in myocardial ischemia/reperfusion injury.

Kitano K, Usui S, Ootsuji H, Takashima S, Kobayashi D, Murai H, Furusho H, Nomura A, Kaneko S, Takamura M.
 PLoS One. 2014 Mar 17;9(3):e92242.

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) Oto Inoue, Shin-ichiro Takashima, Soichiro Usui, Mitsuhiro Sugita, Takeshi Kato, Hisayoshi Murai, Hiroshi Furusho, Hirofumi Takemura, Yoshio Sakai, Shuichi Kaneko, Masayuki Takamura
 Insulin resistance predicts the yield of therapeutic stem cells in adipose tissue for autologous grafts in patients with cardiovascular disease
 第 80 回日本循環器学会学術集会
 2016 年 3 月 18 日 仙台国際センター
- (2) 井上己音、高島伸一郎、薄井莊一郎、杉田光洋、加藤武史、村井久純、古荘浩司、酒井佳夫、竹村博文、金子周一、高村雅之
 脂肪組織慢性炎症が間葉系幹細胞プロファイリングに及ぼす影響
 第 15 回日本再生医療学会総会
 2016 年 3 月 19 日 大阪国際会議場
- (3) Usui S, Inoue O, Sugita M, Takashima S, Kato T, Murai H, Furusho H, Sakai Y, Kaneko S, Takamura M.
 Adipose tissue-derived stromal cells exert beneficial effect to systemic responses following myocardial ischemia reperfusion.
 第 80 回日本循環器学会学術集会
 2016 年 3 月 18 日 仙台国際センター
- (4) 薄井莊一郎、井上己音、杉田光洋、高島伸一郎、加藤武史、村井久純、古荘浩司、酒井佳夫、金子周一、高村雅之
 脂肪由来間葉系細胞投与による心筋虚血再灌流後の全身応答への影響
 第 15 回日本再生医療学会総会
 2016 年 3 月 19 日 大阪国際会議場

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
 出願状況 (計 1 件)

名称: 冠動脈イベント予測のための方法および試薬
 発明者: 高島伸一郎、薄井莊一郎、高村雅之、金子周一
 権利者: 金沢大学
 種類:

番号：特願 2016-025657
出願年月日：2016 年 2 月 15 日
国内外の別： 国内 特許庁

取得状況（計 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

高島 伸一郎 (TAKASHIMA Shinichiro)
金沢大学医薬保健学総合研究科・特任助教
研究者番号： 60547165

(2) 研究分担者

井上 己音 (INOUE Oto)
金沢大学附属病院循環器内科・医員
研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：