

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461049

研究課題名(和文) 脂肪組織由来間質細胞による心筋再生医療の作用機序に関する研究

研究課題名(英文) The Mechanisms of Adipose Tissue Derived Regenerative Cells for Ischemic Heart Failure

研究代表者

高村 雅之(Takamura, Masayuki)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：60362000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：臨床研究(自己脂肪組織由来間質細胞を用いた再生医療に関する臨床研究～虚血性心不全に対して～)実施した際の臨床サンプルを用いて、再生細胞の特性解析、抗サイトカイン効果の解析を実施進めた。マウスモデルを用いた検討では、虚血再灌流障害モデルマウスに対して、脂肪組織由来再生細胞投与による心機能改善効果とその機序について解析を進めた。再生細胞投与による炎症性サイトカインの上昇抑制効果とそのシグナルについても解析を進めた。上記の結果の一部を、第80回日本循環器学会総会と第15回日本再生医療学会総会において発表した。

研究成果の概要(英文)：The analysis of adipose tissue derived regenerative cell were performed in patients who underwent our clinical study entitled "The Effect of Autologous Adipose Tissue Derived Regenerative Cells to Ischemic Heart Failure Patient". Part of the beneficial effects to improve the cardiac performance may be related with reduction of inflammatory cytokines such as IL-1B, TNF-A. Also we investigated the effect of adipose tissue derived regenerative cells to myocardial ischemia-reperfusion model mice. And the significant reduction of inflammatory cytokines and improved cardiac function were closely related with the infusion of regenerative cells. Part of these findings were presented at The 80th Annual Scientific Meeting of Japanese Circulation Society and The 15th Congress of The Japanese Society for Regenerative Medicine.

研究分野：循環器

キーワード：再生医療 脂肪組織由来再生細胞 虚血性心疾患 サイトカイン 遺伝子発現解析

## 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞を用いた再生治療では、投与する細胞数を確保することが必須のステップである。骨髄や末梢血から幹細胞・前駆細胞を得る場合は、培養増幅による澱雑で長時間に及ぶ調整作業を実施している。骨髄採取時の侵襲性が高く、感染などの合併率を増加させることも問題となっている。このように、骨髄などを用いた方法は、効率的かつ安全に必要な細胞数を確保し、障害臓器に迅速に投与することが容易でない。これらは、再生治療法開発の大きな障害となっている。

### 1) 脂肪組織由来再生細胞について

脂肪組織は比較的安全に、かつ、培養することなく必要十分な再生細胞を含んだ細胞群を調整できることから、その臨床応用が注目されている。皮下脂肪組織には、脂肪細胞のほかに、間質細胞が多数存在し、その中には相当数の、血管内皮、血管平滑筋、心筋細胞へ分化可能な間葉系幹細胞が含まれており脂肪組織由来間質細胞 (ADRC) と呼ばれている。申請者は、フローサイトメトリーにより、表面抗原を解析し、ADRCの性質は、右下表の通り骨髄由来幹細胞 (BMS) と酷似していることを確認している。さらに、採取皮下脂肪組織単位体積あたり、骨髄の 100~500 倍の幹細胞を含有していることも確認した。この ADRC は、皮下脂肪吸引法で採取した脂肪組織から、細胞分離装置 (Cellution system) を用いて間葉系幹細胞を約 5% 含む細胞群として濃縮分離することが可能である。本装置にて採取された患者自身の ADRC を用いて、種々の臓器、組織の再生に向けた臨床試験が国内外で進行中である。

### 2) ADRC を用いた虚血性心不全に対する再生治療について

ヨーロッパで 2007 年に子牛を用いた前臨床試験で有効性と安全性が報告された。また、2007 年 1 月からは**血行再建未施行の虚血性心疾患患者**を対象とした自己脂肪組織由来間質細胞療法 The PRECISE Trial (Clinical Trial . gov 番号 NCT00426868) が実施され有効性が報告された。申請者自身も、マウス、子豚を用いた前臨床試験による安全性と有効性を確認し、平成 24 年 8 月 24 日付けで、厚生労働省の**ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する審査委員会での審議を経て、厚生労働大臣の承認意見書を受けた**。この臨床研究では 6 例の虚血性心疾患による低左心機能患者に対する、自己脂肪組織由来間質細胞を経冠動脈的に投与する心筋再生治療の安全性、ならびに臨床上的有効性について検討することを目的としている。その臨床試験における副次的評価項目に血中サイトカイン、末梢血包括的発現遺伝子解析の項目などを記載し実施の承認を得ている。

### 3) 虚血性心不全の改善とサイトカインと

## の関連

虚血性心疾患による心筋リモデリングに関係する因子として、炎症の関与が注目されている。慢性心不全では、TNF $\alpha$  や IL-18 など炎症性サイトカインが上昇し、心不全の重症度と相関して活性化することも報告されてきた。この点で、RENEWAL 試験 (Circulation, 109:1594-1602.2004) など抗炎症治療が慢性心不全の治療として注目されるようになったが、TNF 抗体による単独のサイトカイン抑制は有効性が確認されなかった。しかし、非特異的な炎症抑制法として免疫修飾療法が ACCLAIM 試験 (Lancet, 371:228-236.2008) として有効性が報告された。この事は、本研究の ADRC による心筋再生の機序として、サイトカイン抑制を推測することに合致している。

## 2. 研究の目的

初年度 (平成 25 年度) 中に冠血行再建に成功している虚血性心不全患者 (左室駆出分画 40% 以下) を対照に、ADRC の冠動脈内投与臨床試験を実施する。細胞投与後 6 ヶ月までの安全性を観察し、心エコー、核医学検査、血清学的評価 (BNP 推移) を実施し、遺伝子発現解析ならびに各種生化学項目評価のための血清を系時的に保存する。**平成 25 年度**は患者のサンプルを採取保存するとともに、心筋虚血再灌流障害モデルマウスに対して ADRC を投与する実験系を用いて血中サイトカインおよび心筋、末梢血における包括的発現遺伝子解析と、治療効果との関連を明らかにする。**平成 26 年度**は、各種の条件を変更したマウスの実験を継続するとともに、臨床試験によって得られたヒト臨床材料を用いて**血中サイトカインの変動**や、**遺伝子発現解析**を網羅的に解析し、心機能ならびに臨床的心不全状態の推移と比較検討する。**平成 27 年度**はマウスおよび臨床試験材料の解析を継続する。

## 3. 研究の方法

臨床研究「自己脂肪組織由来間質細胞を用いた再生医療に関する臨床研究～虚血性心不全に対して～」では、皮下脂肪 (臀部または大腿背部) から自己脂肪組織由来間質細胞 (ADRC) を分離精製して調整後、冠動脈内に ADRC を投与する。その後、通常臨床で行う心機能評価を継続的に行うとともに、サイトカイン、ケモカイン測定ならびに末梢血遺伝子発現解析用血液を保存する。臨床経過は、6 ヶ月間、慎重に観察し安全性を十分に評価する。副次評価項目として被験者の血中サイトカイン、ケモカインの変動、さらには cDNA マイクロアレイによる包括的遺伝子発現解析を行い、細胞投与の効果を臨床症状、心エコー検査結果、核医学的検査結果、MRI 検査結果とともに

継時的に解析評価するとしている。本研究では、これら副次評価項目にあげた解析研究およびマウス実験を実施し、サイトカインおよび発現遺伝子の変動と患者の心不全改善効果との関連を明らかにすることによって、虚血性心不全に対する再生療法開発の基盤となる研究を行う。

#### 4. 研究成果

臨床研究（自己脂肪組織由来間質細胞を用いた再生医療に関する臨床研究～虚血性心不全に対して～）実施した際の臨床サンプルを用いて、再生細胞の特性解析、抗サイトカイン効果の解析を実施進めた。

マウスモデルを用いた検討では、虚血再灌流障害モデルマウスに対して、脂肪組織由来再生細胞投与による心機能改善効果とその機序について解析を進めた。再生細胞投与による炎症性サイトカインの上昇抑制効果とそのシグナルについても解析を進めた。

上記の結果の一部を、第 80 回日本循環器学会総会と第 15 回日本再生医療学会総会において発表した。

#### 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 14 件)

1. Single-Unit Muscle Sympathetic Nerve Activity Reflects Sleep Apnea Severity, Especially in Severe Obstructive Sleep Apnea Patients. Hamaoka T, Murai H, Kaneko S, Usui S, Okabe Y, Tokuhisa H, Kato T, Furusho H, Sugiyama Y, Nakatsumi Y, Takata S, Takamura M. *Front Physiol*. 2016 Mar 2;7:66. (査読あり)
2. Usefulness of Electrocardiographic Voltage to Determine Myocardial Fibrosis in Hypertrophic Cardiomyopathy. Konno T, Nagata Y, Teramoto R, Fujino N, Nomura A, Tada H, Sakata K, Furusho H, Takamura M, Nakamura H, Kawashiri MA, Yamagishi M, Hayashi K. *Am J Cardiol*. 2016 Feb 1;117(3):443-9. (査読あり)
3. Inflammation of left atrial epicardial adipose tissue is associated with paroxysmal atrial fibrillation. Kusayama T, Furusho H, Kashiwagi H, Kato T, Murai H, Usui S, Kaneko S, Takamura M. *J Cardiol*. 2015 Dec 10. pii:S0914-5087(15) 00371-8. (査読あり)
4. Landiolol, an ultra-short-acting  $\beta$ 1-blocker, is useful for managing supraventricular tachyarrhythmias in sepsis. Okajima M, Takamura M, Taniguchi T. *World J Crit Care Med*. 2015 Aug 4;4(3):251-7. (査読あり)
5. Electrocardiographic QRS Fragmentation as a Marker for Myocardial Fibrosis in Hypertrophic Cardiomyopathy. Konno T, Hayashi K, Fujino N, Oka R, Nomura A, Nagata Y, Hodatsu A, Sakata K, Furusho H, Takamura M, Nakamura H, Kawashiri MA, Yamagishi M. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2015 Oct;26(10):1081-7. (査読あり)
6. Different responses of arterial blood pressure to electrical stimulation of the renal artery in patients with resistant hypertension. Murai H, Okuyama Y, Sakata Y, Kaneko S, Hamaoka T, Okabe Y, Usui S, Furusho H, Takamura M. *Int J Cardiol*. 2015 Jul 1;190:296-8. (査読あり)
7. Differential effects of azelnidipine and amlodipine on sympathetic nerve activity in patients with primary hypertension. Inomata J, Murai H, Kaneko S, Hamaoka T, Ikeda T, Kobayashi D, Usui S, Furusho H, Sugiyama Y, Takata S, Takamura M. *J Hypertens*. 2014 Sep;32(9):1898-904. (査読あり)
8. Separated right and left ventricular excitation during right ventricular septal pacing in a patient with narrow QRS wave: a case report. Yaegashi T, Furusho H, Chikata A, Usui S, Kaneko S, Yamagishi M, Takamura M. *J Med Case Rep*. 2014 May 21;8:158. (査読あり)
9. Coronary vessel floating sign and vasospastic angina in a patient with cardiac lymphoma. Chikata A, Sakagami S, Kanamori N, Kato C, Omi W, Saeki T, Nagai H, Kawashima A, Usui S, Takamura M. 2014.06.081. Epub 2014 Jul 8. (査読あり)
10. 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. (査読あり)
11. Muscle-specific RING finger 1 negatively regulates pathological cardiac hypertrophy through downregulation of calcineurin A. Maejima Y, Usui S, Zhai P, Takamura M, Kaneko S, Zablocki D, Yokota M, Isobe M, Sadoshima J. *Circ Heart Fail*. 2014 May;7(3):479-90. (査読あり)
12. Hemodynamic collapse induced by general anesthesia in a patient with an unruptured thoracic aortic aneurysm: a case report. Inoue O, Murai H, Kaneko S, Usui S, Furusho H, Takamura M. *BMC Cardiovasc Disord*. 2013 Dec 27;13:122. doi: 10.1186/1471-2261-13-122. (査読あり)
13. Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4(+) T-cell suppression. Higashimoto M, Sakai Y, Takamura M, Usui S, Nasti A, Yoshida K,

Seki A, Komura T, Honda M, Wada T, Furuichi K, Ochiya T, Kaneko S. Eur J Immunol. 2013 Nov;43(11):2956-68. (査読あり)

14. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a murine steatohepatitis-induced cirrhosis model. Seki A, Sakai Y, Komura T, Nasti A, Yoshida K, Higashimoto M, Honda M, Usui S, Takamura M, Takamura T, Ochiya T, Furuichi K, Wada T, Kaneko S. Hepatology. 2013 Sep;58(3):1133-42. (査読あり)

〔学会発表〕(計 4件)

1. 第15回日本再生医療学会総会(大阪)  
「脂肪組織慢性炎症が間葉系幹細胞プロファイルに及ぼす影響」井上乙音, 薄井莊一郎, 杉田光洋, 高島伸一郎, 加藤武史, 村井久純, 古荘浩司, 竹村博文, 酒井佳夫, 金子周一, 高村雅之. 2016年3月19日大阪国際会議場(大阪府大阪市)
2. 第80回日本循環器学会総会(仙台)  
「Adipose Tissue-derived Stromal cells Exert Beneficial Effect to Systemic Responses Following yocardial Ischemia Reperfusion」Soichiro Usui, Oto Inoue, Shinichiro Takashima, Hiroshi Ohtsuji, Hisayoshi Murai, Shuichi Kaneko, Masayuki Takamura. 2016年3月18日. 仙台国際センター(宮城県仙台市)
3. 第80回日本循環器学会総会  
「Insulin Resistance Predicts the Yield of Therapeutic Stem Cells in Adipose Tissue for Autologous Grafts in Patients with Cardiovascular Disease」Oto Inoue, Soichiro Usui, Mitsuhiro Sugita, Shinichiro Takashima, Takeshi Kato, Hisayoshi Murai, Hiroshi Furusho, Hirofumi Takemura, Yoshio Sakai, Shuichi Kaneko, Masayuki Takamura 2016年3月18日. 仙台国際センター(宮城県仙台市)
4. 第15回日本再生医療学会総会(大阪)  
「脂肪組織由来間葉系幹細胞投与による心筋虚血再灌流障害後の全身応答への影響」薄井莊一郎, 高村雅之, 井上乙音, 高島伸一郎, 酒井佳夫, 金子周一. 2016年3月17日大阪国際会議場(大阪府大阪市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m-kanazawa.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高村 雅之 (Takamura Masayuki)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号: 60362000