

令和 元年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09425

研究課題名(和文) 脂肪組織を用いた心不全再生医療に重要なサイトカイン抑制型因子の同定

研究課題名(英文) Adipose tissue derived regenerative cells &amp; cytokine modification factor

研究代表者

高村 雅之 (Takamura, Masayuki)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：60362000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：循環器病学領域における再生医療の確立を目指した研究を継続してきている。特に、重症心不全に対する心筋再生医療開発と、重症下肢虚血に対する血管新生医療開発を行ってきた。臨床研究における余剰細胞の機能解析に加えて、動物実験を並行して行い、再生医療に最適なエリート幹細胞の確立と、その機序の解明を行ってきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

循環器領域における再生医療の実用化は、高齢社会における健康長寿を目指す上で、極めて重要な領域であると期待されています。今回の脂肪組織由来再生細胞の心機能改善や血管機能改善の機序解明と有効性向上のための研究成果は、国際学会でも注目されました。

今後は、培養細胞での検討結果、動物実験での検討にヒト臨床試験結果を総合して考察し、重症心不全、血管不全患者に対する間葉系幹細胞を用いた、より安全で、より有効な再生医療実現を加速させる予定です。

研究成果の概要(英文)：My research project were focused and continued to establish the regenerative medicine in the field of cardiovascular diseases. In particular, development of myocardial regeneration therapy and for severe heart failure and vascularization therapy for severe peripheral limb ischemia had been conducted. In addition, the functional analysis of surplus cells in clinical regenerative trial, animal experiments have been conducted simultaneously to establish elite stem cells that are optimal for regenerative medicine and to elucidate their mechanisms.

研究分野：循環器

キーワード：再生医療 重症心不全 脂肪由来幹細胞 サイトカイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

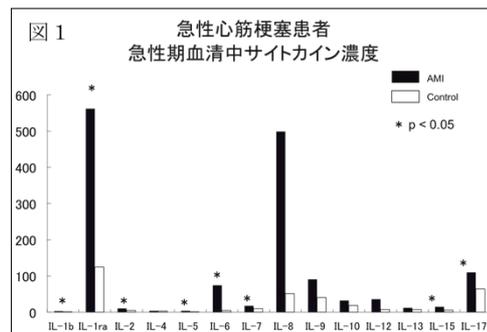
1) 自己脂肪組織由来再生細胞 (ADRC) の優位性について:

再生医療では、必要な幹細胞数の確保が重要なプロセスである。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、骨髄の100倍以上の、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再生細胞 (ADRC) と呼ばれている。このため、安全に、かつ、培養せずに十分な再生細胞を調整でき、その臨床応用が注目されている。申請者は、ヒト、マウスのADRCをフローサイトメトリーにより解析し、細胞表面抗原が、右表の通り、骨髄由来幹細胞と酷似していることを確認している。さらに、脂肪組織単位体積あたり、骨髄の100倍以上の幹細胞を含有していることも確認した。このADRCは、吸引採取した皮下脂肪組織から、細胞分離装置 (Cellution system) を用いて間葉系幹細胞を含む細胞群として濃縮分離出来る。本装置で採取した患者自身のADRCを用いた再生医療の臨床試験は、循環器、消化器、形成外科、泌尿器など種々の領域で、国内外で進行中である。

細胞表面抗原	発現パターン	
	ADRC	BMS
CD9	+	+
CD10	+	+
CD13	+	+
CD29	+	+
CD31	-	-
CD34	-	-
CD44	+	+
CD45	-	-
CD49	+	+
CD54	+	+
CD55	+	+
CD59	+	+
CD90	+	+
CD105	+	+
CD106	-	+
CD117	+	+
CD146	+	+
CD166	+	+
STRO-1	+	+

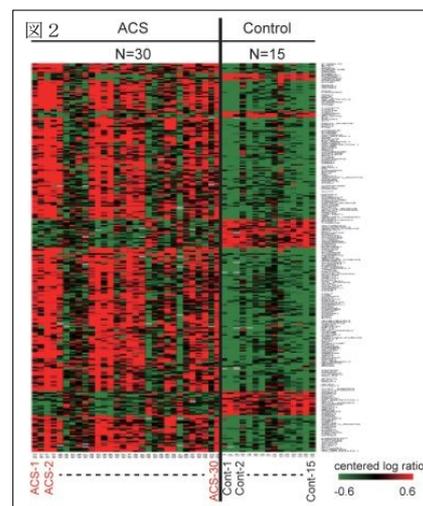
2) ADRCを用いた虚血性心不全に対する再生治療について:

ヨーロッパでは、ADRCを用いた再生医療として血行再建未施行の虚血性心不全患者を対象としたPRECISE Trial (Clinical Trial.gov 番号 NCT00426868) と、急性心筋梗塞患者を対象としたAPOLLO Trial (Clinical Trial.gov 番号 NCT00442806) が実施され、2013年に有効性が報告された。申請者も、マウス、子豚を用いた前臨床試験により安全性と有効性を確認し、平成24年に、厚生労働省の承認を受け、冠血行再建後も心機能の改善しない虚血性心不全患者に対して、ADRCを冠動脈内に投与する心筋再生治療を実施し、血中サイトカインプロファイリングを行い、ADRCによるサイトカイン抑制を確認している。

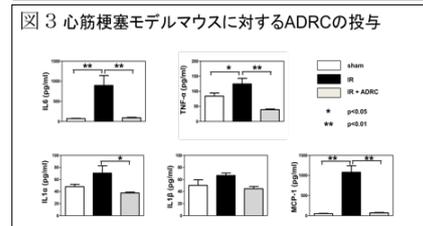


3) ADRC投与による虚血性心不全モデルマウスにおける炎症性サイトカインの変動:

心筋虚血後の心筋リモデリングにTNF やIL-1 など炎症性サイトカイン上昇の関与が注目されている。申請者も、図1のように急性心筋梗塞患者の血中サイトカインプロファイリングを行い、健常者に比べて著増していることを確認した。



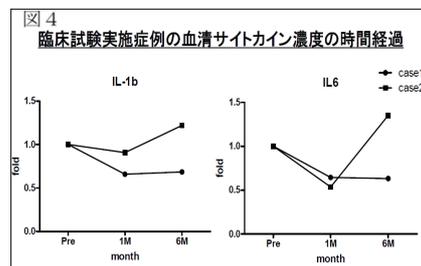
また、図2に示すように、急性心筋梗塞の発症時には、血液中の細胞において炎症に関連する多彩な遺伝子の発現が亢進していることを確認した。これらのことを背景にRENEWAL試験 (Circulation, 109:1594-1602.2004) など、慢性心不全の治療として、抗炎症療法が治療法として注目されるようになった。しかし、抗TNF抗体による単独のサイトカイン抑制は無効であることが示された。一方、非特異的な炎症抑制法として、ACCLAIM試験 (Lancet, 371:228-236.2008) が実施され、免疫修飾治療が有効で



あったと報告されている

申請者は、図3のように、心筋梗塞モデルマウスにおける炎症性サイトカインの定量を行い、ADRC 投与によるサイトカイン上昇の抑制と、これに相関する心機能の改善を確認した。

臨床試験実施症例の血清サイトカイン濃度の検討を行うと、症例間に差がみられるもののADRC 投与によって血中サイトカイン濃度 (IL-1, IL-6) が変動することが示された。



これまでの臨床試験の結果から、ADRC を用いた虚血性心疾患に対する細胞治療は一定の効果はあることが示されており、その「心不全のADRCを用いた再生医療にはサイトカインの抑制を介する臨床効果が認められ、ADRC 投与後の抗サイトカイン効果を持続させることにより、更なる有効性の向上が期待できる」との仮説をたて、本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、虚血性心不全の再生因子を同定するため、以下の項目を明らかにする。

- A) 冠血行再建後も低左心機能状態にある虚血性心不全患者に対する、ADRC の投与臨床試験より得られる余剰 ADRC を用いて、網羅的サイトカインプロファイリング、包括的遺伝子発現解析、細胞表面抗原の解析を行い、治療効果に及ぼす因子を検討する。
- B) ヒト余剰 ADRC およびマウス ADRC を用いて、心筋虚血モデルマウスにおける、ADRC の主要臓器への生着分布、サイトカイン抑制効果を評価し、マウスモデルへの心不全抑制作用との相関を検討する。サイトカイン抑制作用を有する ADRC の解析を行い、研究最終年度までに虚血性心不全の再生因子を同定する。

## 3. 研究の方法

虚血性心不全患者に ADRC を投与する臨床試験は、附属病院の臨床研究助成金などの研究費を用いて実施する。臨床試験では、吸引採取した患者自身の皮下脂肪から、ADRC を分離精製し、細胞数など調整後、冠動脈内に投与する。余剰 ADRC は、本研究のため、それぞれ保存する。また、ADRC 投与の効果は血清サイトカイン濃度、末梢血遺伝子発現解析を用いて経時的に評価する。本研究では、これら副次評価項目にあげた評価による臨床効果と、

A) 投与する ADRC の cDNA マイクロアレイ、細胞表面抗原解析などによるプロファイルとの相関

B) 余剰ヒト ADRC およびマウスから得られる ADRC をマウス心筋虚血モデルに投与した際の、マウスモデルへの保護作用との相関を検討する。マウス ADRC の個体差、調整条件、細胞の特性を解析し、これらの ADRC 投与と心不全改善効果との知見から、サイトカインの抑制効果を指標として虚血性心不全に対する再生因子の同定を試みる。

## 4. 研究成果

A) 投与する ADRC の遺伝子発現解析と臨床データの解析により、再生効率の優れた幹細胞(エリート幹細胞)の含有率(発現率)は、患者皮下組織の炎症、インスリン抵抗性などと逆相関しており、細胞表面抗原解析と合わせることで、一部の成長因子受容体と強い相関を示していることを確認した。

B) 余剰ヒト ADRC およびマウスから得られる ADRC をマウス心筋虚血モデルに投与した際の、マウス虚血モデルへの再生効果の相関を検討したところ、採取した宿主側の因子によって再生に重要なサイトカインの抑制効果に有意差を確認し、複数個の再生因子候補を同定し

た。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

1. Adipose tissue-derived stem cells prevent fibrosis in murine steatohepatitis by suppressing IL-17-mediated inflammation. Yamato M, Sakai Y, Mochida H, Kawaguchi K, Takamura M, Usui S, Seki A, Mizukoshi E, Yamashita T, Yamashita T, Ishida K, Nasti A, Tuyen HTB, Komura T, Yoshida K, Wada T, Honda M, Kaneko S. *J Gastroenterol Hepatol*. 2019 Mar 3. doi: 10.1111/jgh.14647. [Epub ahead of print] (査読有)
2. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 promotes neointimal hyperplasia in a mouse model of carotid artery injury. Kitano T, Usui S, Takashima SI, Inoue O, Goten C, Nomura A, Yoshioka K, Okajima M, Kaneko S, Takuwa Y, Takamura M. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Mar 26;511(1):179-184. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.02.047. Epub 2019 Feb 15. (査読有)
3. Endogenous muscle atrophy F-box is involved in the development of cardiac rupture after myocardial infarction. Usui S, Chikata A, Takatori O, Takashima SI, Inoue O, Kato T, Murai H, Furusho H, Nomura A, Zablocki D, Kaneko S, Sadoshima J, Takamura M. *J Mol Cell Cardiol*. 2019 Jan;126:1-12. doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.11.002. Epub 2018 Nov 6. (査読有)
4. Differential effects of lipophilic and hydrophilic statins on muscle sympathetic nerve activity in heart failure with preserved left ventricular ejection fraction. Tokuhisa H, Murai H, Okabe Y, Hamaoka T, Sugimoto H, Mukai Y, Inoue O, Takashima SI, Kato T, Usui S, Furusho H, Kaneko S, Takamura M. *Auton Neurosci*. 2018 Sep;213:8-14. doi: 10.1016/j.autneu.2018.04.006. Epub 2018 Apr 30. (査読有)
5. Comparison of Human Selenoprotein P Determinants in Serum between Our Original Methods and Commercially Available Kits. Saito Y, Misu H, Takayama H, Takashima SI, Usui S, Takamura M, Kaneko S, Takamura T, Noguchi N. *Biol Pharm Bull*. 2018;41(5):828-832. doi: 10.1248/bpb.b18-00046. (査読有)
6. Endogenous Selenoprotein P, a Liver-Derived Secretory Protein, Mediates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. Chadani H, Usui S, Inoue O, Kusayama T, Takashima SI, Kato T, Murai H, Furusho H, Nomura A, Misu H, Takamura T, Kaneko S, Takamura M. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 16;19(3). pii: E878. doi: 10.3390/ijms19030878. (査読有)
7. Effects of mineralocorticoid receptor antagonists on responses to hemorrhagic shock in rats. Yamamoto K, Yamamoto T, Takamura M, Usui S, Murai H, Kaneko S, Taniguchi T. *World J Crit Care Med*. 2018 Feb 4;7(1):1-8. doi: 10.5492/wjccm.v7.i1.1. eCollection. (査読有)
8. Augmented sphingosine 1 phosphate receptor-1 signaling in cardiac fibroblasts induces cardiac hypertrophy and fibrosis through angiotensin II and interleukin-6. Ohkura SI, Usui S, Takashima SI, Takuwa N, Yoshioka K, Okamoto Y, Inagaki Y, Sugimoto N, Kitano T, Takamura M, Wada T, Kaneko S, Takuwa Y. *PLoS One*. 2017 Aug 3;12(8):e0182329. doi:10.1371/journal.pone.0182329. (査読有)
9. The CD45<sup>+</sup> fraction in murine adipose tissue derived stromal cells harbors immune-inhibitory inflammatory cells. Nasti A, Sakai Y, Seki A, Buffa GB, Komura T,

- Mochida H, Yamato M, Yoshida K, Ho TTB, Takamura M, Usui S, Wada T, Honda M, Kaneko S. Eur J Immunol. 2017 Dec;47(12):2163-2174. doi: 10.1002/eji.201646835. (査読有)
10. -Cryptoxanthin exerts greater cardioprotective effects on cardiac ischemia-reperfusion injury than astaxanthin by attenuating mitochondrial dysfunction in mice. Pongkan W, Takatori O, Ni Y, Xu L, Nagata N, Chattipakorn SC, Usui S, Kaneko S, Takamura M, Sugiura M, Chattipakorn N, Ota T. Mol Nutr Food Res. 2017 May 20. doi: 10.1002/mnfr.201601077. (査読有)
  11. Long-Term Administration of Eicosapentaenoic Acid Improves Post-Myocardial Infarction Cardiac Remodeling in Mice by Regulating Macrophage Polarization. Takamura M, Kurokawa K, Ootsuji H, Inoue O, Okada H, Nomura A, Kaneko S, Usui S. J Am Heart Assoc. 2017 Feb 21;6(2). pii: e004560. doi: 10.1161/JAHA.116.004560. (査読有)
  12. Significant correlation between renal <sup>123</sup>I-metaiodobenzylguanidine scintigraphy and muscle sympathetic nerve activity in patients with primary hypertension. Takamura M, Murai H, Okabe Y, Okuyama Y, Hamaoka T, Mukai Y, Tokuhisa H, Inoue O, Takashima SI, Kato T, Matsuo S, Usui S, Furusho H, Kaneko S. J Nucl Cardiol. 2017 Apr;24(2):363-371. doi: 10.1007/s12350-016-0760-4. (査読有)
  13. Endothelial-mesenchymal transition in human atrial fibrillation. Kato T, Sekiguchi A, Sagara K, Tanabe H, Takamura M, Kaneko S, Aizawa T, Fu LT, Yamashita T. J Cardiol. 2016 Dec 6. pii: S0914-5087(16)30281-7. doi: 10.1016/j.jjcc.2016.10.014. (査読有)
  14. Sodium 4-Phenylbutyrate Attenuates Myocardial Reperfusion Injury by Reducing the Unfolded Protein Response. Takatori O, Usui S, Okajima M, Kaneko S, Ootsuji H, Takashima SI, Kobayashi D, Murai H, Furusho H, Takamura M. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2016 Dec 1. (査読有)
  15. 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. 2016 Nov;68(5):406-411. (査読有)
  16. Adipose-derived regenerative cells exert beneficial effects on systemic responses following myocardial ischemia/reperfusion. Takamura M, Usui S, Inoue O, Ootsuji H, Takashima SI, Nomura A, Kato T, Murai H, Furusho H, Sakai Y, Kaneko S. Cardiol J. 2016;23(6):685-693. (査読有)
  17. Short-term rapid atrial pacing alters the gene expression profile of rat liver: Cardiohepatic interaction in atrial fibrillation. Yaegashi T, Kato T, Usui S, Kanamori N, Furusho H, Takashima SI, Murai H, Kaneko S, Takamura M. Heart Rhythm. 2016 Dec;13(12):2368-2376. (査読有)
  18. Altered gene expression in T-cell receptor signalling in peripheral blood leucocytes in acute coronary syndrome predicts secondary coronary events. Takashima S, Usui S, Kurokawa K, Kitano T, Kato T, Murai H, Furusho H, Oda H, Maruyama M, Nagata Y, Usuda K, Kubota K, Takeshita Y, Sakai Y, Honda M, Kaneko S, Takamura M. Open Heart. 2016 Jun 30;3(1):e000400. doi: 10.1136/openhrt-2016-000400. eCollection 2016. (査読有)
- [学会発表](計 3 件)

1. Human CD271-positive Adipose Derived Stem Cells are the Angiogenic Subset with Less-aged and Less-fibrotic gene expression profile. O. Inoue, S. Usui, S. Takashima, C. Goten, T. Hamaoka, H. Otsuji, A. Nomura, K. Iino, H. Murai, H. Furusho, H. Takemura, S. Kaneko, M. Takamura. AHA Scientific Sessions 2018
2. Human CD271-positive Adipose Derived Stem Cells are the Angiogenic Subset with Pericytic Gene Profile and Enhanced Engraftment Capacity in Cell Therapy. Oto Inoue, Soichiro Usui, Chiaki Goten, Takuto Hamaoka, Hideki Tokuhisa, Ayano Nomura, Hiroshi Otsuji, Shin-ichiro Takashima, Hisayoshi Murai, Hiroshi Furusho, Kenji Iino, Hirofumi Takemura, Shuichi Kaneko, Masayuki Takamura. 第 82 会日本循環器学会総会
3. Adipose Tissue Inflammation and the Quality of Adipose-Derived Stem Cells in Patients with Cardiovascular Diseases. Takamura M. World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell.

〔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://intmed2.w3.kanazawa-u.ac.jp/staff/>

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

<https://web.hosp.kanazawa-u.ac.jp/patients/info/cvm.html>

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。