

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461062

研究課題名(和文) 脂肪組織由来幹細胞を用いた新規血管新生療法の開発

研究課題名(英文) Therapeutic angiogenesis using adipose-derived regenerative cell

研究代表者

池田 宇一 (IKEDA, Uichi)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：30221063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織由来幹細胞を用いた血管新生療法の臨床試験および基礎研究を行った。臨床試験では、四肢切断を回避できないFontaine分類IIIあるいはIV度の末梢動脈疾患患者の虚血四肢に脂肪組織由来幹細胞を筋注した。治療を受けた4名全員において、自覚症状および臨床所見の改善が認められた。基礎研究では、心筋梗塞モデルラットの梗塞部位に脂肪組織由来幹細胞を移植することにより、梗塞範囲の縮小、心機能の改善が認められた。以上より、脂肪組織由来幹細胞は骨髄幹細胞に代わる血管新生療法の治療細胞源になりうる事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Clinical studies and basic research on angiogenesis therapy using adipose tissue-derived stem cells were carried out. In clinical trials, adipose tissue-derived stem cells were intramuscularly injected into the ischemic limbs of patients with peripheral artery disease of Fontaine class III or IV who can not avoid limb amputation. Improvement of subjective symptoms and clinical findings was observed in all 4 patients who received treatment. In basic research, transplantation of adipose tissue-derived stem cells into the infarcted site of the myocardial infarction model rat revealed a reduction in infarct range and an improvement in cardiac function. From the above, it became clear that adipose tissue - derived stem cells can serve as a therapeutic source of angiogenesis therapy in place of bone marrow stem cells.

研究分野：循環器内科

キーワード：末梢動脈疾患 血管再生療法 脂肪組織由来幹細胞

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、閉塞性動脈硬化症やパージャージャー病による重症虚血肢に対して自己骨髄幹細胞移植が有効かつ安全であることを世界で初めて報告した (TACT Study, Lancet 360:427-35, 2002)。本治療法は2003年には厚生労働省から再生医療分野では初めて先進医療の保険適用を承認されている。また、2004年～2010年膠原病関連血管炎に対する血管新生療法の多施設共同臨床試験 (厚労省科研費、主任研究者池田宇一) を実施し、強皮症を始めとする膠原病患者の虚血肢に対しても骨髄幹細胞移植が有効であることを明らかにしている。

一方、本治療法においては骨髄幹細胞の採取に全身麻酔を必要とするため、患者の負担が大きく、そのため再移植も困難である等の問題点が明らかとなってきた。さらに、高齢者の多い閉塞性動脈硬化症患者では採取できる骨髄幹細胞数が少ないため、パージャージャー病や膠原病患者に比べ移植効果が低いことも明らかとなってきた。そこで、骨髄幹細胞に代わる新たな治療細胞源が求められていた。

2. 研究の目的

近年、脂肪組織中に幹細胞の存在が報告され、この細胞を用いた再生医療の開発が注目されている。脂肪組織は局所麻酔下で腹壁皮下より簡便かつ大量に採取可能であり、さらに骨髄組織に比べ約500倍の幹細胞が存在する。この脂肪組織由来幹細胞を用いることで、より有効かつ安全な再生医療が可能となり、治療対象患者の拡大も期待される。

そこで本研究では、脂肪組織由来幹細胞を用いた重症虚血肢および虚血性心疾患に対する血管新生療法の開発を目指す。まず、(1) 研究代表者らが多くの治療経験を持つ重症虚血肢患者を対象に脂肪組織由来幹細胞を用いた血管新生療法の臨床試験を実施する。併せて、(2) 虚血性心疾患に対する脂肪組織由来幹細胞移植の有用性を心筋梗塞モデル動物を用いた基礎研究により検証する。

3. 研究の方法

(1) 重症虚血肢に対する血管新生療法の臨床試験

<対象> 25歳以上80歳未満のFontaine分類III～IV度の末梢動脈疾患 (閉塞性動脈硬化症、パージャージャー病、膠原病) の患者。まず、禁煙を含む生活指導、薬物療法、血行再建術などの従来からの標準的治療を最大限行う。これら標準的治療によっても四肢切断が回避できない重症虚血肢患者のうち、循環器内科医、心臓血管外科医、形成外科医、血液内科医で構成される検討委員会で脂肪組織由来幹細胞移植の適応と判断され、インフォームド・コンセントが得られた患者に対して本治療を実施する。従来の骨髄幹細胞移植療法に準じて、悪性腫瘍合併例、未治療の虚血性心疾患、未治療の重症糖尿病性網膜症、重篤な感染症、高度の肝障害・腎障害、妊娠症例および同意が得られない患者は除外する。

<方法> 手術室において局所麻酔下に腹壁皮下脂肪組織を250g吸引し、セルーション遠心分離器により脂肪組織由来幹細胞を分離する (所要時間は1～2時間)。本分離システムは無菌状態の閉鎖系で幹細胞の全自動分離が可能である。分離された幹細胞を直接四肢の虚血部位40～50カ所に筋注・移植する。脂肪組織の採取、幹細胞の分離、細胞移植は全て同一の手術室内で行う。

<効果判定> 治療効果の判定は、治療前、治療1ヵ月後および6ヵ月後に、四肢切断回避、皮膚潰瘍面積、皮膚酸素分圧、足関節/上腕血圧比、末梢動脈造影所見、QOLスコア、6分間およびトレッドミル歩行試験で評価する。以前にサルを用いた検討で骨髄幹細胞移植の血管新生機序として移植細胞から分泌されるサイトカインの作用が大であることを観察している (Yoshioka et al. Stem Cells 23: 355-64, 2005)。そこで、脂肪組織由来幹細胞移植による血管新生作用の機序解明のため、患者血液中のVEGF、HGF、FGF、SDF-1、EPOなどのサイトカイン濃度を細胞治療前後で測定する。また移植用幹細胞の一部を用い、これらサイ

トカインの発現を DNA マイクロアレイによって網羅的に解析するとともに、CD90、CD34、CXCR4 などの細胞表面マーカーの発現についてもフローサイトメトリー法により解析し、治療効果との関連について明らかにする。

(II) 虚血性心疾患に対する血管新生療法の基礎研究

従来の虚血性心疾患に対する骨髄幹細胞移植治療の臨床試験の結果は、動物実験での治療効果と比べると予想外に低く、その要因として移植骨髄幹細胞数が十分でなかった可能性が指摘されている。実際に Meluzin らは心筋梗塞患者において、低用量細胞治療群 (10×10^6) と高用量細胞治療群 (10×10^7) とを比較し、高用量治療群でのみ心収縮力の改善が認められたと報告している (Am Heart J 152:975,2006)。脂肪組織由来幹細胞は大量に採取することができ、虚血心筋に対して高用量での投与も可能である。そこで本研究では、ラットの心筋梗塞モデルを用い、GFP トランスジェニック・ラットの脂肪組織由来幹細胞 ($10 \times 10^6 \sim 10 \times 10^8$) を移植し、移植 4 週間後に血管新生が誘導され心筋虚血および心機能が改善するか、またその効果の移植細胞用量依存性について明らかにする。心筋虚血の評価は病理学的に、心機能の評価は心エコー検査で行う。さらに大量の幹細胞移植時に懸念される不整脈の発生に関しては、以前に報告した蛍光 Ca センサー-GCaMP3 システムを用いて (Shiba et al. Nature 489: 322-5, 2012)、移植幹細胞と心筋組織との電氣的結合について解析する。また、本治療法の作用機序解明のため、脂肪組織由来幹細胞から発現・産生される VEGF、HGF を始めとする各種サイトカイン、増殖因子を DNA マイクロアレイおよびサイトカインアレイを用いて網羅的に解析する。また、脂肪組織由来幹細胞を種々の表面マーカーによりソートして、血管分化能についても解析する

4. 研究成果

(I) 重症虚血肢に対する血管新生療法の臨床試験

信州大学医学部附属病院で重症虚血肢に対する脂肪組織由来幹細胞移植の臨床試験を開始し、これまでに 4 例の脂肪組織由来幹細胞移植を実施した。

【症例 1】 73 歳、男性

[診断] 閉塞性動脈硬化症 (Fontaine III 度)

[既往歴] 陳旧性心筋梗塞 (CABG 後)、高血圧症、糖尿病、脂質異常症、腹部大動脈瘤

[病歴] 2 年前に 50 m 程度の歩行で間歇性跛行を自覚し、近医で ABI 0.71/0.65。血管造影で両側浅大腿動脈閉塞あり、両側大腿動脈-膝窩動脈人工血管バイパス術施行。術後 3 ヶ月で左下肢間歇性跛行が再発し、造影 CT で左バイパス血管の閉塞が確認された。1 年前に左下肢痛が増悪し当科紹介、左浅大腿動脈に対しまず血管内治療が試みられたが、バルーンが通過せず不成功であった。左下肢に脂肪組織由来幹細胞移植施行。

[経過] トレッドミル (12%勾配、2.4 km/h) 負荷における歩行可能距離は移植前の 40 m から、3 ヶ月後には 245 m へ大幅に改善した。細胞移植 12 週間後の運動負荷 ABI で左下肢血流低下が改善した (図 1)。QOL スコアも大幅に改善した。

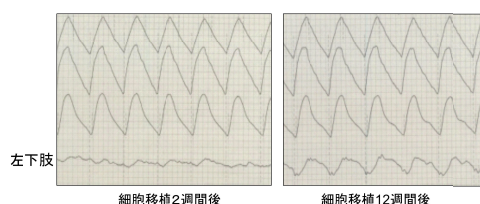


図1

【症例 2】 47 歳、男性

[診断] バージェア病 (Fontaine IV 度)

[病歴] 25 歳時、右第 1 趾の嵌入爪から潰瘍となり、近医でバージェア病と診断されたが、禁煙で軽快。40 歳から喫煙再開。47 歳時に、左下肢の疼痛、潰瘍で症状再発。高圧酸素療

法、硬膜外ブロック、腰部交感神経ブロックなど施行されたが、効果なし。2カ月前に前医で左大腿-足関節部後脛骨動脈バイパス術を施行されたが、バイパスは開存せず。左下肢に脂肪組織由来幹細胞の移植施行。

[経過] 難治性潰瘍があり、強い疼痛が持続していたが、細胞移植12週間後までに潰瘍は治癒し、疼痛も消失した(図2)。下肢切断を免れ、救肢できた。



図2

上述の2症例を含め、経験した4症例サマリーを表1に示す。移植細胞数は約 1×10^7 - 1×10^8 程度で、フローサイトメトリーの結果から、比較的 heterogeneous な細胞集団であることが示唆された。また、CD34 陽性細胞の割合が高いことが特徴的であった。全症例において、有害事象はなく安全に移植手術がなされた。本研究では、無治療(コントロール)との比較がなされていないため、治療効果の証明は不可能であるが、4症例においては、脂肪組織由来幹細胞移植後、自覚症状および何らかの他覚所見の改善がみられた。

	症例1	症例2	症例3	症例4	
診断	ASO	Burger病	ASO	Kimura病 (Burger様血管炎)	
脂肪組織採取部位	腹壁	腹壁/臀部	腹壁	腹壁	
ADRC数	7.3×10^7	9.2×10^7	1.2×10^7	4.3×10^7	
%	CD34	73.8	69.5	67.5	71.0
	CD133	1.3	0.2	6.1	1.3
	CD45	16.6	29.3	ND	25.0
	CD13	58.5	58.5	41.8	ND
	CD44	51.8	51.8	22.1	ND
	CD271	47.4	47.4	14.3	ND
	治療効果	歩行距離延長 運動負荷ABI改善	潰瘍の治癒	歩行距離延長 運動負荷ABI改善	歩行距離延長 運動負荷ABI改善

表1

(II) 虚血性心疾患に対する血管新生療法の基礎研究

本研究では、前下行枝を結紮したラットの

心筋梗塞モデルを作成し、1週間後に前壁梗塞領域に、GFP トランスジェニック・ラットの脂肪組織由来幹細胞 (10×10^6) を移植した。脂肪組織由来幹細胞は培養4継代以内の細胞を使用した。移植4週間後に血管新生が誘導され心機能が改善するかを心エコー検査で解析したところ、左室短縮率 (fractional shortening) は、脂肪組織由来幹細胞移植群で 21.1 ± 0.9 、コントロール群で 14.1 ± 1.2 ($p < 0.05$, $n = 12/\text{group}$) と、移植群で有意に心機能の改善が認められた。また、プログラム電気刺激により心室頻拍を誘発したところ、心室頻拍の発生頻度は脂肪組織由来幹細胞移植群でコントロール群に比し、有意に低頻度であった (31.3% vs 83.3% , $p < 0.05$, $n = 12/\text{group}$) (図3)。

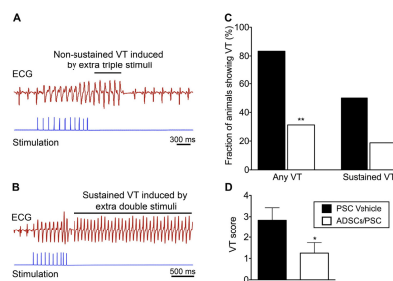


図3

心室頻拍の抑制機序を明らかにするため、以前に報告した蛍光 Ca センサーGCaMP3 システムを用いて (Shiba et al. Nature 489: 322-5, 2012)、移植幹細胞と心筋組織との電気的結合について解析したところ、脂肪組織由来幹細胞移植により梗塞周囲組織において伝導速度と dispersion が低下することが判明した。

移植4週間後に梗塞サイズの縮小効果について病理学的に評価したところ、瘢痕組織の範囲は有意に減少していた(図4)。また、移植部位の心筋組織において VEGF-A および SDF-1 の mRNA の発現亢進を認め、血管新生が促進されていることが推測された。

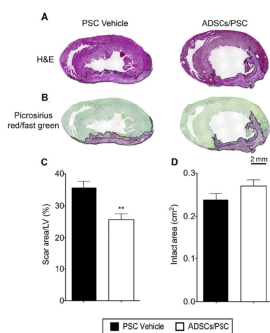


図 4

以上の臨床および基礎研究成果より、血管新生療法において、脂肪組織由来幹細胞は骨髄幹細胞に代わる新たな治療細胞源になりうる事が明らかになった。

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 8 件)

1. 柴 祐司、池田宇一、動脈・静脈疾患の臨床研究動向-脂肪組織由来幹細胞. 日本臨床 (印刷中) 査読なし

2. Shiba Y (1 番目), Gomibuchi T, Seto T, Ikeda U (19 番目)、他 16 名. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. Nature 538;2016:388-391 DOI 10.1038/nature19815 査読あり

3. Nishimura H, Miura T, Ikeda U (17 番目)、他 15 名. Clinical characteristics and outcomes of patients with high ankle-brachial index from the IMPACT-ABI study. PLOS one November 23;2016;1-12 DOI 10.1371/journal.pone.0167150 査読あり

4. Shiba Y. New strategy for the treatment of myocarditis by cell-sheet technology. Circ J 79(1);2015:51-52 DOI 10.1254/circj.CJ-14-1270 査読有り

5. Gautam M, Fujita D, Kimura K, Ichikawa H, Izawa A, Hirose M, Kashihara T, Yamada M, Takahashi M, Ikeda U, Shiba Y. Transplantation of adipose tissue-derived stem cells improves cardiac contractile function and electrical stability in a rat myocardial infarction model. J Mold Cell Cardiol 81;2015:139-149 DOI 10.1016/j.jmcc.2015.02.012 査読有り

6. Abe N, Kashima Y, Izawa A, Motoki H,

Ebisawa S, Miyashita Y, Imamura H, Ikeda U. A two-year follow up of oxidative stress levels in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction: A Subanalysis of the ALPS-AMI study. Angiology 66(3);2015:271-277 DOI 10.1177/0003319714525656 査読あり

[学会発表](計 3 件)

1. 柴 祐司. 脂肪組織由来幹細胞を用いた新たな血管再生治療. 第 56 回日本脈管学会総会. 2015 年 10 月 29~31 日. 東京 虎ノ門ヒルズフォーラム

2. Shiba Y. Preclinical transplantation study for pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in non-human primates: Assessment of electrophysiological and contractile functions. 第 30 回日本不整脈学会 / 第 32 回日本心電図学会学術集会合同学術大会. 2015 年 7 月 28 日~31 日. 京都 国立京都大会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 宇一 (IKEDA, Uichi)
信州大学・医学部・特任教授
研究者番号: 30221063

(2) 研究分担者

宮下 裕介 (MIYASHITA, Yusuke)
信州大学・医学部附属病院・特任教授
研究者番号: 70569590

柴 祐司 (SHIBA, Yuji)
信州大学・医学部附属病院・准教授(特定雇用)
研究者番号: 70613503