

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19967

研究課題名(和文)重症虚血肢克服を目指したアペリン併用血管再生治療 - 老齢細胞を用いた検討 -

研究課題名(英文) Cell based neovascularization combined with apelin for critical limb ischemia - Verification by aged cell -

研究代表者

佐村 誠 (SAMURA, Makoto)

山口大学・医学部附属病院・診療助教(4日/週)

研究者番号：30773402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血単核球に対する低酸素プレコンディショニングでその発現が亢進するアペリン受容体(APJ)は、老齢マウス由来の末梢血単核球ではその作用は見られず、またアペリンによる末梢血単核球からのPDGF-BB、TGF- β の分泌亢進作用も見られなかった。さらに老化した血管平滑筋細胞では、アペリンによるPDGF-BBの増殖亢進作用も見られなかった。これらの結果から、老化した細胞ではアペリンを介した反応が低下していることが示唆された。また低酸素プレコンディショニング末梢血単核球細胞移植とアペリン併用療法におけるPDGFを介した相乗的新生血管成熟化作用は、高齢患者において十分に発揮されない可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Expression of an apelin receptor, APJ, in peripheral blood mononuclear cell (PBMNC) isolated from young mice was increased by hypoxic preconditioning but not from old mice. Apelin did not up regulate expression of PDGF-BB and TGF- β in hypoxic PBMNCs isolated from old mice. Furthermore, proliferation of aged vascular smooth muscle cells treated with apelin was not accelerated in the presence of PDGF-BB unlike normal vascular smooth muscle cells. These results suggested that apelin mediated responses were decreased in aged cells. And it was also suggested that the synergistic neovascular maturation effect via PDGF signaling in combinatorial treatment of hypoxic preconditioned PBMNCs with apelin may not be sufficiently showed in elderly patients.

研究分野：血管外科

キーワード：アペリン 細胞移植治療 老化

1. 研究開始当初の背景

細胞移植を用いた血管再生治療の課題であった細胞生着率の低さと新生血管の未熟性・非機能性を解決するべく、「低酸素プレコンディショニングにより機能を賦活化した末梢血単核球細胞移植」と「血管成熟因子アペリン投与」を組み合わせた新たな血管再生治療法を考案し、その有効性を若齢マウスにおいて検討してきた。

本併用療法において、同時投与したアペリンは、低酸素プレコンディショニングを施した末梢血単核球と血管平滑筋細胞の両方に作用し、末梢血単核球ではアペリン受容体 (APJ) の発現およびそれに伴う PDGF-BB 産生の亢進を誘導、さらに血管平滑筋細胞では PDGFR の発現を亢進させることで、相乗的效果により血管平滑筋の新生血管周囲への遊走を増加させ、新生血管の成熟を促進することを明らかにした。

しかし、重症虚血肢患者の多くは高齢であり、様々な細胞で機能低下が生じることが知られていることから、本併用療法が必ずしも有効であるとは限らない。

2. 研究の目的

老齢マウスにおいて、本併用療法が若齢マウスと同様のメカニズムでその有効性を示すかどうかを検証する。

3. 研究の方法

老齢マウス由来末梢血単核球細胞に対する低酸素プレコンディショニングのアペリン受容体 (APJ) 発現に対する作用ならびにアペリン投与による細胞成長因子など液性因子分泌に及ぼす影響を検証する。また、老化した血管平滑筋細胞に対するアペリンの作用を検証し、PDGF-BB を介した相乗的血管成熟化作用が誘導されるかを検証する。それぞれ、若齢マウス由来末梢血単核球細胞に対する作用と比較して、反応性などの違いを検証する。

4. 研究成果

老齢マウス (30 ヶ月齢) および若齢マウス (3 ヶ月齢) の末梢血から比重遠心法を用いて単核球細胞を採取した。まず、若齢マウスおよび老齢マウス由来末梢血単核球細胞における APJ の発現を Western blot 法で確認し、低酸素プレコンディショニング (2% O₂、5% CO₂、24 時間) 後の発現を観察した。Fig.1 に示すように、老齢マウス由来末梢血単核球細胞の APJ は、若齢マウス由来のものとは異なり、低酸素プレコンディショニングによる発現の亢進は見られなかった。

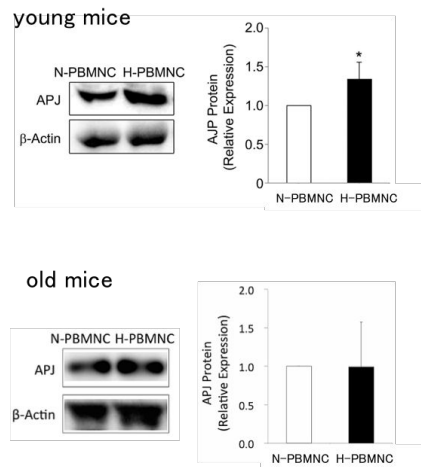


Fig.1 若齢マウス (young mice) と老齢マウス (old mice) 由来末梢血単核球細胞における APJ 発現と低酸素プレコンディショニング効果

また、若齢および老齢マウス由来末梢血単核球細胞に低酸素プレコンディショニングを施し、アペリンを添加した 24 時間後の培養上清中の成長因子を、ELISA で測定した。Fig.2、Fig.3 に示すように、若齢マウス由来末梢血単核球へのアペリン作用により、TGF-β、PDGF-BB の分泌量はそれぞれ有意に増加したが、老齢マウス由来のものでは、TGF-β、PDGF-BB とともに、分泌の亢進作用は見られなかった。

さらに、これら成長因子の分泌量自体も若齢マウスに比べ老齢マウスで低下していた。

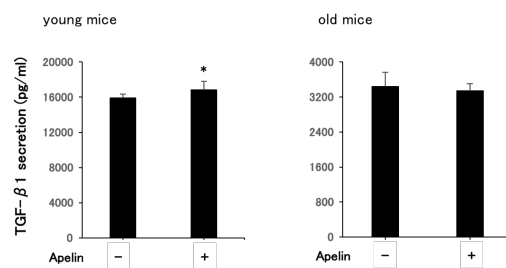


Fig.2 若齢マウス (young mice) と老齢マウス (old mice) 由来末梢血単核球に低酸素プレコンディショニング処理を行い、TGF-β 分泌量を測定

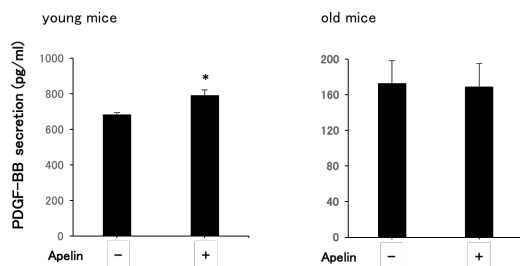


Fig.3 若齢(young mice)と老齢マウス(old mice)由来末梢血単核球に低酸素プレコンディショニング処理を行い、PDGF-BB 分泌量を測定

次にアペリンの血管平滑筋細胞に対する作用における老化の影響を検証した。アペリンは通常の血管平滑筋細胞に作用し、PDGFRの発現を亢進させ、PDGF-BB を介した増殖効果を増強させることを我々は見出していた。そこで、継代数を重ねた老化血管平滑筋細胞にアペリンと PDGF-BB を加え、WST アッセイでその増殖能を検証した。

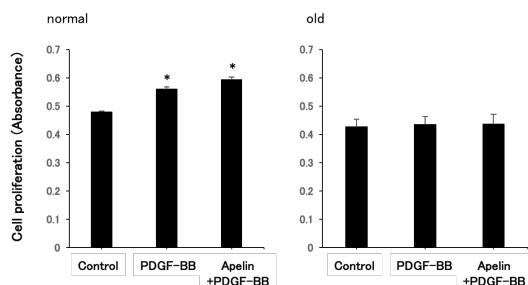


Fig.4 通常血管平滑筋細胞(normal)と老化血管平滑筋細胞(old)に対するアペリンのPDGF-BB の増殖能亢進作用

Fig.4 に示すように、通常血管平滑筋細胞では PDGF-BB を介した増殖能の亢進、さらにアペリンを加えた場合、さらなる上乗せ効果を認めた。しかし、老化血管平滑筋細胞では、PDGF-BB の増殖能亢進作用やアペリンの上乗せ効果が見られなかった。これには、老化により血管平滑筋細胞の phenotype 自体が変化し、アペリンがその作用を及ぼさない可能性が示された。

これらの結果から、我々が考案した新たな「低酸素プレコンディショニングにより機能を賦活化した末梢血単核球細胞移植」と「血管成熟因子アペリン投与」を組み合わせた新たな血管再生治療法の特異点であった「PDGF-BB を介した相乗的治療効果」は、高齢患者において、その治療効果を十分に発揮できない可能性がある。

多くの背景疾患を持つ高齢患者においては種々の細胞で変性が見られ、血管成熟化因子であるアペリンがその効果を発揮できないと考えられる。移植細胞の機能増強とともに、今後は対象臓器における細胞の変性を加味し、最大の効果が得られる条件や方法を検証する必要があると考える。

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. Samura M, Hosoyama T, Takeuchi Y, Ueno K, Morikage N, Hamano K. Therapeutic strategies for cell-based neovascularization in critical limb ischemia. **J Transl Med.**2017;15(1):49. (査読有り)DOI:10.1186/s12967-017-1153-4.
2. Samura M, Morikage N, Suehiro K, Tanaka Y, Nakamura T, Nishimoto A, Ueno K, Hosoyama T, Hamano K. Combinatorial Treatment with Apelin-13 Enhances the Therapeutic Efficacy of a Preconditioned Cell-Based Therapy for Peripheral Ischemia. **Sci Rep.** 2016;6:19379. (査読有り)DOI:https://doi.org/10.1038/srep19379

[学会発表](計 1 件)

1. 佐村 誠、細山 徹、竹内由利子、田中裕也、中村玉美、上野耕司、西本 新、森景則保、美甘章仁、濱野公一

機能賦活化した末梢血単核球細胞を用いた血管再生治療
第 116 回日本外科学会定期学術集会
2016.4.14-16
大阪国際会議場、リーガロイヤルホテル大阪

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 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

佐村 誠 (SAMURA, Makoto)
山口大学・医学部附属病院・診療助教
研究者番号：30773402

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし