

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20370

研究課題名(和文) 宇宙環境下における血管内皮前駆細胞培養の効率化と糖尿病性潰瘍への治療応用

研究課題名(英文) Ex vivo angiogenic cell expansion system increases the number and vasculogenic potential of endothelial progenitor cells by switching the culture gravity condition

研究代表者

萩原 裕子 (Hagiwara, Hiroko)

順天堂大学・医学部・博士研究員

研究者番号：30589429

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)：微小重力環境下培養群では、対照群と比較してEPCマーカーCD34陽性細胞の発現割合が有意に増加した。EPC-Colony forming assayの結果、微小重力環境下培養後に通常環境下培養を行った群でコロニー数の有意な増加を認めた。また、EPC-culture assayの結果から、両重力環境下での培養群において、対照群と比較して有意にEPCの数が増加していた。更に、VEGF-A遺伝子は対照群と比較して両環境下培養群で有意に発現の増加が認められた。本結果から、通常、微小重力環境の培養期間の組み合わせを検討することで、既存法より更に高い血管再生能を有する細胞集団を増幅する可能性が示唆された。

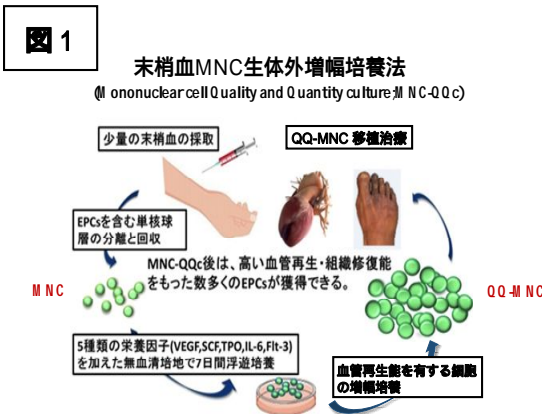
研究成果の概要(英文)：The CD34-positive cell number was significantly higher in the cultured with microgravity groups than in the normal control group. EPC number was significantly increased in the cultured with microgravity and earthgravity group compared to the control groups. dEPC-CFU were significantly increased in the cultured with both gravity group compared to the normal control. Furthermore, VEGF-A expression increased in the cultured with both gravity condition group compared to the normal control. In Conclusion, stimulation of MNC-QQc cells with MG increased the number of EPCs, such as CD34-positive cells, by enhancing their proliferation capacity. Furthermore, earth culture after microgravity stimulation induced vasculogenic differentiation of CD34 cells. This study indicated that MNC-QQc in combination with Micro gravity-Earth gravity conditions might be a more effective angiogenic cell expansion culture method and could be a valuable tool for therapeutic vasculogenesis and tissue regeneration

研究分野：形成外科学

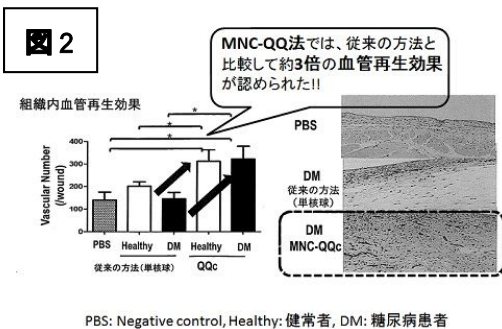
キーワード：血管再生 宇宙医学 血管内皮前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性潰瘍において壊死が進行すると、壊死組織の上流部を切断する治療選択を避けられず、20秒に1人の患者が下肢を切断されている(Lancet 2008)。当研究室ではこれまでに血管再生・組織修復能を有し、糖尿病の虚血症状に関与する血管内皮前駆細胞(EPC)の質と量を増幅できる培養技術 MNC-QQc (Mononuclear Cell Quality and Quantity Culture)の開発に成功した (Tanaka R. et al., Diabetes. 2013) (図1)。



本技法は、従来の骨髄穿刺による EPC の収集と比較して、少量の末梢血から多くの機能的な EPC(MNC-QQ 細胞)を確保できる低侵襲性の治療法であり、既存の細胞移植による欠陥再生治療の問題点を克服することができる高い創傷治癒効果を有する画期的な手法である(図2)。



【EPC移植療法における既存方法とMNC-QQ法の比較】

現 MNC-QQc 法の適応割合は、軽度の糖尿病患者で7-8割、重度の患者では5割弱である。そこで、さらなる技術開発によって培養効率の安定・向上を図る必要性に迫られた。申請者はこれまでに糖尿病性末梢神経障害の病態解明、治療法開発を目指して研究を行ってきた。その中で神経再生過程での血管再生の重要性を強く感じた。また、微小重力空間では神経幹細胞のマウス ES 細胞を微小重力環境で神経細胞へ分化誘導を行うと、極めて効率的にネスチン陽性細胞の細胞塊が得られることを知った(Mitsuhara T et al. Stem Cell Research & Therapy, 2013)。

近年宇宙医学は急速に発展しており、例えば、微小重力環境下では骨芽細胞と破骨細胞のバランスが崩れることで、骨形成が進まず骨吸収のみが進むこと、また、筋肉減少のメカニズムにおいて、ラット腓腹筋における遺伝子発現を解析したところ、宇宙環境では発現が増大する遺伝子と減少する遺伝子に分かれることも報告されている(Le Blank AD et al. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2007)。さらに幹細胞分野においては、微小重力環境下で幹細胞を培養すると未分化な幹細胞が大量に培養できることも報告されている(Nikawa T. et al., FASEB J.,2004)。弓削らはヒト間葉系幹細胞(human mesenchymal stem cells) および正常ヒト骨芽細胞(normal human osteoblasts)を、三次元疑似微小重力再現装置(3D-クリノスタット)を使用し、微小重力環境下で培養した細胞は、細胞表面マーカーだけでなく、mRNA レベルでも未分化状態を維持していることを明らかにした(Yuge L. et al., Stem Cells Dev.,2006)。これらの関連報告を踏まえると、微小重力環境は様々な幹細胞にとって未分化性を保ちやすく、増殖培養に適した環境であると想定され、より安全で安定的な幹細胞培養方法になる可能性が示唆された。

以上のことから申請者は、微小重力環境下での EPC の培養が、EPC の未分化性の維持や増殖を促進することを予想し、MNC-QQc 法の培養効率と機能がさらに向上することで、治療抵抗群の減少が期待できると考えた。また、微小重力環境下での変化が予想される糖尿病関連遺伝子、血管再生遺伝子、炎症/抗炎症関連遺伝子やシグナル伝達系を明らかにすることで、糖尿病性潰瘍に対する新たな遺伝子治療法の開発や創薬研究、病態解明への展開が期待されると考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、微小重力環境下における血管内皮前駆細胞(EPC)の新規生体外増幅培養法を確立し、5割が治療抵抗性を示す糖尿病性潰瘍の症例にも対応できる効果的治療法の開発を目的とする。

当研究室では生体外で EPC の質・量共に増幅できる培養技術 MNC-QQc (Mononuclear Cell Quality and Quantity Culture)の開発に成功し、従来の移植法と比較して低侵襲かつ血管再生能を有する移植治療法を実現した。しかし、重症度の高い患者では適応割合が5割弱という課題が残り、培養効率の安定・向上を図るための新たな技術開発の必要性に迫られた。

本研究では、「微小重力環境下で幹細胞の未分化性が向上する現象」を利用し、重症度の高い患者の治療の道を切り開く。その作用機序も解明し、他の幹細胞・組織再生医療研究の更なる発展を目指す。

具体的には、以下の4点を検証することを目

的としている。

(1)微小重力空間での EPC 培養の最適化

通常、MNC-QQc 法での EPC 培養は特殊なコーティングを施した培養用プレートを用いているが、微小重力環境下では同様の手法では培養が困難である。そのため、微小重力下での MNC-QQ 法に最適な培養容器、コーティング剤、培養液量や培養期間等を検討して、最適な EPC 生体外増幅培養法を確立する。

(2)微小重力環境下での培養によって変化が予想される EPC の機能解析

宇宙環境下において、幹細胞は未分化性の維持が向上すること明らかになっている。微小重力環境下で培養した EPC にも同様の変化が予想されるため、地上環境下と微小重力環境下における EPC の機能解析を、細胞の増幅率や血管再生能を反映する colony formation assay などを用いて行う。

(3)微小重力環境下で起こる EPC における遺伝子発現変化の解析

先述の報告からも、微小重力環境下では様々な細胞によって遺伝子発現が変化することが知られている。このため、地上環境よりも宇宙環境においてより高効率の増幅が期待される EPC も同様に遺伝子発現変化が予想される。特に血管再生に関連する遺伝子に関してどのような発現変化が起こるか PCR 法などを用いて解析する。

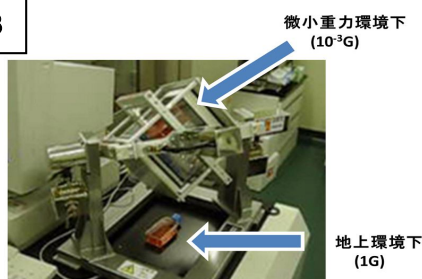
(4)微小重力環境下 MNC-QQc 法処置 EPC 移植による糖尿病モデルマウス潰瘍の治療効果の確認

糖尿病モデルマウスに潰瘍を作成し、既法と比較して微小重力環境下で培養した EPC の方がより高い血管再生能、創傷治療効果を有するかを、治癒面積の計測、PCR 法、免疫組織化学法を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

微小重力環境での培養について、宇宙航空研究開発機構(JAXA)から貸与されている疑似微小重力再現装置(3D-クリノスタット:図3)を用いて行う。この装置は JAXA が開発した、地上でスペースシャトル内と同じ $10^{-3}G$ の微小重力環境を再現できる装置である(Wakayama.S. *et al.*, PLoS One, 2009)。以下の実験においては、全て本装置を用いるものとする。

図3



重力分散型模擬微小重力装置(3D-クリノスタット)

(1)微小重力環境下での MNC-QQc 法の最適な培養条件の確立

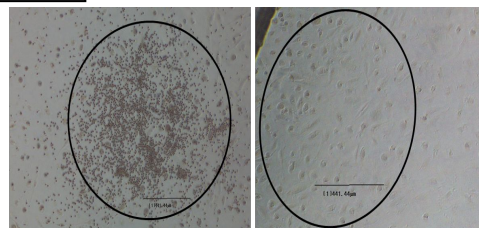
研究協力者らが、健常人、糖尿病患者それぞれからヒト末梢血を採取した後、申請者が末梢血から遠心分離で EPCs を含む MNCs を回収する。MNCs は血管再生に関わる増殖因子やサイトカイン(VEGEF, IL-6, TPO, Flt-3, SCF)を豊富に含む無血清培地で一週間浮遊培養し(MNC-QQ 法)機能的な EPCs を増幅させる。先述したとおり、通常の地上環境下と比較すると培養環境が大きく異なる。微小重力環境下において本培養法を実施するには、フラスコやプラスチックバッグなどといった培養容器の形状やサイズ、Fibronectin や Poly-L-Lysine などのコーティング剤の種類、培養液の必要量や培養期間などの条件の検討が必要になる。

従来の方法と微小重力環境下での本法施行時の違いを、細胞の増幅率や発現している蛋白量を FACS 法を用いて比較する。

(2)微小重力環境がもたらす EPCs 機能の変化の解析

微小重力環境下での MNC-QQc 法の確立後、地上重力環境下(1G)と微小重力環境下で培養した MNC-QQ 細胞の機能を比較する。具体的には細胞の増幅率や、血管再生能を反映する Colony formation assay (形成したコロニー数をカウントする)(図4)、血管内皮細胞への分化能を反映する EPC-culture assay (免疫染色)や ELISA 法などを用いて解析する。以上の実験を行い、微小重力環境下での培養が MNC-QQ 法の血管再生能を向上させているかを明らかにする。

図4



MNCをゲル状で培養すると上記のような異なった2種類の細胞群がコロニーを形成する。MNC-QQc法施行後は、特にDefinitive cellsコロニーが多く出現し、これが血管再生、組織修復に深く関係していると考えられている。

【血管再生能を解析するためのEPC-colony-Formation Assay】

(3)微小重力環境下で起こる MNCs の遺伝子発現変化の解析

申請者らはすでに、MNC-QQc 法による高い血管再生能は、炎症性 M1 細胞を抑制し、抗炎症性の M2 細胞を有意に増幅ためであることを明らかにしている。この結果を踏まえ、微小重力環境下における MNC-QQc 法で機能が向上することが予想される EPC において、炎症制御関連因子(TNF- など)、血管新生関連

因子(Ang-1 など)、糖尿病関連因子(PGC-1 など)などの遺伝子発現の変化が予想される。そこでこれら関連遺伝子の変化を、PCR 法を用いて解析しどのような遺伝子発現変化が血管再生能、創傷治療効果につながるかを明らかにする。

(4) 創傷治癒モデルにおける微小重力下 MNC-QQ 細胞移植効果の解析

ストレプトゾシン誘発型糖尿病モデル免疫不全マウスの背部に潰瘍を作成し、微小重力環境下、地上重力環境下(コントロール)において培養した MNC-QQ 細胞をそれぞれ移植する。細胞移植 1 週間後に潰瘍部分の組織を回収する。その後、H.E. 染色や免疫染色法を用いて、潰瘍縮小率、治癒期間、組織修復の程度(血管再生や膠原繊維の割合)を比較する。

4. 研究成果

微小重力環境下で MNC-QQc 法を行った微小重力環境下培養群、微小重力環境下で培養後に通常重力環境下で培養した群では、対照群と比較して EPC マーカーの一つである CD34 陽性細胞の発現割合が有意に増加していた。また、炎症性マクロファージのマーカーである CCR2 陽性細胞は MNC と比較して有意に減少しており、対照群と比較すると MG, ME 群では更に発現が低い傾向にあった。EPC の血管再生能を表す EPC-Colony forming assay (EPC-CFA)の結果から、3 日間の微小重力環境下培養の後、通常環境下で 4 日間培養した ME 群においては、対照群と比較して血管内皮細胞への分化能が高い EPC コロニー(Definitive EPC (dEPC)-CFU)の発現量が有意に増加していた。EPC の数を示す EPC-culture assay の結果からは、微小重力環境下培養後に地球重力環境下培養を行った ME 群において、対照群と比較して有意に EPC の数が多かった。更に、微小重力環境下で MNC-QQc 法を行うことで、血管新生関連因子の VEGF-B 遺伝子と VEGF 受容体である KDR 遺伝子の発現が対照群と比較して有意に増加することが明らかになった。また、VEGF-A 遺伝子は対照群、EG 群と比較して ME 群で有意に発現の増加が認められた。以上の結果とこれまでの結果から、MNC-QQc 法の培養重力環境の変化が培養効率と血管再生能をさらに向上させることが明らかになった。

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 5 件)*全て査読有り

1. Tanaka R, Masuda H, Fujimura S, Ito Hirano R, Arita K, Kakinuma Y, Hagiwara H, Kado M, Hayashi A, Mita T, Ogawa T, Watada H, Mizuno H, Sawada N, Asahara T (2018). Quality Quantity

Control Culture Enhances Vasculogenesis and Wound Healing Efficacy of Human Diabetic Peripheral Blood CD34+ Cells. Stem cells translational medicine, 7(5), 428-438.

2. Hagiwara H, Higashibata A, Ogawa S, Kanazawa S, Mizuno H, & Tanaka R. (2017). Quality and Quantity Control Cell Culture with Microgravity increases CD34-positive fraction and angiogenic potential of endothelial progenitor cells. Plastic and Reconstructive Surgery Global Open, 5(4 Suppl)
3. Nishikai-Yan Shen T, Kanazawa S, Kado M, Okada K, Luo L, Hayashi A, Mizuno H, Tanaka R. (2017) Interleukin-6 stimulates Akt and p38 MAPK phosphorylation and fibroblast migration in nondiabetic but not diabetic mice. PLoS One. May 23;12(5):e0178232.
4. 重症下肢虚血に対する血管再生療法の現状, 萩原裕子, 田中里佳, (2016) 日本下肢救済・足病学会誌 8(3):123-129.
5. Evolution of autologous endothelial progenitor cell therapy for tissue regeneration and vasculogenesis, Hagiwara H, Tanaka R, (2016) Pers Med Univers. 5:8-15.

[学会発表](計 7 件)

1. ○萩原裕子, 田中里佳, 東端 晃, 小川志保, 金澤成行, 水野博司 “微小重力環境下が血管内皮前駆細胞に及ぼす影響と効果の検証” 第 17 回日本再生医療学会総会 横浜 口頭発表 2018
2. 門 真起子, 田中里佳, 有田佳代, 金澤成行, 萩原裕子, 水野博司 “末梢血単核球無血清生体外培養細胞の In vitro における創傷治癒促進効果” 第 47 回創傷治癒学会 京都 口頭発表 2017
3. 田中里佳, 梅山悠伊, 萩原裕子, 平野理恵, 藤村聡, 小川 令, 水野博司 “ケロイド患者末梢血における血管内皮前駆細胞の機能評価” 第 26 回日本形成外科学会基礎学術集会 大阪 口頭発表 2017
4. Hagiwara H, Higashibata A, Ogawa S, Kanazawa S, Mizuno H, Tanaka R “Quality and Quantity Control Cell Culture with Microgravity to enhance vasculogenesis of peripheral blood endothelial progenitor cells” Tissue

Engineering Regenerative medicine
international society Davos
(Switzerland) ポスター発表 2017

5. Hagiwara H, Higashibata A, Ogawa S,
Kanazawa S, Mizuno H, Tanaka R
“Quality and Quantity Control Cell
Culture with Microgravity increases
CD34-positive fraction and angiogenic
potential of endothelial progenitor
cells” The 62nd Plastic surgery
Research council North Durham (US) □
頭発表 2017 (proceedings あり)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

萩原 裕子 (HAGIWARA, Hiroko)

順天堂大学・医学部・博士研究員

研究者番号 : 30589429

(2)研究協力者

小川 志保 (OGAWA, Shiho)

宇宙航空研究開発機構・有人宇宙技術部
門・きぼう利用センター・きぼう利用企画
グループ・グループ長

田中 里佳 (TANAKA, Rica)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号 : 70509827

金澤 成行 (KANAZAWA, Shigeyuki)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号 : 50506243