

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：32620
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2023
課題番号：18K09493
研究課題名（和文）血管内皮前駆細胞による重症下肢虚血治療で副次的に生じる疼痛軽減効果の作用機序解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism of pain-relief by transplanting endothelial progenitor cells to treat critical limb ischemia

研究代表者
萩原 裕子（Hagiwara, Hiroko）

順天堂大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：30589429
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により、これまで科学的エビデンスが構築されていなかった重症下肢虚血治療における血管内皮前駆細胞移植による疼痛軽減作用の機序の一端が解明された。また、既存の動物モデルでは再現できなかった重症下肢虚血のモデルを確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
世界的な糖尿病罹患率の増加に伴い、重症下肢虚血患者数も増加しており、動物モデルの確立及び、患者QOLを著しく低下させる間性疼痛の軽減メカニズムの解明は、学術的にも社会的にも意義があるものである。

研究成果の概要（英文）：Our study elucidated a part of mechanism of pain-relief by transplanting endothelial progenitor cells to critical limb ischemia patients.

研究分野：再生医療

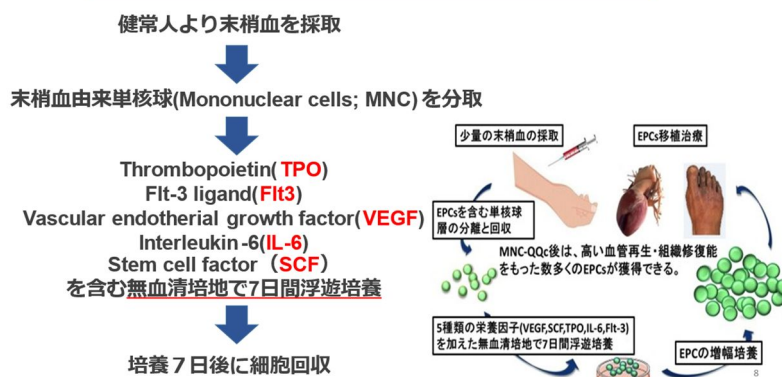
キーワード：再生医療

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

我々は、根治療法が存在しない重症下肢虚血に対し、革新的な血管再生能を有する細胞移植方法を開発した。当該細胞を移植する臨床研究において、患者のQOL低下を誘発する疼痛に関して、細胞移植直後が軽減されるという報告が多くあったが、メカニズムが不明であった。

実験方法 (MNC-QQ培養)



神経再生と細胞移植療法

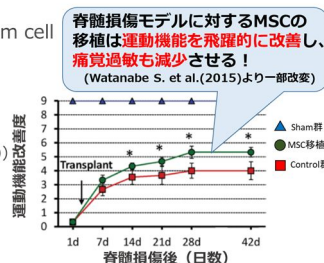
末梢神経傷害と異なり、**脊髄損傷など中枢神経傷害時の神経再生は困難**であることが知られているが、近年、Mesenchymal stem cell, CD34⁺細胞などの未分化な細胞やマクロファージの移植により、運動機能の改善、神経再生亢進が報告されている。

■ 脊髄損傷モデルマウスへのマクロファージの移植は神経細胞の軸索伸長に影響する。
(Gensel J.C. et al., Brain Research, (2015))

■ 脊髄損傷モデルマウスに対するMesenchymal stem cellの移植は、運動機能および痛覚過敏を改善する。
(Watanabe S. et al., Stem Cells, (2015))

■ 脳梗塞モデルマウスに対するCD34⁺細胞移植は、運動機能を改善する。
(Taguchi A. et al., The Journal of Clinical Investigation (2004))

CD34陽性細胞、マクロファージを多く含む細胞群を移植すれば、より顕著な運動機能の改善効果が見られる可能性を示唆



2. 研究の目的

本研究では、これまで確立されていない重症下肢虚血患者の病態に沿っ

末梢血単核球生体外増幅培養法 (Mononuclear cell Quality and Quantity culture: MNC-QQc法)

- CD34⁺をマーカーの一つとする血管内皮前駆細胞(EPC)といった、**血管再生能、創傷治癒効果を有する細胞集団を増幅させる培養法** (Masuda et al. (2013))。
- 少量の末梢血より単核球(MNC)を分取し、**5種類のサイトカインや成長因子**を含む無血清培地で7日行う浮遊培養法。
- MNC-QQc法により得られたMNC-QQ細胞は、末梢血由来MNCと比較して**約10倍のCD34⁺、約5倍の抗炎症性Mφ**を多く含む。
- MNC-QQ細胞は、中枢神経の**神経再生阻害因子の分解酵素を分泌**する。



MNC-QQ細胞は神経再生亢進効果を有し、慢性期治療に応用できる可能性が期待される。

た動物モデルの確立および、細胞移植後の疼痛軽減メカニズムの解明を目的としている。

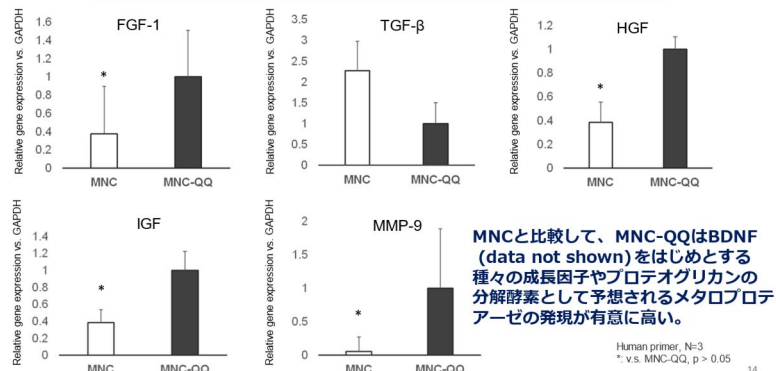
3. 研究の方法

マウス右後肢の動静脈結紮、切除および脂肪切除など9通り行い、下肢虚血モデル作成を行う。経過観察、痛覚テスト、トレッドミルテストを実施し、どのモデルが重症下肢虚血患者と近い動態になるか観察した。また、対照群、細胞移植群共に脊髄を採取し、ウエスタンブロット法、ELISA法を用いて痛み関連因子、炎症性マーカーなどの発現を確認した。

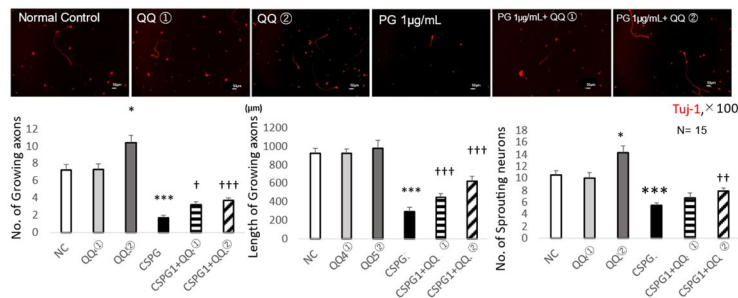
4. 研究成果

本研究により、これまで確立されていなかった重症下肢虚血動物モデルの作出が可能となった。また、重症下肢虚血患者の治療に対する細胞移植時に副次的に起こる疼痛軽減作用については、メカニズムが不明であったが、炎症マーカーの変化などから、細胞移植によって疼痛反応が変更するということが明らかとなった。

結果 (Real time-PCR)



Immunocytochemistry (Co-cultured samples)

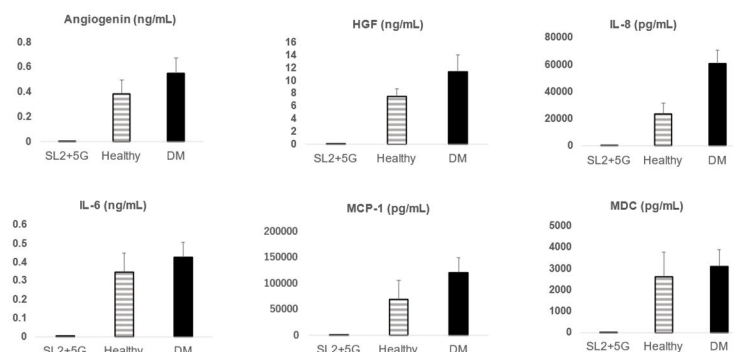


DRG-MNCQQ cells co-cultured sample improved the inhibition effect of CSPG.

NC: Normal Control
 QQ①, ②: MNC-QQ cells co-culture
 ①: 1x10⁻⁴ MNCQQ cells
 ②: 1x10⁻⁵ MNCQQ cells
 PG1: CSPG(1μg/mL)
 *PG: the axon growth inhibitor

*, v.s. NC p<0.05 †, v.s. CSPG1 p<0.05
 ***, v.s. NC p<0.005 ††, v.s. CSPG1 p<0.01
 †††: v.s. CSPG1 p<0.005

Secreted proteins in MNCQQ cell supernatant



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Rica Tanaka, Rie Ito-Hirano, Satoshi Fujimura, Kayo Arita, Hiroko Hagiwara, Tomoya Mita, Masayoshi Itoh, Hideya Kawaji, Takasuke Ogawa, Hirotaka Watada, Haruchika Masuda, Takayuki Asahara, Hiroshi Mizuno	4. 巻 10
2. 論文標題 Ex vivo conditioning of peripheral blood mononuclear cells of diabetic patients promotes vasculogenic wound healing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem cells translational medicine	6. 最初と最後の頁 895,909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 ITsubameNishikai-Yan Shen, Makiko Kado, Hiroko Hagiwara, Satoshi Fujimura, Hiroshi Mizuno, Rica Tanaka	4. 巻 18
2. 論文標題 MMP9 secreted from mononuclear cell quality and quantity culture mediates STAT3 phosphorylation and fibroblast migration in wounds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 464,471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Rica, Ito Hirano Rie, Fujimura Satoshi, Arita Kayo, Hagiwara Hiroko, Mita Tomoya, Itoh Masayoshi, Kawaji Hideya, Ogawa Takasuke, Watada Hirotaka, Masuda Haruchika, Asahara Takayuki, Mizuno Hiroshi	4. 巻 10.1002
2. 論文標題 Ex vivo conditioning of peripheral blood mononuclear cells of diabetic patients promotes vasculogenic wound healing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STEM CELLS Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 sctm.20-0309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/sctm.20-0309	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Geeroms M, Hamdi M, Hirano R, Hagiwara H, Fujimura S, Mizuno H and Tanaka R	4. 巻 143
2. 論文標題 Quality and quantity cultured murine endothelial progenitor cells increase vascularization and decrease fibrosis in the fat graft	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plast Reconstr Surg	6. 最初と最後の頁 744e-755e
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PRS.00000000000005439.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hagiwara H, Tanaka R, Sakurada T, Mizuno H
2. 発表標題 A potential new cell therapy using peripheral blood mononuclear cells via quality and quantity controlled culture for chronic ischemic pain
3. 学会等名 Novel Pain Therapeutics: From Basic Research to Clinical Translation and Rehabilitation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 萩原裕子、田中里佳、水野博司
2. 発表標題 生体外増幅末梢血単核球が神経再生過程に及ぼす効果の検証
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 萩原裕子、田中里佳、水野博司
2. 発表標題 生体外増幅末梢血単核球が神経傷害時における神経伸長に及ぼす効果の検証
3. 学会等名 第34回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西貝燕、萩原裕子、藤村 聡、水野博司、田中里佳
2. 発表標題 生体外増幅末梢血単核球（MNC-QQ細胞）の線維芽細胞遊走促進効果及びそのメカニズム
3. 学会等名 第49回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋原裕子
2. 発表標題 生体外増幅末梢血単核球が神経再生過程に及ぼす効果の検証
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 里佳 (Tanaka Rica) (70509827)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	
研究分担者	櫻田 司 (Sakurada Tsukasa) (80124907)	第一薬科大学・薬学部・名誉教授 (37107)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------