

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16379

研究課題名(和文)毛細血管幹細胞を用いた小口径代用血管(バイオグラフト)の開発にむけた基礎的研究

研究課題名(英文)Basic research for development of biograft with Capillary Stem Cell (CapSCs)

研究代表者

吉田 有里(Yoshida, Yuri)

旭川医科大学・大学病院・助教

研究者番号：50646057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：重症下肢虚血における末梢動脈バイパス手術では、自家血管をグラフトとして用いるが、グラフト不全などの問題も多い。より良質なグラフトの開発のため、毛細血管周囲幹細胞(Capillary Stem Cell: CapSC)を用いたバイオグラフトの構築・末梢動脈疾患に対する血管再生治療の検討を行った。CapSCsをEphA7陽性周細胞として分離し、マウス下肢虚血モデルに導入した。その結果、虚血改善を認め、CapSCsによる毛細血管様構造が確認され、血管新生に寄与していた。CapSCsは血管再生治療における有用なツールとして期待でき、その血管新生能は今後のバイオグラフトの構築に有用であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昨今の高齢化社会における、生活習慣病や動脈硬化性疾患に対するアプローチについては、医療界全体で取り組まねばならない事案である。それらの疾患に起因する虚血性疾患の課題の1つである、虚血肢のバイパス手術におけるグラフトの改善や、虚血肢改善のための細胞治療に繋がる基礎研究が本研究である。本研究によって、毛細血管周囲幹細胞(CapSCs)は、血管再生治療における有用なツールであることが確認され、この細胞自体の血管新生能や虚血改善能が確認できた。これによって、虚血組織の血流改善や、CapSCsを用いた小口径グラフトの開発にも有用なツールと期待できる。

研究成果の概要(英文)：Open surgical bypass using vein graft remains an important option for patients with critical limb ischemia(CLI). Failing graft is one of the problems after surgical bypass in the patients with CLI. To develop much better quality bypass graft, we considered to construct biograft using multipotent pericytes; Capillary Stem Cell (CapSC) and determined revascularization potential of CapSC for the patients with peripheral artery disease(PAD). We identified the novel marker EphA7 to detect CapSCs, and established to isolate CapSCs from microvessels of adipose tissues. Transplantation of CapSCs into ischemic tissues significantly improved blood flow recovery in hind limb ischemia mouse model. CapSCs also differentiated into endothelial cells and pericytes to form capillary-like structures by themselves. These data demonstrate that CapSCs have high angiogenesis and regenerative potency for PAD.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 細胞治療 毛細血管 血管外科 血管周細胞 動脈硬化 虚血性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本の高齢化社会において、高血圧・糖尿病などの生活習慣病と関連する動脈硬化性疾患の有病率は高く、重篤化が懸念されている。これらの疾患の重症例では、外科的治療として血管バイパス術が必須である。末梢動脈へのバイパス術には、小口径人工血管は実用化に至っておらず、患者自身の自家血管を用いて行われる。しかし血管採取という患者負担、質不良、移植後狭窄などの問題が残り、また採取できる血管には限りがあり、様々な適応制限が生じている現状がある。このため、小口径バイオグラフトの開発、血管組織構築に利用できる再生医学の応用が期待されている。

2. 研究の目的

高齢化社会を背景に、増加している小口径血管グラフトの需要に対し、拒絶反応や再狭窄のリスクが少ない理想的な血管グラフトの開発を最終的な目標とし、そのために、血管グラフト構築（血管新生）に適した細胞を用いる必要がある。これについては、これまでの先行研究での知見をもとに、血管前駆細胞でもある毛細血管幹細胞（CapSC）を利用した。

目的1 毛細血管幹細胞（CapSC）を用いた血管グラフトを作製する

- (1) 除蛋白処理した血管組織マトリックスを調整する。
- (2) 組織から分離した CapSC を上記マトリックスに生着させる。
- (3) 培地循環システムで培養して、血管グラフトを作製する。

目的2 血管マトリックスの生体移植の効果を明らかにする

- (1) 血管グラフトおよびグラフト周囲の CapSC 細胞シートを実験動物に移植する。
- (2) 移植後のグラフト血管の組織変化や機能を評価する。
- (3) 血管マトリックスの生体移植の効果を明らかにする

3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、以下の方法で CapSC の精製、血管新生・細胞を用いた再生治療の応用の可能性についての研究を行った。

(1) EphA7 陽性周細胞の分離、分離方法・培養方法の最適化

マウスの皮下脂肪・筋肉からストローマ細胞を調整し、その中で、NG2 陽性細胞を周細胞と定義して Magnetic cell sorting (MACS) で分離した。さらに周細胞の中から CapSC を、Fluorescence-activated cell sorting (FACS) で単離した。ここで、EphA7 陽性の周細胞を、毛細血管由来幹細胞；Capillary Stem Cell; CapSC と命名し、EphA7 陰性の周細胞を Control PC (Ct PC) として以降の検討を行った。

(2) マウスの下肢虚血モデルの作製

16~24 週齢の C57BL/6N マウス（雄）の左後肢の全大腿動脈を切除し、高度虚血でありながら壊疽脱落には至らない、下肢虚血病態モデルを作成した。

(3) 下肢虚血モデルマウスにおける、CapSC の移植効果の評価

GFP 陽性 CapSC、Ct PC、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、脂肪由来間質細胞 (ASC) をマウス下肢虚血モデルに導入し、その後、4、7、14、21、28 日目にレーザードプラによる血流測定を行い、最終日に組織を摘出し組織学的評価を行った。細胞数は 5×10^5 cells/ μ l とした。

4. 研究成果

(1) CapSCs の調整

CapSC の組織学的評価における局在評価を観察できるよう、GFP 陽性トランスジェニックマウスを用いた。

上記方法を用いて、GFP 陽性トランスジェニックマウスの皮下脂肪・筋肉組織から CapSCs を調製した。

(2) 下肢虚血モデルマウスにおける、CapSCs による灌流改善効果の評価

Figure1 は、レーザードプラでの実際の撮影写真である（血流が豊富だと赤くなり、虚血だと青みが強く写る）。

上から PBS 導入群、CtPC 導入群、ASC 導入群、CapSCs 導入群となっており、左から導入日を day0 とし、day4、7、14、21、28 となっている。

Day4 では、どの群においても、著明な血流低下が認められているが、その後の経過で、day28

になると、PBS 群では虚血肢の青みが強く、虚血状態の遷延が確認できるが、CapSC 群では赤みが強くなり、血流が豊富になっていることが確認できた。
 上記について数値化して、健側を 100%としたときの虚血の程度についてグラフ化したものが Figure2 である。
 やはり day4 まではいずれの群も同様に虚血となっているものの、day28 では、CapSC 導入群で有意に虚血改善効果が認められており、PBS 群では健側の 50%程度であるが、CapSC 導入群では、健側の 70%弱まで改善していることが明らかとなった。

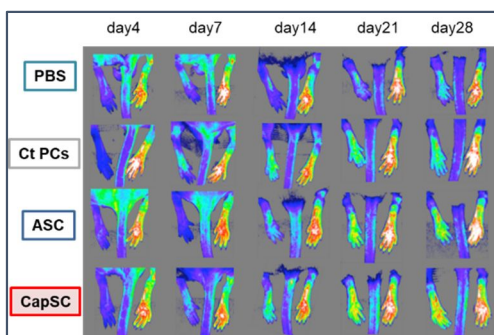


Figure 1 レーザードブラ血流計によるマウス下肢虚血モデルの血流評価

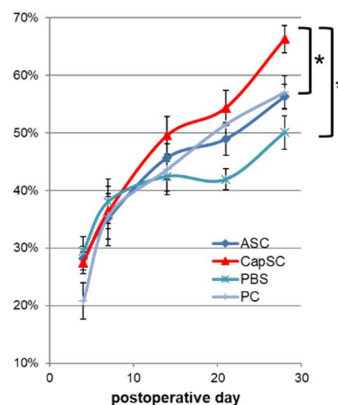


Figure 2 マウス下肢虚血モデルの健側に対する虚血改善評価

(3) CapSCs による虚血組織の血管新生能の評価

上記の GFP 陽性 CapSCs を導入した下肢虚血モデルマウスの組織学的評価を行った。観察最終日に、レクチンによって血管内皮を赤く染色したのちに、組織を摘出し、パラホルムアルデヒドで固定し、CUBIC 法を用いて透明化し、共焦点顕微鏡で、血管・導入細胞の観察を行った。

弱拡大では、微小血管構造が多数認められた (Figure3)

強拡大では、赤い微小血管構造のまわりに、GFP 陽性 CapSC 由来の周細胞が存在することが明らかとなった (Figure 4)

また一部は、赤色とマージして黄色くなっていることから、血管内皮細胞にも分化していることが明らかとなった (Figure 4)

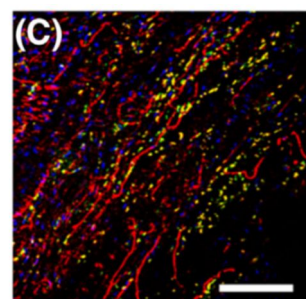


Figure 3 弱拡大 血管内皮: 赤, 導入 CapSC 緑

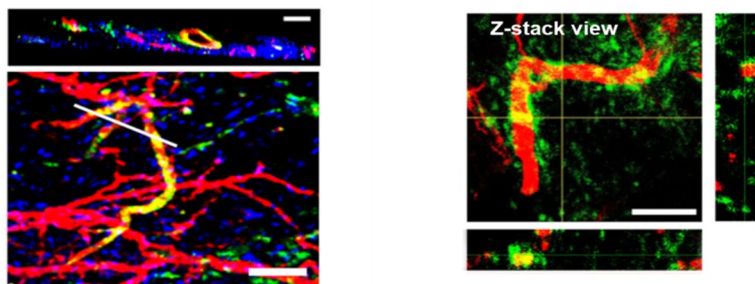


Figure 4 強拡大 血管内皮: 赤, 導入 CapSC 緑

したがって動物モデルにおいて、CapSC は血管新生を認め、血管内皮細胞にも周細胞にも分化することが確認された。

これらの結果によって、CapSCs は血管新生能を有しており、CapSCs を導入した虚血組織では、対照群と比べて優れた虚血改善を認め、また、血管内皮細胞にも周細胞にも分化し、毛細血管構造を構築することが明らかになった。

従って、CapSCs は細胞治療における臨床応用を目指した有望なツールと考えられ、血管外科領域における下肢虚血への応用が期待できると考えられる。今回の研究期間では、バイオグラフトの完成までには至らなかったものの、その基礎段階としては十分に有用な結果であり、今後は CapSCs を利用して小口径バイオグラフトの作製についての検討をさらにすすめていく。さらに今後はヒトにおける実験を重ねるための、採取方法・分離方法の最適化、その細胞の効果について検討していく。

これらの内容については、STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE にて発表した (Capillary-resident EphA7+ pericytes are multipotent cells with anti-ischemic effects through capillary formation doi: 10.1002/sctm.19-0148)。学術総会では第 60 回日本脈管学会総会において Japanese College of Angiology Award 最優秀賞を受賞した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshida Yuri, Kabara Maki, Kano Kohei, Horiuchi Kiwamu, Hayasaka Taiki, Tomita Yui, Takehara Naofumi, Minoshima Akiho, Aonuma Tatsuya, Maruyama Keisuke, Nakagawa Naoki, Azuma Nobuyoshi, Hasebe Naoyuki, Kawabe Jun ichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Capillary resident EphA7 + pericytes are multipotent cells with anti ischemic effects through capillary formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 STEM CELLS Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 120 ~ 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/sctm.19-0148	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 -

1. 著者名 Uchida Daiki, Saito Yukihiro, Kikuchi Shinsuke, Yoshida Yuri, Hirata Satoshi, Sasajima Tadahiro, Azuma Nobuyoshi	4. 巻 71
2. 論文標題 Development of gene therapy with a cyclic adenosine monophosphate response element decoy oligodeoxynucleotide to prevent vascular intimal hyperplasia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Vascular Surgery	6. 最初と最後の頁 229 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jvs.2019.02.042	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 -

1. 著者名 Tomita Yui, Horiuchi Kiwamu, Kano Kohei, Tatsukawa Takamitsu, Matsuo Risa, Hayasaka Taiki, Yoshida Yuri, Kabara Maki, Yasuda Satoshi, Nakajima Keiichi, Nakagawa Naoki, Takehara Naofumi, Okizaki Atsutaka, Hasebe Naoyuki, Kawabe Jun-ichi	4. 巻 519
2. 論文標題 Ninjurin 1 mediates peripheral nerve regeneration through Schwann cell maturation of NG2-positive cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 462 ~ 468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.007	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 -

1. 著者名 Kano Kohei, Horiuchi Kiwamu, Yoshida Yuri, Hayasaka Taiki, Kabara Maki, Tomita Yui, Tatsukawa Takamitsu, Matsuo Risa, Sawada Jun, Nakagawa Naoki, Takehara Naofumi, Hasebe Naoyuki, Kawabe Jun-ichi	4. 巻 47
2. 論文標題 EphA7+ perivascular cells as myogenic and angiogenic precursors improving skeletal muscle regeneration in a muscular dystrophic mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101914 ~ 101914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.101914	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 -

1. 著者名 Horiuchi Kiwamu, Kano Kohei, Minoshima Akiho, Hayasaka Taiki, Yamauchi Atsushi, Tatsukawa Takamitsu, Matsuo Risa, Yoshida Yuri, Tomita Yui, Kabara Maki, Nakagawa Naoki, Takehara Naofumi, Hasebe Naoyuki, Kawabe Jun-Ichi	4. 巻 320
2. 論文標題 Pericyte-specific deletion of ninjurin-1 induces fragile vasa vasorum formation and enhances intimal hyperplasia of injured vasculature	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology	6. 最初と最後の頁 H2438 ~ H2447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpheart.00931.2020	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉田有里
2. 発表標題 多分化能を有する毛細血管幹細胞(Capillary Stem Cells, CapSCs)の同定とその組織再生能・虚血改善効果の検討
3. 学会等名 第47回日本血管外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田有里
2. 発表標題 EphA7陽性周細胞 = 毛細血管幹細胞(Capillary Stem Cells)の同定とその下肢虚血改善効果の検討
3. 学会等名 第60回日本脈管学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田有里
2. 発表標題 EphA7陽性周細胞 = 毛細血管幹細胞(Capillary Stem Cells, CapSCs)の同定とその組織再生能の検討
3. 学会等名 日本血管生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田有里
2. 発表標題 EphA7陽性周細胞 = 毛細血管幹細胞(Capillary Stem Cells, CapSCs)の同定とその下肢虚血改善効果の検討
3. 学会等名 代用臓器再生医学研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

第60回日本脈管学会総会 「EphA7陽性周細胞 = 毛細血管幹細胞(Capillary Stem Cells)の同定とその下肢虚血改善効果の検討」 Japanese College of Angiology Award 最優秀賞 受賞
--

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

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
---------	---------