

機関番号：15501
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390345
 研究課題名(和文) 低酸素プレコンディショニングによる骨髄細胞の血管再生能の増強と臨床への展開
 研究課題名(英文) Enhanced Angiogenic Potential of Bone Marrow Cells by Hypoxic Preconditioning
 研究代表者
 古谷 彰 (FURUTANI AKIRA)
 山口大学・医学部附属病院・学術研究員
 研究者番号：90346552

研究成果の概要(和文)：低酸素プレコンディショニングが骨髄細胞の細胞機能を増強させ、細胞移植治療の効果を向上させる簡便かつ有用な方法であることを報告してきた。しかし、細胞機能の増強や治療効果の向上に関するメカニズムは完全に解明されていない。また、健常動物由来の細胞を用いた検討にとどまっていた。本研究では、低酸素プレコンディショニングによって虚血組織へ移植後の細胞生着が上昇することで治療効果が向上することを明らかにした。さらに、加齢や糖尿病下の骨髄細胞に対する低酸素プレコンディショニングの有効性を証明した。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have demonstrated that hypoxic preconditioning of bone marrow cells can enhance their potency for inducing therapeutic angiogenesis. However, the exact mechanism of hypoxic preconditioning is not fully understood. Furthermore, experiments have used cells from young healthy individuals. This study shows that hypoxic preconditioning increases the retention of bone marrow cells after implantation into ischemic tissue, and that it also enhances the angiogenic potential of the cells with aged or diabetes-related functional impairment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2009年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：骨髄細胞、血管再生、低酸素、プレコンディショニング、再生医療、虚血性疾患、加齢、糖尿病

1. 研究開始当初の背景

当教室で開発された自己骨髄細胞移植による血管再生治療 (*Jpn Circ J.* 2001; 65: 845, *Cell Transplant.* 2002; 11: 747) は、虚血性疾患に対する有望な治療法として期待されている。既に、本治療法は日本をはじめ世界中の多くの施設で臨床応用されており、患者の虚血組織での血流の増加や臨床症状の改善

などの有効性が報告されている。また、明らかな副作用も認められていない。しかしながら、一部の患者では本治療法の効果が十分に得られないことが課題として浮き上がってきた (*N Engl J Med.* 2006; 355: 1199)。その原因として、患者の骨髄細胞での数の減少や機能の低下 (*Circulation.* 2004; 109: 1615) や移植後の虚血組織環境下での低い生着率

(*Cell Transplant.* 2004; 13: 639) が考えられている。一方で、治療効果の向上を目的として、移植に用いる細胞の機能増強を図る方法が模索されている。細胞への遺伝子導入や *ex vivo* での増幅などの方法が報告されているが、操作の複雑さ、要する時間の長さ、安全面での危惧といった問題もあり、臨床応用には至ってはいない。

当教室では、短時間かつ簡便な骨髄細胞の機能増強の方法として低酸素プレコンディショニングについて検討している。これまでの基礎研究では、低酸素プレコンディショニングによって骨髄細胞の血管内皮増殖因子 (VEGF) 産生の増大や内皮分化能の促進といった効果が認められた。また、虚血組織に移植した際には、血流改善効果が向上することも示された (*Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283: H468)。その後、低酸素プレコンディショニングの有用性に言及した報告が他施設からもなされている (*Lab Invest.* 2003; 83: 65, *Circ Res.* 2006; 98: 1414)。しかしながら、低酸素プレコンディショニングによって得られる細胞機能の増強ならびに血管再生治療効果の向上に関するメカニズムが完全に明らかになったというわけではなく、さらなる検証が必要である。

一方で、現時点において低酸素プレコンディショニングの効果は健常動物や健常者由来の細胞を用いた検討にとどまっている。血管再生治療を必要とする患者の大多数は高齢者で糖尿病などの様々な全身疾患を併発しており、骨髄細胞においても血管再生機能が低下することが知られている。そのような機能低下を示す骨髄細胞に対して低酸素プレコンディショニングを行った際に、正常な骨髄細胞と同様な効果を示すかは不明である。細胞機能の低下が改善されることが期待されるが、細胞傷害を引き起こし、アポトーシスの誘導や機能低下の悪化を招く可能性も完全には否定できない。なぜなら、低酸素応答は細胞種で異なる上、加齢や糖尿病下の骨髄細胞についての報告はないからである。従って、臨床応用を考える上では加齢や糖尿病下の骨髄細胞を用いて、低酸素プレコンディショニングの有効性と安全性を検証することが不可欠と考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の点を明らかにすることである。

- (1) 健常動物の細胞を用いて、低酸素プレコンディショニングによる細胞機能の増強ならびに血管再生治療効果の向上に関するメカニズムを解明する。
- (2) 加齢や糖尿病動物の細胞を用いて、低酸素プレコンディショニングを行った後の細胞機能へ与える影響と血管

再生への効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) 低酸素プレコンディショニングによる細胞機能の増強メカニズムの解明

①骨髄由来細胞の単離と低酸素プレコンディショニング

健常動物 C57BL/6 マウスから骨髄由来単核球細胞を単離した。単離後の骨髄由来細胞は、低酸素 (2%O₂: 低酸素プレコンディショニング) または正常酸素 (20%O₂: 対照群) 条件下で培養 (33°C、24 時間) を行い、PBS 洗浄後に以下の実験に用いた。

②遺伝子発現解析

虚血組織へ移植後の細胞生着に重要と考えられる分子について、低酸素プレコンディショニングによって発現が変化しているかを調べた。細胞から total RNA を抽出して、Extracellular Matrix & Adhesion Molecular に焦点を当てた Microarray にて遺伝子発現解析を行った。顕著な発現変化が認められた分子 (integrin \cdot M, CXCR4) については、mRNA (RT-PCR 法) およびタンパク質 (フローサイトメトリー解析) レベルの確認を行った。

③細胞接着と血管再生治療効果の評価

移植前の低酸素プレコンディショニングによって、虚血組織へ移植後の生着率が上昇するか否か、ならびに、血管再生治療の効果が向上するか否かを調べた。マウスの総大腿動脈とその分枝を結紮して下肢虚血モデルを作製際、骨髄由来細胞あるいは PBS をそれぞれ虚血組織筋肉内 4 箇所直接注射した。また、低酸素プレコンディショニングにより発現変化が認められた integrin \cdot M, CXCR4 の役割を検証するために、中和抗体で処理した細胞の移植も行った。移植 3 日後に、虚血組織筋肉の凍結切片を作製後、あらかじめ CFSE 蛍光標識した移植細胞の数を定量することで、細胞生着について組織学的評価を行った。さらに、移植 14 日後に、レーザー Doppler 法にて虚血下肢の血流量の変化を測定することで、血管再生治療効果を評価した。

(2) 加齢や糖尿病動物由来の細胞に対する低酸素プレコンディショニング効果の検証

①実験動物および骨髄細胞の単離・低酸素プレコンディショニング

実験動物として、加齢 20-22 ヶ月齢マウス (対照群: 3 ヶ月齢マウス) と Streptozotocin 誘発性 1 型糖尿病マウス (対照群: vehicle 投与マウス) を用いた。各群のマウスから、骨髄細胞を単離後、上記の (1) -①と同様

に低酸素（2%O₂：低酸素プレコンディショニング）または正常酸素（20%O₂：Normoxia 群）条件下で培養を行い、以下の実験に用いた。

②in vitroでの細胞機能の評価

健常マウスの骨髄細胞を用いた検討で低酸素プレコンディショニングによって増強効果が認められた細胞機能について、加齢や糖尿病マウスの骨髄細胞での効果を調べた。培養1日後に接着細胞数を定量評価した。また、培養3日後に細胞生存率を定量評価した。

③in vivoでの血管再生治療効果の評価

加齢動物の骨髄細胞に対する低酸素プレコンディショニングによって、血管再生治療の効果が向上するか否かを調べた。上記の（1）-④と同様に下肢虚血モデルを作製した後、骨髄細胞を虚血下肢筋肉内に移植した。移植14日後に、レーザードップラー法にて虚血下肢の血流量の変化を測定することで、血管再生治療効果の評価した。

4. 研究成果

（1）低酸素プレコンディショニングによる細胞機能の増強メカニズムの解明

①遺伝子発現解析

骨髄由来細胞に対する低酸素プレコンディショニングによって、接着分子の integrin・M や虚血組織内での細胞集積に重要な役割を果たす CXCR4 の mRNA 発現量が上昇することが分かった（ $P < 0.05$ ）。また、フローサイトメトリー解析においても、integrin・M と CXCR4 陽性細胞率が有意に上昇することが確認された（ $P < 0.01$ ）。

②細胞接着と血管再生治療効果の評価

対照群と比較して、低酸素プレコンディショニング後の細胞を虚血組織へ移植した際の CFSE 陽性細胞の数は有意に多かったこと（ $P < 0.01$ ）から、細胞生着率が上昇したと考えられる。また、低酸素プレコンディショニング後の細胞を移植した虚血下肢では、血流量も有意に増大しており（ $P < 0.01$ ）、治療効果の向上が認められた。一方で、integrin・M や CXCR4 中和抗体で処理した細胞では、移植後の細胞生着の上昇と血流量の改善効果が認められなかった。以上の結果から、移植細胞に対する低酸素プレコンディショニングによって、細胞生着率の上昇することで血管再生治療の効果が向上すると考えられる。また、そうした効果には発現上昇が認められた integrin・M や CXCR4 が関与することも明らかとなった。

（2）加齢や糖尿病動物由来の細胞に対する低酸素プレコンディショニング効果の検証

①in vitroでの細胞機能の評価

各対照群と比較して、加齢や糖尿病マウスの骨髄細胞の接着率および生存率は有意に低下していた（ $P < 0.05$ ）が、低酸素プレコンディショニングによって有意な改善効果が認められた（ $P < 0.05$ ）。以上の結果から、加齢や糖尿病の骨髄細胞に対する低酸素プレコンディショニングによって細胞機能を増強できることが示唆された。

②in vivoでの血管再生治療効果の評価

対照マウスと比較して、加齢マウス由来の Normoxia 群を移植したマウスでは、虚血下肢での血流量は有意に低下していた（ $P < 0.05$ ）。一方で、加齢マウス由来の低酸素プレコンディショニング群を移植した場合には、加齢マウス由来の Normoxia 群と比較して有意に血流量の増加が認められ（ $P < 0.01$ ）、対照マウスの Normoxia 群を移植した場合と同程度まで血流量が回復した。以上の結果から、低酸素プレコンディショニングは、加齢動物の骨髄細胞においても細胞移植による血管再生治療の効果を向上させる方法として有用であることが示唆された。

（3）総括

本研究結果として、低酸素プレコンディショニングによる細胞機能増強の新たなメカニズムが明らかとなった。また、健常動物の場合だけではなく、加齢や糖尿病動物の骨髄細胞に対して低酸素プレコンディショニングを行った際にも細胞機能を増強できると共に、細胞移植による血管再生治療の効果を向上できることが示された。

低酸素プレコンディショニングは短時間かつ簡便な骨髄細胞の機能増強の方法であり、将来の臨床応用を考えると非常に優れているといえる。従って、本研究において低酸素プレコンディショニングの有用性が立証されたことは、血管再生治療の基礎研究のみならず、トランスレーショナルリサーチとしての意義も非常に高いと考えられる。また、骨髄細胞は心血管再生治療だけでなく他臓器の再生修復治療にも用いられており、低酸素プレコンディショニングによる骨髄細胞の機能増強法の確立は他分野にも波及効果をもたらすことが期待できる。

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5件）

- ①Li TS, Kubo M, Ueda K, Murakami M, Mikamo A, Hamano K.
Impaired angiogenic potency of bone marrow cells from patients with advanced

age, anemia, and renal failure.
J Thorac Cardiovasc Surg. 2010; 139(2):
459-65.

(査読有)

- ② Kubo M, Li TS, Kamota T, Ohshima M, Qin SL, Hamano K.

Increased expression of CXCR4 and integrin α M in hypoxia-preconditioned cells contributes to improved cell retention and angiogenic potency.

J Cell Physiol. 2009; 220(2): 508-514.

(査読有)

- ③ Ohshima M, Li TS, Kubo M, Qin SL, Hamano K.

Antioxidant therapy attenuates diabetes-related impairment of bone marrow stem cells.

Circ J. 2009; 73(1): 162-166.

(査読有)

- ④ Qin SL, Li TS, Kubo M, Ohshima M, Furutani A, Hamano K.

Transient increase of cytokines in the acute ischemic tissue is beneficial to cell-based therapeutic angiogenesis.

Circ J. 2008;72(12):2075-80.

(査読有)

- ⑤ Kubo M, Li TS, Suzuki R, Shirasawa B, Morikage N, Ohshima M, Qin SL, Hamano K.

Hypoxic preconditioning increases survival and angiogenic potency of peripheral blood mononuclear cells via oxidative stress resistance.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008; 294(2): H590-5.

(査読有)

[学会発表] (計5件)

- ① 久保正幸, 李 桃生, 大島真子, 桂 春作, 古谷 彰, 濱野公一.

加齢動物の骨髄細胞に対する低酸素プレコンディショニングの有用性: 細胞移植治療の効果向上を目指して

第9回日本再生医療学会総会

2010. 3. 18 広島, 広島国際会議場

- ② 久保正幸, 李 桃生, 大島真子, 桂 春作, 古谷 彰, 濱野公一.

Hypoxic pretreatment improves age-related functional impairment of bone marrow cells for inducing therapeutic angiogenesis

第32回日本分子生物学会年会

2009. 12. 9 横浜, パシフィコ横浜

- ③ 大島真子, 李 桃生, 久保正幸, 古谷 彰, 濱野公一.

加齢や糖尿病マウスの骨髄細胞に対する低酸素プレコンディショニングの効果

第8回日本再生医療学会総会

2009. 3. 6 東京, 東京国際フォーラム

- ④ 久保正幸, 李 桃生, 鴨田隆弘, 大島真子, 秦 淑蘭, 濱野公一.

移植細胞の生着率向上に基づく血管新生治療法の開発: 低酸素プレコンディショニングの有用性

第8回日本再生医療学会総会

2009. 3. 5 東京, 東京国際フォーラム

- ⑤ Kubo M, Li TS, Kamota T, Ohshima M, Qin SL, Hamano K.

Hypoxic preconditioning of mononuclear cells enhances angiogenesis by increasing their retention after implantation into ischemic tissue

American Heart Association 2008 Scientific Sessions

2008. 11. 11 New Orleans, Ernest N. Morial Convention Center, USA

[図書] (計1件)

- ① 久保正幸, 李桃生, 濱野公一

虚血性心疾患に対する心血管再生治療の現状と未来

「びまん性冠動脈病変の臨床－基本的病態理解から治療の選択・実際」

メジカルビュー社 2010年刊行 133-140

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古谷 彰 (FURUTANI AKIRA)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 90346552

(2) 研究分担者

濱野 公一 (HAMANO KIMIKAZU)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 60263787

久保 正幸 (KUBO MASAYUKI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 60420519

李 桃生 (LI TAO-SHENG)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 50379997

(3) 連携研究者

なし