

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～20010

課題番号：20590876

研究課題名（和文）虚血性疾患治療に効果的な血管内皮前駆細胞の機能解析

研究課題名（英文）Analysis of functional EPC for the treatment of ischemic disease

研究代表者

大根田 修 (OHNEDA OSAMU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：30311872

研究成果の概要（和文）：生体内で機能的に働くアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の低い血管内皮前駆細胞 (ALDH-Low EPC) は、低酸素応答性を有していることから、低酸素応答転写因子 (HIF) の役割について解析を行った。HIF-2 $\alpha$  が ALDH-Low EPC の創傷治癒に作用していることが、有茎皮弁マウスモデルの解析で明となった。また、HIF の標的遺伝子である VEGF および CXCR4 が創傷治癒に重要な役割を果たしていることが証明された。

研究成果の概要（英文）：We have reported previously that ALDH-Low EPC possess hypoxic response. In this study, we examined how hypoxia-inducible factor (HIF) is involved in the repair of ischemic tissue in a mouse flap model. HIF-2 $\alpha$  but not HIF-1 $\alpha$  was highly associated with the reduced tissue damage in ischemia. Finally, we found that HIF-target genes, VEGF and CXCR4, have an important role for the neovascularization in ischemic tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：再生医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：再生医学，循環器・高血圧，移植・再生医療，細胞・組織

## 1. 研究開始当初の背景

血管内皮前駆細胞 (EPC) は、生体内では虚血・炎症の際に、主に骨髄から末梢血中に移動し、新生血管の構築に寄与すると考えられている。骨髄以外の組織では、脂肪組織や臍帯血に EPC が存在していることが報告されている。最近 Yoder らのグループによって、ヒト成体由来血管内皮細胞株にお

いても EPC 様の増殖能を持つ細胞の存在が明らかにされた (Blood 2005; 106: 1524-1531)。このことは、既存の血管を構成している血管内皮細胞において、EPC 様の性質を有する細胞が存在し、虚血・炎症の際に生じる新生血管の一部を構成する内皮細胞として作用する可能性を強く示唆するものである。

骨髄から EPC の末梢血中への動員は、G-SCF (granulocyte colony-stimulating actor) あるいは AMD3100 (CXCR4 antagonist) によって誘導されることが報告されている。末梢血中の EPC の単離は、主に CD45 陰性/CD34 陽性細胞を指標に行われているが、EPC を用いた治療を行う際に、期待した治療成果が得られないことが報告されている。このことは、細胞治療に用いる EPC の単離方法の検討が必要であることを示唆するものである。さらに Yoder らのグループは、臍帯血由来 EPC を単離してシングル・コロニー法を用いて解析することにより、増殖性の高い細胞から増殖性の低い細胞まで様々な性質をもった EPC が存在することを報告している (Blood 2004; 104: 2752-2760)。すなわち、**増殖能に着目することにより、EPC の階層性 (未分化な EPC ; 増殖能が高い一分化した EPC ; 増殖能が低い) がある**ことを示唆している。そこで得られた知見によると、増殖能が高い臍帯血由来 EPC での CD34 の発現は、10-30% であり、継代により CD34 の発現が消失する。以上のことから、CD34 の発現においてのみ EPC を単離して細胞治療に用いる方法では限界があり、高い治療成果を求めるには新規細胞治療法の研究開発が必須である。

## 2. 研究の目的

本申請では、ヒト臍帯血由来 EPC を単離し、増殖能の解析および細胞表面マーカー・遺伝子発現解析等を中心とした分化能の解析を通じ、EPC の性質を明らかにし、新たな EPC の単離同定とその生体内機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (平成 20 年度)

(1) ALDE-low EPC が、ALDE-high EPC と比較して、虚血部位における治癒効果が高いこと

から、両者間における低酸素応答性について解析を行う。

(2) そこで、本申請では低酸素応答転写因子 (Hypoxia inducible factor: HIF) の中で、特に HIF-1alpha と HIF-2alpha に着目し、どちらの転写因子が EPC の虚血部位における治癒に関与しているのかについて、siRNA を用いて明らかにする。

(3) 具体的には、ALDE-low EPC に HIF-1alpha あるいは HIF-2alpha に対する siRNA を遺伝子導入し、mRNA レベルにおいて発現低下がみられる siRNA について、Real-time PCR 法を用いてそれら HIF 転写因子の標的遺伝子発現を解析する。

### (平成 21 年度)

(4) それぞれの HIF に対する siRNA を用いて、HIF-1alpha あるいは HIF-2alpha の蛋白質発現低下が見られた ALDE-low EPC について、以下の実験を行う。

- ① 低酸素条件下における標的遺伝子の発現解析を行う (H20 年度より継続)
- ② マウス有茎皮弁移植モデルを用いた虚血部位における創傷治癒効果の解析を行う。

### (平成 22 年度)

(5) 虚血発症を誘導したヌードマウスに対して、生体外において HIF に対する siRNA を遺伝子導入した ALDE-low EPC を移植し、移植した EPC が血管新生にどのように関わっているのかを定量的に評価する。

- ① マウス有茎皮弁移植モデルにおいて、壊死領域の面積を測定し比較検討する。
- ② 移植した EPC がどのように血管新生に寄与するのかについて定量的検討を行う。
- ③ 移植した EPC 数と新生血管数の相関について検討する (免疫組織染色)。

④ 新生血管に移植した EPC が取りこまれるかについて、GFP 標識した EPC を用いて行う。全ての血管は lectin-TRIC を用いて同定する。

6) EPC において、低酸素に反応してケモカインレセプター CXCR4 の発現が増加することが分かっている。投与方法により、ALDE-low EPC と ALDE-high EPC の間で血管新生に差が見られるかについて検討する。

#### 4. 研究成果

(1) ALDE-low EPC に対して、HIF-1 $\alpha$  siRNA と HIF-2 $\alpha$  siRNA をそれぞれ導入した細胞を作成し、標的遺伝子の発現について解析をおこなった。VEGF (血管内皮増殖因子) の発現は、両者において低下していることが分かった。ケモカインである SDF-1 のレセプター CXCR4 の発現は、HIF-2 $\alpha$  siRNA を導入した EPC においてのみ、その発現低下を認めた。以上の結果により、EPC における CXCR4 の発現は、VEGF とは異なり、HIF-2 $\alpha$  特異的に制御されていることが示唆された。

(2) それぞれの siRNA 導入 EPC を用いて、マウス有茎皮弁移植モデルにより、創傷治癒効果について解析を行った。HIF-2 $\alpha$  siRNA EPC では細胞を移植しない群と同程度に創傷治癒効果を認めない。一方、HIF-1 $\alpha$  siRNA EPC を投与した群では、細胞を移植しない群と比較して 2 倍程度の創傷治癒効果を認めた。以上のことから、マウス有茎皮弁移植モデルでは、HIF-2 $\alpha$  により発現制御される標的遺伝子が、大きく関わっていることが明らかとなった。

(3) HIF-2 $\alpha$  siRNA EPC では、VEGF と CXCR4 の発現が、コントロール群と比較して有意に低下していた。どちらの標的因子がマウス有茎皮弁移植モデルにおいて、Key となる因子かについて解析を行った。ALDE-low EPC に対

して、VEGF siRNA と CXCR4 siRNA をそれぞれ導入した細胞を作成し、マウス有茎皮弁移植モデルにより、創傷治癒効果について比較検討した。VEGF siRNA あるいは CXCR4 siRNA を導入した細胞群は、ともに創傷治癒が正常 EPC 投与群と比較して、有意に低下していることが分かった。

(4) VEGF siRNA あるいは CXCR4 siRNA を導入した細胞群に対して、マウス有茎皮弁移植モデルにより、遊走能について解析を行った。CXCR4 siRNA EPC では、VEGF siRNA EPC と比較して、創傷部位における細胞の出現数が大きく減少していることが明らかとなった。

(5) 以上の結果より、創傷部位に働く EPC は、異なる 2 つの作用 (VEGF と CXCR4 が関係する) を介して、創傷治癒に作用していることが明らかとなった。

#### 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 6 件)

1) Tu T, Kimura K, Nagano M, Yamashita T, Ohneda K, Sugimori H, Sato F, Sakakibara Y, Hamada H, Yoshikawa H, Son H, and Ohneda O. Identification of human placenta-derived mesenchymal stem cells involved in re-endothelialization. *J Cell Physiol.* 2010; .**226**: 224-235. 査読有

2) Nagano M, Kimura K, Yamashita T, Ohneda K, Nozawa D, Hamada H, Yoshikawa H, Ochiai N, and Ohneda O. Hypoxia responsive mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood are effective for bone repair. *Stem cells and Dev.* 2010; **19**: 1195-1210. 査読有

3) Takano S, Yamashita T, and Ohneda O.

Molecular therapeutic targets for glioma angiogenesis. *J Oncol.* 2010; 2010:351908. 査読無

4) Yamashita T, Ohneda O, Sakiyama A, Iwata F, Ohneda K, and Fujii-Kuriyama Y. The microenvironment for erythropoiesis is regulated by HIF-2alpha through VCAM-1 in endothelial cells.

*Blood* 2008; **112**: 1482-1492. 査読有

5) Yamashita T, Ohneda K, Nagano M, Miyoshi C, Kaneko N, Miwa Y, Yamamoto M, Ohneda O, and Fujii-Kuriyama Y. HIF-2alpha in endothelial cells regulates tumor neovascularization through activation of ephrin A1. *J Biol Chem* 2008; **283**: 18926-18936. 査読有

6) Yamashita T, Ohneda O, Nagano M, Iemitsu M, Makino Y, Tanaka H, Miyauchi H, Goto K, Ohneda K, Fujii-Kuriyama Y, Lorenz Poellinger, and Yamamoto M. Abnormal heart development and lung remodeling in mice lacking a HIF-related bHLH-PAS protein NEPAS.

*Mol. Cell. Biol.* 2008; **28**: 1285-1297. 査読有

[学会発表] (計 26 件)

1) 山下年晴, 小林里美, 坪井一輝, 長野真澄, 大根田修. 腫瘍血管内皮細胞における HIF 機能の解析.

第 33 回日本分子生物学会 (神戸) 2010 年 12 月 7 日～10 日

2) 長野真澄, 木村健一, 山下年晴, 大根田修. CXCR4 is crucial for ischemic tissue repair through HIF-2 $\alpha$  in endothelial

progenitor cells.

20th World Congress of the International Society for Heart Research (Kyoto)2010 年 5 月 13 日～16 日

3) 木村健一, 長野真澄, 山下年晴, 大根田修. CD349 is an useful marker to isolate placenta-derived mesenchymal stem cells in accordance with functional property.

20th World Congress of the International Society for Heart Research (Kyoto) 2010 年 5 月 13 日～16 日

4) 木村健一, 長野真澄, 山下年晴, 秋本恵子, 野澤大輔, 杉森治彦, 落合直之, 榊原譲, 大根田修. 脂肪組織由来間葉系幹細胞と骨髄由来間葉系幹細胞の in vivo 機能解析.

第 9 回 日本再生医療学会 (広島) 2010 年 3 月 18 日～19 日

5) 長野真澄, 山下年晴, 濱田洋美, 大根田絹子, 木村健一, 吉川裕之, 大根田修. ヒト血管内皮細胞の虚血改善能における HIF-2 $\alpha$  と CXCR4 の機能解析.

第 9 回 日本再生医療学会 (広島) 2010 年 3 月 18 日～19 日

6) 山下年晴, 長野真澄, 坪井一輝, 大根田修. がん転移形成における HIF-2alpha の機能解析. 第 32 回分子生物学学会 (横浜) 2009 年 12 月 9 日～12 日

7) 木村健一, Tran Cam Tu, 長野真澄, 趙陽, 大根田修. ヒト胎盤由来間葉系幹細胞の単離およびその機能解析. 第 32 回分子生物学学会 (横浜) 2009 年 12 月 9 日～12 日

8) 秋本恵子, 木村健一, 長野真澄, 高野晋吾, 山下年晴, 大根田修.

Mesenchymal stem cells is useful for cell therapy of glioblastoma multiforme.

第 32 回分子生物学学会 (横浜) 2009 年 12 月 9 日~12 日

9) 小林里美, 山下年晴, 植田崇史, 中井秀人, 長野真澄, 大根田修.

Hypoxia inducible factor-3 $\alpha$  の機能解析.

第 32 回分子生物学学会 (横浜) 2009 年 12 月 9 日~12 日

10) 山下年晴, 長野真澄, 坪井一輝, 大根田修.

がん転移巣形成における HIF-2 $\alpha$  の機能解析. 第七回がんとハイポキシア研究会 (京都) 2009 年 12 月 5 日~6 日

11) 小林里美, 山下年晴, 植田崇史, 中井秀人, 長野真澄, 大根田修.

Hypoxia inducible factor-3 $\alpha$  の機能解析.

第七回がんとハイポキシア研究会 (京都) 2009 年 12 月 5 日~6 日

12) 高野晋吾, 山下年晴, 長野真澄, 大須賀寛, 益子良太, 大根田修.

SDF-1 と CXCR7 はグリオーマの血管新生の重要な標的分子である. 第 68 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2009 年 10 月 1 日~3 日

13) 木村健一, 長野真澄, 山下年晴, 野澤大輔, 濱田洋実, 落合直之, 吉川裕之, 大根田修. 治療効果の高い間葉系幹細胞の単離およびその機能解析.

日本生化学会 関東支部例会 (つくば)

2009 年 6 月 20 日

14) 秋本恵子, 木村健一, 長野真澄, 高野晋吾, 山下年晴, 大根田修.

ヒト間葉系幹細胞を用いたグリオグラストーマの細胞治療と機能解析.

日本生化学会 関東支部例会 (つくば)

2009 年 6 月 20 日

15) 秋本恵子, 木村健一, 長野真澄, 高野晋吾, 山下年晴, 大根田修.

ヒト間葉系幹細胞を用いたグリオグラストーマの細胞治療に向けた研究開発.

第 8 回 日本再生医療学会総会 (東京) 2009 年 3 月 5 日~6 日.

16) 木村健一, 長野真澄, 山下年晴, 野澤大輔, 濱田洋実, 落合直之, 吉川裕之, 大根田修.

治療効果の高い間葉系幹細胞の単離およびその機能解析. 第 8 回 日本再生医療学会総会 (東京) 2009 年 3 月 5 日~6 日.

17) Haruhiko Sugimori, Masumi Nagano, Toshiharu Yamashita, Sato F, Matsushita S, Ohneda O and Sakakibara Y. Differential Potential of Endothelial Progenitor Cells to Promote Arteriogenesis and Angiogenesis.

Cardiovascular Research Technologies (Washington, D. C) 2009 年 3 月 4 日~6 日

18) Masumi Nagano, Osamu Ohneda.

CXCR4 Plays a Crucial Role for Repairing Ischemic Tissue through Regulation by HIF-2 $\cdot$ . 第 73 回 日本循環器学会総会 (大阪) 2009 年 3 月 20 日~22 日

19) Masumi Nagano, Ken-ichi Kimura, Toshiharu Yamashita, Hiromi Hamada, Kinuko

Ohneda, Hiroyuki Yoshikawa, and Osamu Ohneda.

A Chemokine Receptor CXCR4 Plays a Crucial Role for Repairing Ischemic Tissue through Regulation of HIF-2a.

50<sup>th</sup> ASH Annual Meeting (San Francisco)  
2008年12月6日～9日

20) 秋本恵子, 木村健一, 長野真澄, 高野晋吾, 山下年晴, 大根田修.

グリオグラストーマにおける HIF-2 $\cdot$  の役割.  
第6回 がんとハイポキシア研究会 (広島)  
2008年11月29日～30日

21) 植田崇史, 山下年晴, 中井秀人, 長野真澄, 大根田修.

生体内における HIF-3 $\cdot$  /IPAS 発現部位の同定. 第6回 がんとハイポキシア研究会 (広島) 2008年11月29日～30日

22) 山下年晴, 植田崇史, 長野真澄, 大根田修.

HIF-3 $\cdot$  による負の転写制御機構解明.  
第6回 がんとハイポキシア研究会 (広島)  
2008年11月29日～30日

23) 高野晋吾, 益子良太, 長野真澄, 秋本恵子, 大根田修, 大須賀覚, 松村明.

膠芽腫由来血管内皮細胞の特性から考える血管新生抑制療法.  
第67回 日本癌学会学術総会 (名古屋) 2008年10月28日～30日

24) 山下年晴, 大根田絹子, 大根田修.

赤血球分化における低酸素応答転写因子 HIF-2 $\cdot$  の機能解析.  
第70回 日本血液学会総会 (京都) 2008年10月10日～12日

25) 長野真澄, 山下年晴, 濱田洋実, 大根田絹子, 木村健一, 中川智貴, 吉川裕之, 大根田修. 虚血改善効果の高いヒト血管内皮前駆細胞における低酸素応答転写因子の機能解析. 第70回 日本血液学会総会 (京都) 2008年10月10日～12日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大根田 修 (OHNEDA OSAMU)  
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授  
研究者番号: 30311872

### (2) 研究分担者

山下 年晴 (YAMASHITA TOSHIHARU)  
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教  
研究者番号: 50400677

### (3) 連携研究者

長野 真澄 (NAGANO MASUMI)  
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教  
研究者番号: 30436282