

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790927

研究課題名 (和文)

骨髄由来血管内皮前駆細胞より分泌される血管平滑筋細胞の増殖・遊走性促進因子の解析
 研究課題名 (英文) Vascular smooth muscle cells proliferation and migration induced
 by secreted factor from bone marrow-derived endothelial progenitor cells.

研究代表者

早川 朋子 (HAYAKAWA TOMOKO)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：30420821

研究成果の概要 (和文)：

血管内皮前駆細胞より分泌され、血管平滑筋細胞の増殖と遊走性を促進する未知の因子の探索を行った。目的の因子は、可溶性である事、またタンパク質の大きさは約 44kDa であることがわかった。しかし、粘度が非常に高く、現在、同定までに至っていない。

研究成果の概要 (英文)：

I analyzed about the unknown factor secreted from bone marrow-derived endothelial progenitor cells. The factor could induce vascular smooth muscle cells proliferation and migration. I analyzed that factor was soluble, and the protein size was 44kDa. However, it was high degree of viscosity, I could not have identified yet.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

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：血管外科、骨髄由来血管内皮前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

閉塞性動脈硬化症 (arteriosclerosis obliterans; ASO) やバージャー病などの重篤な虚血患者の血行再建は、従来の治療法では対処困難であり下肢の切断を余儀なくされている場合が多い。そこで新しい治療法として、EPCsの細胞移植療法が注目されている。これまで成人における血管新生は、成熟血管からの細胞増殖や遊走、リモデリングによるものと考えられていたが、血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells; EPCs) の発見により (Asahara, T. et al.: Science, 275, 964-967, 1997)、成人においても胎生初期

と類似の血管発生が見られる事が判明した。EPCsは骨髄単核球や末梢血幹細胞中に存在しており、これらを傷害モデル動物へ移植した結果、移植EPCsの新生血管への取り込みや血行再建などが認められた (Liu C et. al.: Ann Vasc Surg, 2005 Mar;19(2):241-7.)。我が国では名古屋大学や久留米大学、関西医科大学、自治医科大学、また東京医科歯科大学などで骨髄単核球や末梢血幹細胞を虚血部位に筋肉注射する臨床試験が行われ、効果が認められている。EPCsによる血管新生療法は、患者から採取した細胞を用いるため免疫系の副作用の心配がなく、また患者への侵襲が

低いといった利点から、臨床応用の可能性が高いと言われている。

骨髄単核球・末梢血幹細胞移植の問題点として、重篤な虚血患者では EPCs の含有率が低い事があげられる。そのため患者より採取した細胞から EPCs を体外で培養し増幅させた後に移植する方法が注目されている (Kawamoto A et. al. Circulation, 2001, 103, 634-637)。このように将来の発展が大きく期待されている EPCs 移植だが、移植による血管新生効果が、EPCs の新生血管への取り込みによるものなのか、あるいは移植した細胞より放出されるサイトカイン類によるものなのかは未だに不明である。

2. 研究の目的

骨髄単核球や末梢血幹細胞による細胞移植療法が、多くの大学において臨床試験が実施されており一定の成果を上げている。しかし、これらの細胞は未分化であり、また血管の種となる血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells; EPCs) の含有率が 0.001-1% と非常に低く、純化した EPCs のみを移植に用いる方が安全かつ効率的であると思われる。しかし、EPCs は未知な点が多く残されており、安全かつ効率的な EPCs 細胞移植療法を確立するためには、その作用機序を早急に解明する必要がある。研究代表者はこれまでの研究において、EPCs が分泌する因子によって血管平滑筋細胞 (smooth muscle cells; SMCs) の増殖・遊走性が促進される事を発見した。そこで、EPCs による血管新生促進メカニズムを解明するために、EPCs 由来血管平滑筋細胞活性化因子の同定とその解析を行う。

3. 研究の方法

EPCs により分泌される SMCs の増殖・遊走性促進因子の決定を行う。比較はラット大動脈由来血管内皮細胞の培養上清 (aorta endothelial cell-conditioned medium; AoEC-CM) とする。平成 20 年度には HPLC を使用したクロマトグラフィーによって蛋白を精製し、マスマスペクトル解析により蛋白を同定する。この時、SMCs の増殖・遊走性を精製の指標とする。細胞の培養上清から精製するので、含まれる蛋白の種類は組織や細胞の抽出液に比べ少ないと予想しており、2段階の精製で分離が可能であると予想している。平成 20 年度以降、同定した蛋白の組換え蛋白・中和抗体を用いて、EPCs-CM 内に含まれる目的蛋白の働きを抑制した場合、血管平滑筋細胞に対する促進効果が抑えられるかを調べ、EPCs 由来血管平滑筋細胞活性化因子の確定を行う。その後、in vivo での因子の作用を調べるために、足場素材に混合して動物へ移植し血管新生が誘導されるかを観察し、また遺伝子改変マウスの作製・解析を行う。

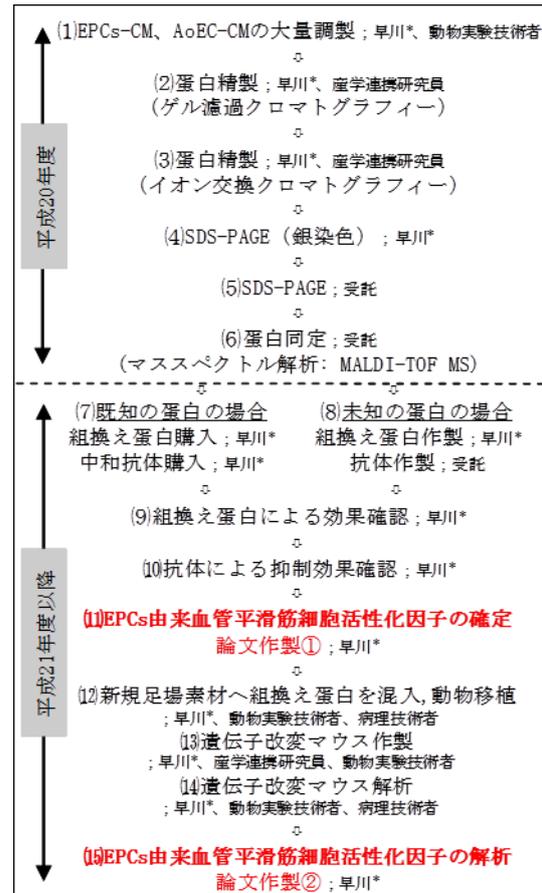
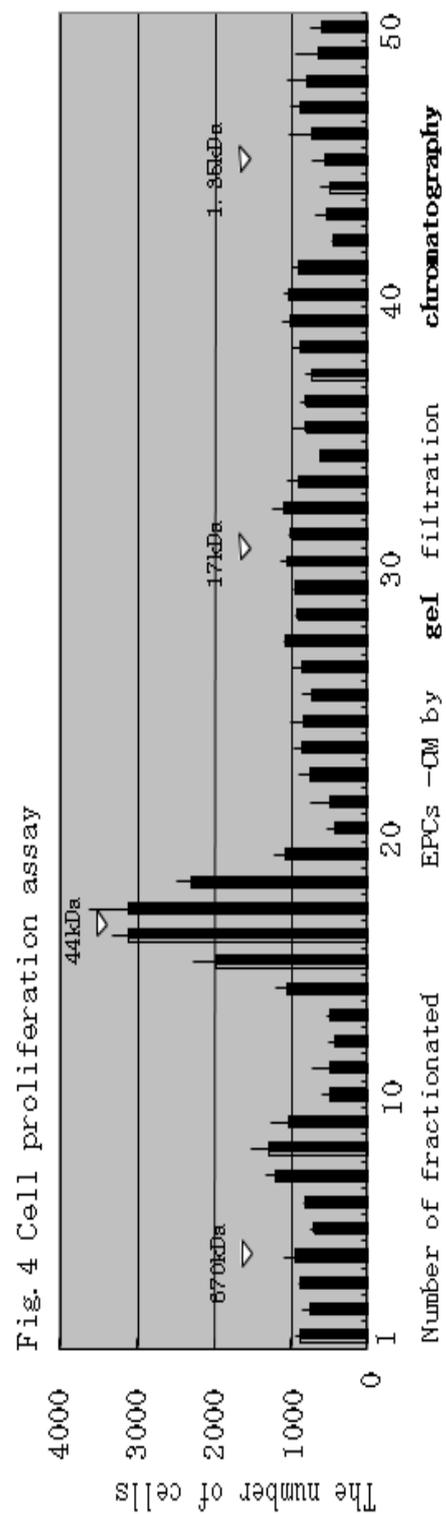
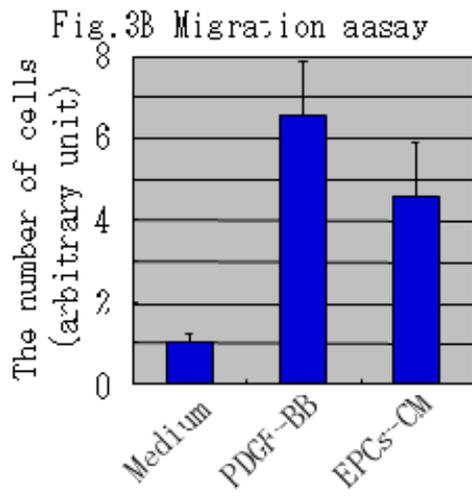
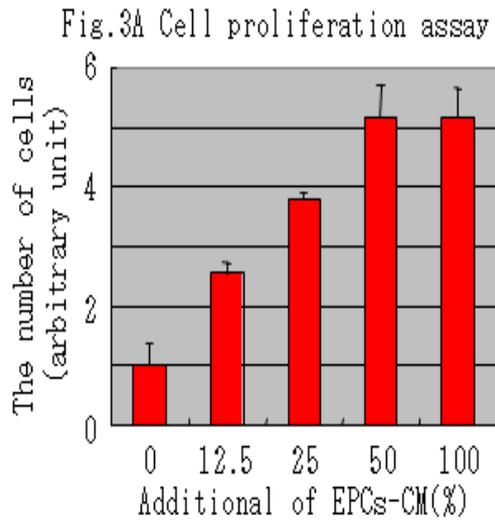


図2 研究計画・方法、研究体制の概要
各実験を担当する責任者(*), 協力者を示す

4. 研究成果

目的の因子は、血管平滑筋細胞に対し、細胞増殖・遊走性を誘導することが確認された (Fig3A, B)。さらに、可溶性であり、タンパク質サイズは約 44kDa である事が分かった (Fig4)。さらに、EPCs により分泌される SMCs の増殖・遊走性促進因子の同定を行った。比較はラット大動脈由来血管内皮細胞の培養上清 (aorta endothelial cell-conditioned medium; AoEC-CM) とする。平成 20 年度には HPLC を使用したクロマトグラフィーによって蛋白を精製し、マスマスペクトル解析により蛋白を同定する事を予定していた。まず最初に、目的蛋白の精製のため、EPC を 2×10^7 cells を培養し、その培養上清を回収し、HPLC により分離を行った。しかし、この培養上清は予想に反して非常に粘性が高く、HPLC のカラムに引っかかってしまい、分離が非常に困難であった。粘度を下げるために、培養上清の希釈を検討したが、分離することが出来なかった。現在、HPLC による分離の検討と、粘度を低下させるための EPC 培養条件の検討を行っている。



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 0 件)

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 朋子 (HAYAKAWA TOMOKO)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：30420821

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし