

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月29日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591640

研究課題名（和文） 移植細胞の生着率向上に基づく血管新生治療法の開発

研究課題名（英文） The enhancement of therapeutic efficacy of autologous cells by hypoxic preconditioning

研究代表者

桂 春作 (KATSURA SYUNSAKU)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40457304

研究成果の概要（和文）：細胞移植による血管新生治療は虚血性疾患に対する有望な治療法である。一方で、虚血組織での移植細胞の生着率が極めて低いために、治療効果が限定的であるといった問題がある。本研究では、移植細胞を一時的に低酸素に晒すこと（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率を向上させることができ、血管新生治療の効果増強につながることを示した。低酸素プレコンディショニングは短時間かつ簡便な移植細胞の機能増強法であり、今後の臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Therapeutic angiogenesis by the implantation of autologous cells is a promising treatment for ischemic diseases. However, the poor retention of the cells after implantation into ischemic tissue is a major problem that related to poor potential of cell-based therapy. This study shows that hypoxic preconditioning enhances the therapeutic potential of implanted cells by increasing their retention. This approach is a short-term and simple method of enhancing the angiogenic potency of implanted cells. Further clinical trials are required to confirm the efficiency of this method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：血管新生、細胞移植、生着率、低酸素、プレコンディショニング、再生医療、末梢血単核球

1. 研究開始当初の背景

我々は細胞移植による血管新生治療に関する研究を行い、成果を挙げてきた (*J Surg Res.* 2000; 89: 189, *Circulation.* 2005; 111: 2438)。世界初となる重症虚血患者に対する臨床試験を行い、虚血組織での血流増加や臨床症状の

改善などの有効性と安全性を証明してきた (*Jpn Circ J.* 2001; 65: 845, *Cell Transplant.* 2002; 11: 747)。現在、骨髄細胞、末梢血単核球、臍帯血などを用いた本治療法は日本のみならず世界中の多くの施設で臨床応用され、有効性の裏付けがなされている (*Lancet.*

2002; 360: 427, *Circulation*. 2003; 107: 2294)。
しかし、本治療における問題の1つとして、
虚血組織に移植後の細胞生着率が低いこと
が挙げられる。我々は、移植後の細胞生着率
が移植1日後で既に15%程度にまで減少する
といった結果を得ている (*Cell Transplant*.
2004; 13: 639)。また、標的となる虚血組織内
に移植細胞はとどまらず、他臓器に移行する
ことも報告されている (*Circulation*. 2003; 107:
2134, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26:
1066, *J Cell Biochem*. 2007; 102: 183)。従って、
移植後の虚血組織内での細胞生着率を上昇
させることが治療効果の向上につながると
考えられる。

我々は、移植細胞における生着率上昇の戦
略とその際に標的となる分子を次のように
考えた。

- (1) 標的となる虚血組織内で保持される細胞
数を増加させる (= 接着率を上昇させる) ;
接着分子 : 虚血組織内での接着の上昇
- (2) 保持された細胞の生存率を上昇させる ;
細胞生存分子 : 虚血組織環境下での細胞
死の抑制

また、こうした点を解決する方法として、移
植前の細胞に対して一時的な低酸素培養を
行うこと (低酸素プレコンディショニング)
が有用ではないかと考えた。我々の以前の研
究では、低酸素プレコンディショニング後の
細胞を下肢虚血筋肉に移植した際には、虚血
組織内での血管内皮増殖因子 (VEGF) 産生
を増大させることで、血管新生治療効果を増
強させることを明らかとした (*Am J Physiol
Heart Circ Physiol*. 2002; 283: H468)。一方で、
細胞を低酸素に晒すことによって、接着分子
や細胞生存分子の発現が上昇することが知
られている (*Cardiovasc Res*. 2006; 70: 254)。
従って、移植前の細胞に対して低酸素プレ
コンディショニングを行うと接着分子や細胞
生存分子の発現変化を介することで、細胞の
接着・蓄積を増強すると共に、細胞生存率の
上昇をもたらす可能性は十分にあると考え
られる。

以上の点を考慮して、低酸素プレコンディ
ショニングは虚血組織移植後の細胞生着率
を上昇させることで、血管新生治療の効果を
向上させると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、末梢血単核球を用いて、以下
の点を明らかにすることを目的とした。

- (1) 末梢血単核球に対して低酸素プレコン
ディショニングを行うことによって、
細胞の接着率や生存率が上昇する
か?
- (2) 低酸素プレコンディショニングした末
梢血単核球を移植した際には、細胞生

着率が上昇すると共に血管新生治療
の効果が向上するか?

3. 研究の方法

- (1) 末梢血単核球の単離および低酸素プレ
コンディショニング

C57BL/6 マウスから血液を採取し、比重遠
心法にて末梢血単核球を単離した。単離した
末梢血単核球は2群に分け、低酸素 (低酸素
プレコンディショニング, 2%O₂, 5%CO₂,
33°C; Hypoxia) または正常酸素 (20%O₂,
5%CO₂, 33°C; Normoxia) 条件下で10%牛血
清添加 RPMI1640 培地にて24時間培養した。
培養後の細胞を用いて、以下の検討を行った。

- (2) 遺伝子発現の解析

低酸素プレコンディショニングによる遺
伝子発現の変化を解析した。細胞から total
RNA を抽出して、細胞生存分子 (抗酸化分子
を含む) および接着分子に関して、各々、
Hypoxia Signaling Pathway, Extracellular Matrix
& Adhesion Molecular に焦点を当てたマイク
ロアレイ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) レベルでの確認を
行った。

- (3) 細胞接着の評価

低酸素プレコンディショニングが細胞接
着に与える影響を *in vitro* で検討した。
Fibronectin でコーティングした培養皿上で
37°C、24時間通常培養し、PBS 洗浄後に接着
細胞数を計測した。

- (4) 細胞生存の評価

低酸素プレコンディショニングが細胞生
存に与える影響を *in vitro* で検討した。酸化ス
トレス負荷条件下で 37°C、24時間通常培養
し、トリパンブルー染色法にて生存細胞数を
計測した。

- (5) 下肢虚血モデルの作製および細胞移植

低酸素プレコンディショニングが細胞移植
による血管新生治療の効果に及ぼす影響を *in
vivo* で検討した。C57BL/6 マウスの Common
femoral artery とその分枝を結紮して、下肢虚
血モデルを作製した。その際、末梢血単核球
(2×10^7)、あるいは、PBS をそれぞれ下肢
虚血筋肉内に4箇所注入した。

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分子 (integrin α M、
CXCR4) の役割を検証するために、中和抗体
で処理した末梢血単核球の移植も行った。

さらに、移植細胞の生着率を評価するた
めに、あらかじめ carboxyfluorescein diacetate

succinimidyl ester (CFSE) 蛍光標識した末梢血単核球を移植した。

(6) 移植細胞の生着率の評価

移植細胞の生着について組織学的評価を行った。細胞移植3日後にマウスを犠牲死させ、虚血組織筋肉を採取した。凍結切片を作製後、移植細胞 (CFSE 陽性細胞) の数を計測した。

(7) 血管新生治療効果の評価

細胞移植による血管新生治療の効果を評価するために、虚血下肢の血流量の変化を Laser Doppler Perfusion Imaging System を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 低酸素プレコンディショニングによる遺伝子発現の変化

マイクロアレイによる遺伝子発現解析に基づいて RT-PCR やフローサイトメトリー法にて確認を行った結果、接着 (Integrin α M)、細胞集積 (CXCR4)、細胞生存 (Hexokinase-2)、抗酸化 (Heme oxygenase-1)、血管新生 (VEGF) に関与する分子が低酸素プレコンディショニングに伴って上昇することが確認された。

(2) 細胞接着および細胞生存の評価

細胞接着を評価したところ、Normoxia 群と比較して、Hypoxia 群では接着細胞数が有意に多かった ($P<0.01$)。

次に、酸化ストレス負荷条件下での細胞生存を評価したところ、Normoxia 群と比較して、Hypoxia 群では細胞生存率が有意に増加していた ($P<0.01$)。さらに、Hypoxia 群で発現が上昇していた細胞生存に寄与する分子 (Hexokinase-2、Heme oxygenase-1) の阻害剤投与によって、Hypoxia 群の細胞生存率は Normoxia 群と同程度までに低下した。

以上の結果から、末梢血単核球に対する低酸素プレコンディショニングによって、細胞の接着率や生存率が上昇することが示された。

(3) 細胞移植後の生着率および血管新生治療効果の評価

虚血組織での細胞生着率を組織学的に評価したところ、Normoxia 群と比較して、Hypoxia 群で有意に上昇していた ($P<0.01$)。また、虚血下肢の血流量を測定した結果、Normoxia 群と比べて、Hypoxia 群での有意な血流量の増加も認められた ($P<0.01$)。以上の結果から、末梢血単核球に対する低酸素プレコンディショニングによって、虚血組織へ移植後には生着率が上昇することで血管新生治療の効果が向上することが明らかになった。

さらに、低酸素プレコンディショニング後の末梢血単核球で発現上昇が認められた分子 (integrin α M、CXCR4) が細胞移植による血管新生治療の効果向上に寄与するか否かについて検討を行った。Hypoxia 群で認められた移植細胞の生着率上昇は、integrin α M or/and CXCR4 中和抗体で処理することで消失した。また、虚血下肢での血流量の増加も中和抗体処理によって消失した。以上の結果から、低酸素プレコンディショニングによって発現上昇した integrin α M および CXCR4 が、移植細胞の生着率上昇ならびに血管新生治療の効果向上に寄与することが示された。

(4) 総括

本研究結果として、末梢血単核球に対して低酸素プレコンディショニングを行うことで遺伝子発現の変化が生じ、接着率や生存率が上昇することが示された。また、虚血組織に移植した際には、細胞生着率が向上することで血管新生治療の効果が増強されることも明らかとなった。

移植細胞に対する低酸素プレコンディショニングは短時間かつ簡便な細胞機能の増強法であり、臨床応用を考えると非常に有用な方法になるものと期待される。また、本研究結果は血管新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。

今後、ウサギ等の大動物を用いた実験で低酸素プレコンディショニングの有用性と安全性を確認した後、臨床試験への移行を考えている。

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2件)

① Kubo M, Li TS, Kurazumi H, Takemoto Y, Ohshima M, Murata T, Katsura S, Morikage N, Furutani A, Hamano K.

Hypoxic preconditioning enhances angiogenic potential of bone marrow cells with aging-related functional impairment.

Circ J. 2012; 76(4): 986-994.

(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)

[学会発表] (計5件)

- ① Kubo M, Li TS, Kurazumi H, Takemoto Y, Ohshima M, Hamano K.
Hypoxic preconditioning enhances the angiogenic and therapeutic potential of bone marrow cells with age-related functional impairment
American Heart Association Scientific Sessions 2011
2011.11.14 Orange County Convention Centre
(オーランド、アメリカ)
- ② 藏澄宏之, 久保正幸, 大島真子, 李 桃生, 濱野公一.
骨髓由来細胞を用いた血管再生治療に対する低酸素プレコンディショニング
第11回心血管再生先端治療フォーラム
2011.7.2 品川グランドセントラルタワー
(東京都)
- ③ 久保正幸, 李 桃生, 藏澄宏之, 森景則保, 美甘章仁, 濱野公一.
低酸素プレコンディショニングによる移植細胞の機能増強に基づいた血管再生治療法の開発
日本循環器学会第98回中国・四国合同地方会
2011.5.3 あわぎんホール (徳島県)
- ④ 久保正幸, 李 桃生, 大島真子, 桂 春作, 古谷 彰, 濱野公一.
加齢動物の骨髓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 広島国際会議場 (広島県)
- ⑤ 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 パシフィコ横浜 (神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桂 春作 (KATSURA SYUNSAKU)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 40457304

(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