

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25年 6月 5日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591248

研究課題名（和文） 遺伝子導入マクロファージを用いた難治性皮膚潰瘍に対する細胞移植治療に関する研究

研究課題名（英文） A study on cell therapy in the treatment of refractory wounds using gene transferred macrophages

研究代表者

竹中 秀也（TAKENAKA HIDEYA）

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80254358

研究成果の概要（和文）：

肝細胞増殖因子の遺伝子を糖尿病マウスのマクロファージに導入して効果を検討した。肝細胞増殖因子遺伝子を導入されたマクロファージは著名な脈管様構造を形成した。糖尿病マウスの難治性皮膚潰瘍に対して、スタチンの外用を行ったモデルにおけるマクロファージの役割を検討した。肉芽組織内に浸潤しているマクロファージの数は、スタチン処置群では有意に多かった。これらのマクロファージはリンパ管新生に関わる血管内皮増殖因子Cを発現していた。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the effects of hepatocyte growth factor gene transfer to macrophages of diabetic mice. These gene transferred macrophages showed promoted tube formation. We also investigated the roles of macrophages during wound healing in diabetic mice. Statin treatment promoted infiltration of macrophages in granulation tissues. These macrophages produced vascular endothelial growth factor C, which induces lymphatic vessel formation.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2012年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚炎症・再生学

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでマクロファージが炎症の場において新生リンパ管に分化することや糖尿病によりマクロファージの機能が低下することを報告してきた。一方、肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor、HGF）には血管新生促進作用があることはよく知られており盛んに研究されてきたが、最近 HGF がリンパ管内皮細胞に作用し、リンパ管新生作用があ

ることも報告され注目されている。HGF の血管新生作用に着目し、閉塞性動脈硬化症などによる下肢虚血患者に対してヒト HGF プラスミドの筋肉内投与が、当科を含めた多施設で臨床治験として行われるなど、血管新生療法としてすでに臨床応用が始まっている。HGF は、血管・リンパ管を誘導することで皮膚潰瘍の治癒を促進させることが知られているが、糖尿病により細胞機能の低下したマクロファ

ージに対する作用やマクロファージのリンパ管分化に対する作用については未だに明らかにされていない。

2. 研究の目的

マクロファージは創傷治癒過程において、種々の細胞増殖因子の供給や血管新生のみならずリンパ管新生にも重要な役割を担っていると考えられる。そこで、患者より採取した単球・マクロファージに体外で HGF 遺伝子を導入して低下した機能を改善し、創傷治癒に特化した細胞に分化するよう誘導した後、潰瘍部に移植するという治療法を考案した。マクロファージは末梢血や骨髄由来細胞より簡便に分離培養することができるため、自己血または骨髄由来マクロファージを用いた難治性潰瘍に対する自己細胞移植治療として、臨床へ比較的容易に応用することができる。

本研究では、HGF のマクロファージのリンパ管への分化に関する作用や糖尿病により機能の低下したマクロファージに対する活性化の作用を検討する。皮膚潰瘍に対する HGF 遺伝子導入マクロファージを用いた細胞移植治療による治療効果と血管・リンパ管新生作用などについてマウスを用いた基礎実験により明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病マクロファージに対する HGF の影響についての検討

糖尿病マウス (C57BLKS/J- $m^{+/+}$ *Leprd*) およびその野生マウスを用いる。マクロファージは、腹腔内マクロファージを分離培養する。採取したマクロファージを高グルコース濃度 (25 mM) または正常グルコース濃度 (5 mM) 下で培養し、糖尿病の条件を実験的に作成する。それぞれの条件下で培養したマクロファージを HGF 蛋白で刺激し、またマクロファージに HGF プラスミドと Arrest-In™ を用いて遺伝子導入し、以下の実験を行った。

① リンパ管増殖に必須である vascular endothelial growth factor (VEGF)-C、VEGF receptor-3 といったリンパ管関連因子の発現を RT-PCR で解析した。

② HGF によるマクロファージのリンパ管形成能に対する影響を、Matrigel を用いた tube formation assay により解析した。

③ HGF によるマクロファージの細胞増殖能に対する影響を [³H]thymidine を用いた proliferation assay により解析した。

④ HGF によるマクロファージの炎症性サイトカインや増殖因子に対する chemotactic activity に対する影響をケモタキシスチャンバーを用いた migration assay により解析し

た。

⑤ マクロファージを無血清培地で培養し、apoptosis assay を行い、HGF のマクロファージに対する細胞保護作用について検討した。

(2) HGF 遺伝子導入マクロファージ移植による難治性皮膚潰瘍治療の基礎実験

難治性皮膚潰瘍の典型的なモデルである糖尿病マウスを用いて、難治性皮膚潰瘍に対して HGF 遺伝子導入マクロファージを移植し、その有効性を検討した。糖尿病マウス背部に皮膚潰瘍を作成し、腹腔内マクロファージに HGF プラスミドまたはコントロールプラスミド遺伝子導入をしたのち、局所投与する。正常皮膚組織、潰瘍作成直後、7、14 日目の潰瘍部皮膚を採取し、以下の評価を行った。

① 皮膚潰瘍の面積を測定し、創の縮小率より創傷治癒促進効果を評価した。

② 潰瘍部肉芽組織の成熟度を、組織学的にスコア化することにより評価した。

③ 潰瘍部の血管新生度を、CD31 の免疫染色により定量評価した。

④ 潰瘍部のリンパ管新生度を、LYVE-1 の免疫染色による定量評価により検討した。

(3) 難治性皮膚潰瘍モデルにおけるマクロファージの役割についての検討

我々は、糖尿病マウスの難治性皮膚潰瘍に対して HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるスタチン (シンバスタチン) の外用により、創傷治癒促進、血管・リンパ管新生促進効果があることを示してきた (雑誌論文①)。そこで、このモデルにおけるマクロファージの役割を検討した。7 日目の潰瘍部皮膚を採取し、以下の評価を行った。

① 抗 F4/80 抗体による免疫染色を行い、肉芽組織内に浸潤しているマクロファージの数を定量評価した。

② 浸潤しているマクロファージの phenotype を検討する目的で、抗 IL-13 抗体および抗 tumor necrotic factor (TNF) α 抗体と抗 F4/80 抗体による二重染色を行った。

③ マクロファージの VEGF-C の発現を検討する目的で、抗 VEGF-C 抗体と抗 F4/80 抗体による二重染色を行った。

④ 肉芽組織中の VEGF-C の発現を検討する目的で、RT-PCR を行い定量評価した。

4. 研究成果

(1) 糖尿病マクロファージに対する HGF の影響についての検討

HGF 遺伝子を導入した糖尿病マウスのマクロファージを用いた実験結果を以下に示す。

①VEGF-C、VEGF receptor-3 といったリンパ管関連因子の発現を RT-PCR で解析した。予備実験においては HGF 遺伝子を導入された糖尿病マウスのマクロファージでは、VEGF ならびに VEGF receptor-3 の発現が亢進していることがわかった。その後の実験では、遺伝子を導入された細胞の機能が亢進していることを示す安定したデータは得られていない。

②リンパ管形成能に対する影響を tube formation assay により解析した。HGF 遺伝子を導入された糖尿病マウスのマクロファージは、著名な脈管様構造を形成した (図 1)。このことから、HGF プラスミドにより糖尿病マウスのマクロファージに遺伝子導入がなされ、低下したマクロファージのリンパ管新生における機能が改善することが示唆された。

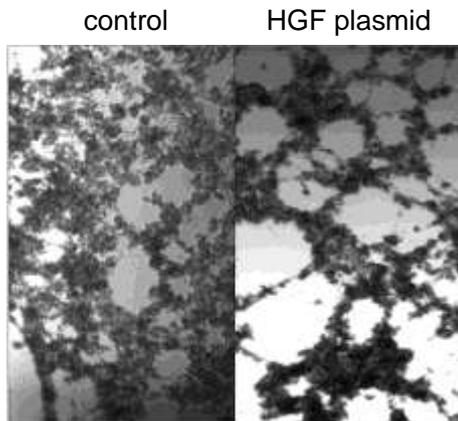


図 1. Tube formation assay

③Proliferation assay、migration assay、apoptosis assay などを行った。しかしながら現在までのところ、遺伝子を導入された細胞の機能が亢進していることを示す安定したデータは得られていない。

(2) HGF 遺伝子導入マクロファージ移植による難治性皮膚潰瘍治療の基礎実験

難治性皮膚潰瘍の典型的なモデルである糖尿病マウスを用いて、難治性皮膚潰瘍に対して HGF 遺伝子導入マクロファージを移植し、その有効性を検討した。

①皮膚潰瘍の面積を測定し、創の縮小率より創傷治癒促進効果を評価したが、現在までのところ創傷治癒を促進することを示す安定したデータは得られていない。

②潰瘍部肉芽組織の組織学的に検討したが、肉芽組織の形成促進、血管新生・リンパ管新生の促進を示す安定したデータは得られていない。

(3) 難治性皮膚潰瘍モデルにおけるマクロファージの役割についての検討

糖尿病マウスの難治性皮膚潰瘍に対してスタチンの外用を行ったモデルにおけるマクロファージの役割を検討した (雑誌論文①)。

①肉芽組織内に浸潤しているマクロファージの数は、スタチン処置群がコントロール群に比べ有意に多かった (図 2, 3)。

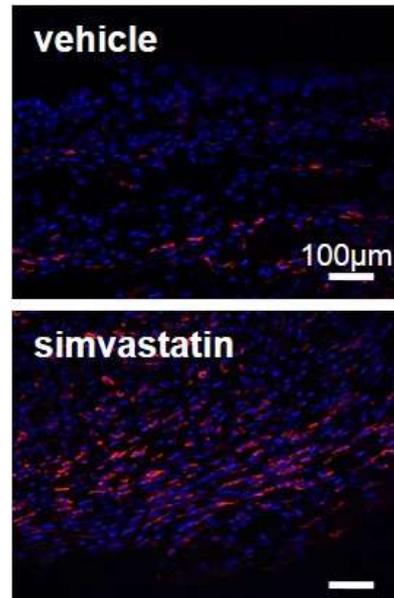


図 2. マクロファージの浸潤

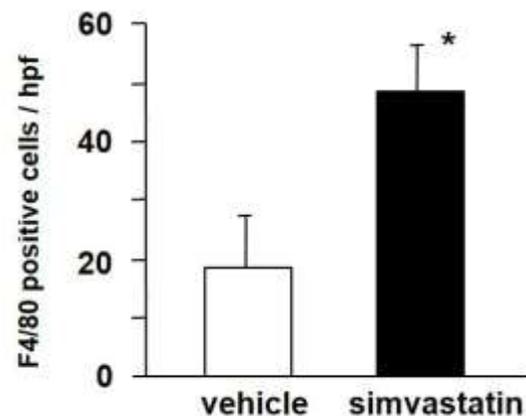


図 3. スタチン処置群ではマクロファージの数が増加

②浸潤しているマクロファージの phenotype を検討した。コントロール群では大多数のマクロファージは免疫を活性化する M1 型のマーカーである TNF- α を発現していた (図 4, 5)。一方、スタチン処置群では大多数のマクロファージは免疫を抑制する M2 型のマーカーである IL-13 を発現していた (図 6, 7)。

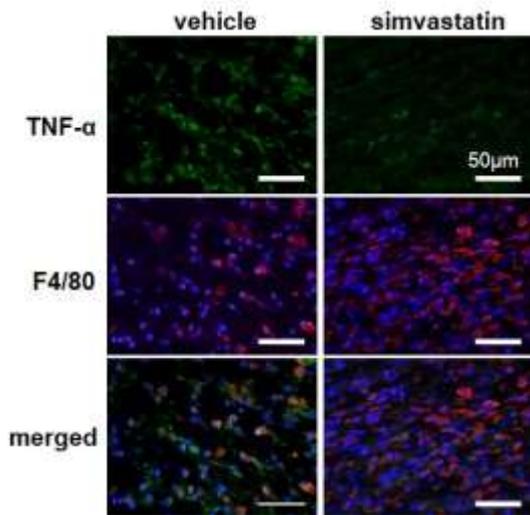


図 4. マクロファージの M1 型のマーカーである TNF- α の発現

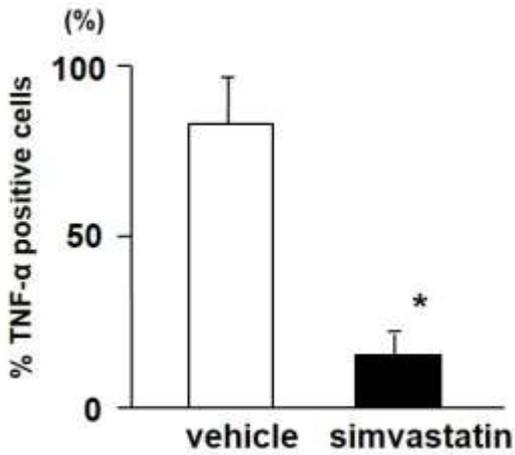


図 5. コントロール群では大多数のマクロファージは TNF- α を発現

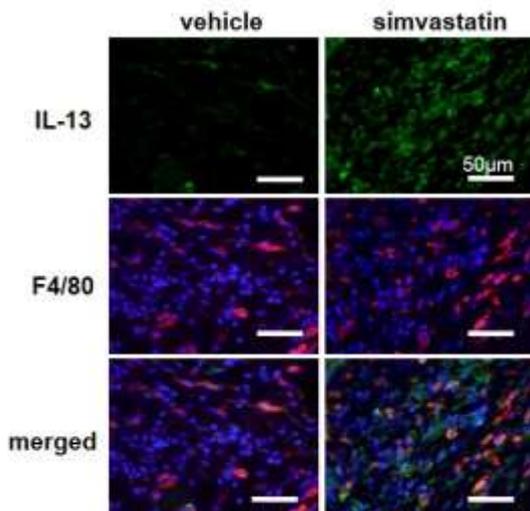


図 6. マクロファージの M2 型のマーカーである IL-13 の発現

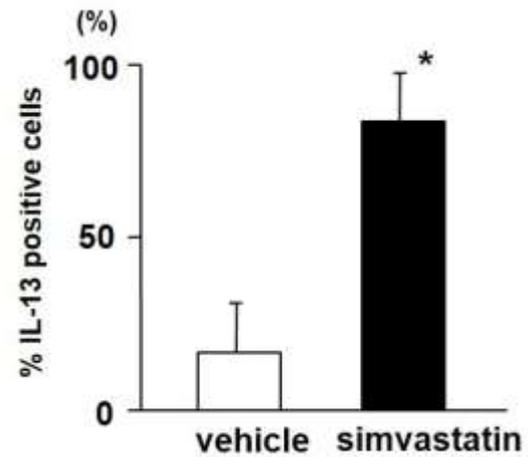


図 7. スタチン処置群では大多数のマクロファージは IL-13 を発現

③浸潤しているマクロファージの VEGF-C の発現を検討した。スタチン処置群ではマクロファージは抗 VEGF-C 抗体と抗 F4/80 抗体で染色されており、マクロファージが VEGF-C を発現していることが示された (図 8)。

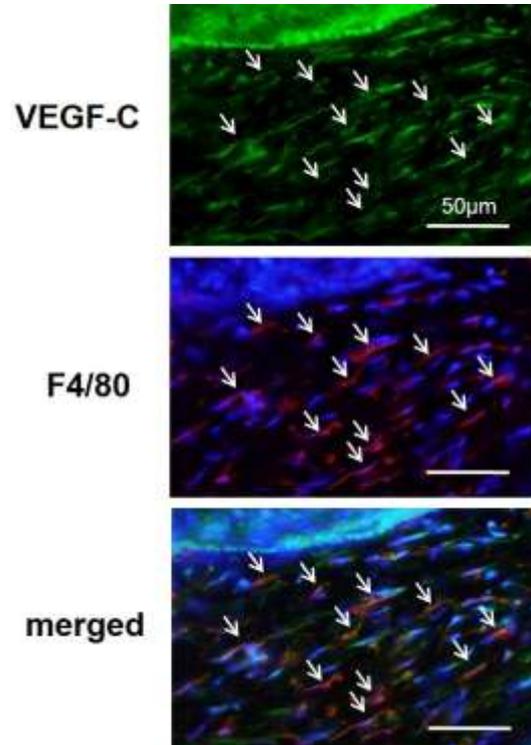


図 8. スタチン処置群におけるマクロファージの VEGF-C の発現

④スタチン処置群では肉芽組織中の VEGF-C の発現は RT-PCR において有意に上昇していた (図 9)。

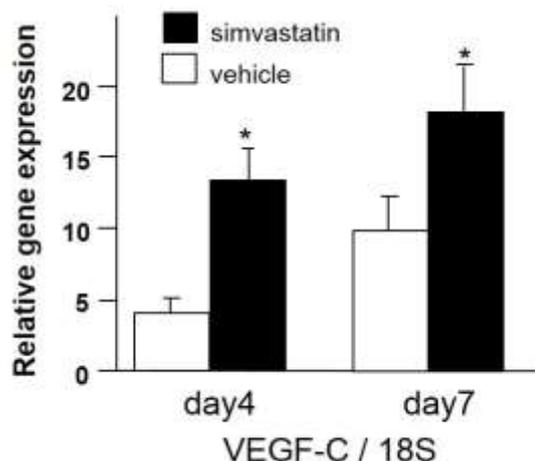


図 9. 肉芽組織中の VEGF-C の発現

これらにより、創傷治癒促進や血管・リンパ管新生促進にマクロファージが重要な働きをしていることが示唆された。

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 1 件)

① Asai J, Takenaka H, Hirakawa S, Sakabe J, Hagura A, Kishimoto S, Maruyama K, Kajiya K, Kinoshita S, Tokura Y, Katoh N. Topical simvastatin accelerates wound healing in diabetes by enhancing angiogenesis and lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 2012 181: 2217-2224. (査 読 有 り) DOI: 10.1016/j.ajpath

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹中 秀也 (TAKENAKA HIDEYA)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：80254358

(2) 研究分担者

浅井 純 (ASAI JUN)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：50438222