

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591097

研究課題名(和文) Notchシグナルに着目した新規血管再生治療の開発

研究課題名(英文) Therapeutic neovascularization targeting Notch signaling

研究代表者

館野 馨 (Tateno, Kaoru)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20532758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血単核球移植は、重症下肢虚血に対する血管再生治療として有用であるが、約30%が治療に無反応である。これらの症例では移植細胞のNotch リガンド発現が減弱しており、Notchリガンド・受容体をそれぞれ移植細胞・筋組織で欠損するモデルでも、同様に治療効果が減弱した。治療無反応モデルである糖尿病、高齢マウスでは、虚血状況下でのNotch シグナル増強が障害されており、これにNotchリガンドJagged-1またはDll-4を過剰発現した細胞を移植したところ、前者で治療効果が改善した。Jagged-1によるNotch標的治療は、重症下肢虚血に対する新規治療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Peripheral blood mononuclear cell implantation is a promising method to treat critical limb ischemia. Nonetheless, 30% of the cases are non-responding. We found that Notch ligand expression in these patients was down regulated. Likewise, mice models deleting Notch ligands or receptors from donor cells or host ischemic muscles, respectively, revealed that Notch signaling components are critical in the mechanism of the therapy. We employed mice models for non-responding patients, i.e. diabetes or aged mice, and found that Notch signaling was attenuated following limb ischemia. Addition of Jagged-1, but not Dll-4, overexpressing cells to these models helped ischemia to heal more adequately. These results warrant us to further deploy a Notch targeting therapy for previously the non-responding patients.

研究分野：医歯薬学

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：分子血管病態学 再生医療

1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床的背景

血管再生治療は、重症下肢虚血などの難治性虚血性疾患に対する新たな治療法として期待されている。なかでも自家骨髄・末梢血単核球細胞移植法は多数の臨床研究によって安全性と有用性が示されており、最も有望な方法のひとつである(Tateno et al. *Annals of Vascular Diseases*. 166 2008)。しかし本治療を受けた重症下肢虚血症例のうち、腎不全、糖尿病症例や高齢者を中心に、約30%が治療に無反応な non-responder (NR) ケースであることも分かってきた (Moriya J, Tateno K et al. *Circ Cardiovasc Intervent*. 2 245 2009)

(2) 当初の研究データ

本治療法の効果を改善させるためには、詳細な治療機序の解明が不可欠である。細胞移植法の治療メカニズムは、移植細胞由来の液性因子による組織保護・血管再生効果と、血管内皮前駆細胞の血管への分化によって説明されてきた。しかし近年、移植細胞の組織生着率が極めて低いことが判明し、これらの機序のみで治療メカニズムを説明することは困難であることが明らかとなった。我々は、この矛盾が未知なる第3の機序の存在を示すものと考え、研究を続けた。その結果、細胞移植によって骨格筋芽細胞の増殖が顕著に促進すること、筋芽細胞が筋管細胞へと分化する過程で多様な血管新生因子が持続的かつ豊富に分泌されること、これらの効果は血管再生が認められるより以前に生じること、これが治療的血管再生に必須であることを見出した (Tateno et al. *Circ Res*. 98 1194 2006)。つまり細胞移植の役割は、一連の組織再生カスケードの引き金を引く点にあり、その後の血管再生は組織再生に付随して生じるものと考えられた。この発見は、血管再生治療の機序に関する従来の仮説が抱えていた矛盾を解消できる、重要な仮説として高く評価された (*Circ. Res*. 98 1115 2006, editorial)。

しかし細胞移植が組織再生をトリガーする具体的な分子機序は依然として不明なままであり、その解明によって、新たな治療法の開発が可能になると期待された。そこで我々は、骨格筋再生に重要であり、かつ単核球に豊富に含まれる候補分子として Notch シグナルに着目した。Notch 受容体のリガンドである Jagged-1 は単核球成分に豊富に含まれており、また Notch シグナルが筋芽細胞の増殖に必須であることが既に知られていたからである。

細胞治療における Notch シグナルの重要性を検証するため、まず虚血筋組織での Notch シグナル検出を試みた。Western blot

法・免疫染色法・Notch indicator マウス組織染色等を行ったところ、細胞治療後 24 時間以内に、主として筋芽細胞において、Notch-1 活性が顕著に増強することが明らかとなった。続いて Notch 阻害剤である Secretase inhibitor (GSI) を投与したところ、単核球移植による虚血組織再生および血管再生が著しく阻害されることが明らかとなった。Notch-1 のコンディショナルノックアウト (N1-CKO) マウスを用いた実験でも同様の結果であった。一方、Jagged-1 conditional KO マウス由来の単核球は野生型由来と比較して血管再生効果が劣ることが見出され、逆に Notch リガンドを遺伝子導入した細胞を虚血組織へ移植したところ、虚血筋組織および血管の再生が顕著に増強することが明らかとなった。

これらの研究から、細胞治療における、虚血組織(Host 側)の Notch シグナルの重要性、移植細胞(Donor 側)の Notch リガンドの重要性が示され、加えて Notch シグナルを標的とした血管再生治療の実現可能性が示唆された。ここで重要なことに、臨床研究における Non Responder(NR) ケースでは、単核球サンプルの Jagged-1 発現が顕著に減弱していることが見出された。

2. 研究の目的

以上の結果から我々は、血管再生治療の NR 症例は Notch シグナルに何らかの障害があるものと仮説をたてた。この仮説を検証し、血管再生治療の Non responder(NR) ケースに対して有用性を持つ新規治療を開発することを目的に本研究を計画した。

3. 研究の方法

本研究は、マウスを用いて下記の段階を経て実施する予定とした。

(1) Non responder モデル動物の確立

血管再生治療の Non-responder (NR) ケースにおける治療無反応性に Notch シグナルが関与しているか直接検証するには、虚血筋組織の生検を行い Western blot 法や定量的 RT-PCR法を用いて Notch シグナルを定量すればよい。しかしこの方法では、元来重度の虚血が存在する生検部位に難治性の創傷を来すため、事実上困難である。そこで血管再生治療に対する Non responder 病態モデル動物を確立し、これによって Notch シグナルの重要性を検証することとした。

我々の臨床研究では、血液透析症例において細胞移植の治療効果が有意に減弱しており (*Circ Cardiovasc Intervent*. 2 245 2009)、また糖尿病症例や高齢者でも効果が減弱する傾向を認めた。そこでこれらの疾患に対する病態モデル動物として、慢性腎不全モデル

(Gagnon et al. Urol Res. 1988 16 119) 糖尿病モデル (Orimo M, Tateno K et al. ATVBiol. 2009 29 889) および加齢モデル (Kunieda T, Tateno K et al. Circ Res. 2008 102 607) を作成し、これらモデルマウスの大腿動脈を結紮して下肢骨格筋虚血を作成、同胞の単核球を筋注のうえレーザー Doppler 血流計にて血流の回復を定量した (Circ Res. 98 1194 2006)。

(2) Non responder モデル動物における Notch シグナルの関与の検証

NR モデルに細胞移植治療を行い、Notch シグナルの変化を Western blot 法、定量的 RT-PCR 法、免疫二重染色法、および Notch indicator マウス (NAS-Tg マウス Genesis. 2006 44 277) の組織染色等によって確認した。また移植細胞中の Notch リガンド発現についても定量的 RT-PCR 法によって確認した。

(3) Non responder モデル動物に対する Notch 増強療法の有用性の検証

前述のとおり、我々は Notch リガンドを遺伝子導入した細胞を野生型の下肢虚血マウスに投与し、局所での Notch シグナル増強と血管再生改善を得ることに既に成功している。しかし移植細胞に対する遺伝子導入を臨床応用することは、安全性への懸念から事実上困難である。そこで我々は臨床応用を念頭に、抗体医薬を用いた Notch 増強療法の開発が可能か検証する方針とした。

まず *in vitro* で Notch アゴニスト作用を持つ抗体、数種類を準備し、これらをマウス下肢虚血モデルに投薬し、*in vivo* でも Notch シグナル増強作用を有する抗体のロットと投与量を確認した。続いて虚血組織の再生過程を追って時系列に抗体を投与し、レーザー Doppler 血流計や組織切片にて血管再生効果を評価した。

(4) 患者単核球による Notch シグナル増強作用を定量する方法の開発と、Notch 増強療法の妥当性を問う臨床観察研究を行うための基礎ツールの確立

ヒト重症虚血肢の筋組織で Notch シグナルを直接定量することは困難であるが、*ex vivo* で移植細胞による Notch シグナル増強作用を検証することは可能である。そこで本研究では、Notch シグナルを検出する Luciferase construct (Nucleic Acids Res. 26 5448 1998) を細胞株に遺伝子導入し、Notch signal-indicator cell line を確立する予定であった。具体的には健康人から 5ml の末梢血を採取し 1×10^7 個の末梢血単核球を分離のうえ、indicator cell line と共培養することで、単核球による Notch シグナル活性化作用を定量する方法を開発する予定であった。

しかし後述のとおり、Notch リガンドの差異による治療効果の強弱が強く予測されるような研究成果が他より公表されたこと、Notch リガンド欠損/過剰発現細胞移植による治療効果が必ずしも Notch シグナルに依存しない可能性が新たに出現したことから、研究計画を一部変更し、Notch リガンド毎の治療効果をまず優先的に検証することとした。

4. 研究成果

(1) Non responder モデル動物の確立

糖尿病マウス、加齢マウスはともに、対照マウスと比較して、下肢虚血作成後の血流回復が有意に遅延していた。腎不全マウスでも血流回復が遅延する傾向が見られたが、有意ではなかった。これらのモデルに野生型マウスの末梢血単核球を用いて細胞移植を加えたところ、糖尿病マウス、加齢マウスともに、対照マウスと比較して治療効果が減弱していた。

(2) Non responder モデル動物における Notch シグナルの関与の検証

糖尿病、加齢、腎不全それぞれのマウスで虚血作成 24 時間後の骨格筋組織を採取し、RNA 発現を定量した。その結果、いずれのモデルにおいても、対照マウスと比較して、Notch シグナル下流である Hes-1 の転写が有意に抑えられていた。腎不全モデルでは、Notch シグナルが低下しているにも関わらず血流回復が得られることが明らかとなった。

本研究を始める以前のモデルはノックアウトマウスを用いており、Notch シグナルが完全に遮断されていた一方で、今回の腎不全モデルでは同シグナルが残存していたことから、血流回復の遅延が生じなかった可能性があるため、この時点では考察された。

(3) Non responder モデル動物に対する Notch 増強療法の有用性の検証

糖尿病、加齢、腎不全それぞれの下肢虚血マウスに Jagged-1 を過剰発現した骨髓芽球細胞を投与したところ、部分的ながら、いずれも治療効果が得られた。対照となる骨髓芽球細胞を投与したマウスとの血流回復比は、通常の単核球を投与したマウスと生理食塩水を投与したマウスとの血流回復比と比較して、有意に高かった。

以上の結果から、Jagged-1 過剰発現細胞の移植療法は、Non responder モデルマウスの虚血緩和に有用であると考えられた。しかしながら、対照骨髓芽球細胞移植は、生理食塩水を投与した場合と比較して、有意に血流回復が悪化していた。さらに残念なことに、Notch アゴニスト抗体による治療は、虚血組織内で Notch シグナルを増強したものの、十

分な血管再生効果を示さなかった。

以上の結果から、Jagged-1 過剰発現細胞の治療効果は、虚血骨格筋組織における Notch シグナル増強のみでは説明できない可能性が、新たに出現した。考え得る機序として、Jagged-1 の遺伝子導入が骨髄芽球の形質を変化させたこと等が想定された。

これらの点の検証にはフローサイトメトリーを用いた遺伝子導入細胞の形質確認が必要であったが、今回の助成内では実施できなかった。今後の課題として検討したい。

(4) 患者単核球による Notch シグナル増強作用を定量する方法の開発と、Notch 増強療法の妥当性を問う臨床観察研究を行うための基礎ツールの確立

橋渡し研究が臨床応用に至らず失敗する、あるいは大規模試験で効果が得られないことが多い現状を指して、基礎研究と臨床応用の「死の谷」と呼ぶ。死の谷が形成される背景として、治療対象となる患者群が適切に選択されていない可能性が指摘されている。そこで本研究では、Notch 増強療法の妥当性を問う臨床観察研究を行うために、患者単核球による Notch シグナル増強作用を定量する方法の開発を予定していた。

しかし先に述べたとおり、Notch シグナルの強度と血管再生は、必ずしも正比例している訳ではなかった。Non responder となる原因は、Notch シグナル単独ではないことは、考えてみれば十分に蓋然性がある。

当研究では、従来の血管再生治療の Non responder、なかでも単核球の Jagged-1 発現が低下しているケースを対象としている点の特徴であり、臨床データでは虚血組織の Notch シグナルを直接検証した訳ではなかった。この点にいまいちど立ち返り、当初の仮説をもういちど考察する必要に迫られた。

最近、Notch 受容体は、リガンドの種類によって下流シグナルが大きく変わることが知られてきた。血管においても、Jagged-1 と Dll-4 では相反する効果が報告されている。我々のサンプルでも、治療効果と Jagged-1 は関連していたが、Dll-4 の発現と治療効果には関連が見られないことが明らかとなった。

そこで、当初予定していた Notch シグナル増強作用を定量する方法の開発は、必ずしも重要ではなく、むしろ当初得られた臨床データを忠実に解釈し、Jagged-1 発現の低下を補う治療法が良いのではないかと思料された。

(5) 異なる Notch リガンドにおける、過剰発現細胞移植による血管再生効果の比較

そこで当初の予定を変更し、まず Jagged-1 過剰発現細胞移植の正当性を Dll-4 過剰発現細胞移植と比較することで検証しようと考えた。

従前の方法にしたがいこれらの細胞を作成し、それぞれを野生型マウスの虚血下肢に投与したところ、Dll-4 過剰発現細胞では十分な血管再生効果が得られないことが確認された。

(6) まとめ

末梢血単核球移植による血管再生治療の機序に関して、Notch シグナルに着目して研究を進めた。その結果、移植細胞での Jagged-1 発現低下が治療効果減弱と関連すること、逆にこれを過剰発現した細胞を移植することで、糖尿病、腎不全、加齢モデルマウスの下肢虚血を改善しうることを示した。しかし、これらは必ずしも Jagged-1 による Notch 増強作用とは関連しない可能性も否定できなかった。本研究を臨床応用へと進める前に、まずは Jagged-1 を発現する細胞分画の詳細な解析が必要と思われた。

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0件)

[学会発表](計3件)

1. Kaoru Tateno, Tohru Minamino, Junji Moriya, Sho Okada, Ippei Shimizu, Masataka Yokoyama, Aika Nojima, Takashi Ito, Yoko Yoshida, Issei Komuro, Yoshio Kobayashi. 'Therapeutic Neovascularization Targeting Notch Signaling' **第75回日本循環器学会総会・学術集会** (2011/8/4 横浜)
2. Kaoru Tateno, Tohru Minamino, Yohko Yoshida, Junji Moriya, Sho Okada, Ippei Shimizu, Masataka Yokoyama, Takashi Ito, Aika Nojima, Issei Komuro, Yoshio Kobayashi. 'Therapeutic Neovascularization Targeting Notch Signaling.' **American Heart Association Scientific Sessions, 2011.** (2011/11/16 Orlando, FL USA)
3. Kaoru Tateno. 'Therapeutic Neovascularization Targeting Notch Signaling' **Gordon Research Conference** (2012/8/15 Lewiston, MA, USA)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計1件)

名称：抗ノッチ1アゴニスト抗体を含む組織再生治療剤及び該抗体を使用する組織再生治療方法

発明者：南野 徹、舘野 馨、八木田 秀雄

権利者：千葉大学、順天堂大学医学部

種類：特許

番号：特許公開 2012 - 056934

取得年月日：2012年3月22日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/cardio>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舘野 馨 (TATENO, Kaoru)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20532758

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

南野 徹 (MINAMINO, Tohru)

新潟大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90328063