

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592040

研究課題名(和文) 骨髄単核球細胞移植による肺高血圧症治療の際の移植細胞の果たす役割

研究課題名(英文) Bone Marrow Mononuclear Cell transplantation as a therapeutic option for pulmonary arterial hypertension and its role of BM-MNCs

研究代表者

中山 泰介 (NAKAYAMA, Taisuke)

徳島大学・大学病院・医員

研究者番号：80582791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮原細胞を多く有する骨髄単核球細胞(BM-MNCs)の移植により肺高血圧症を改善させることができるのではないかと仮説に基づき研究した。monocrotaline誘発肺高血圧モデルにおいて、経静脈的BM-MNCs移植により肺高血圧症が改善する。その機序として、細胞移植に伴う肺組織でのパラクライン効果によるVEGFの増大と、それによるVEGF-VEGF receptorシステムの活性化が最終的に肺小動脈のリモデリングを引きおこし、肺高血圧症を改善すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects and possible mechanism of bone marrow mononuclear cell (BM-MNC) transplantation on pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline. The monocrotaline-injected mice improved significantly 4 weeks after BM-MNC transplantation compared with mice at 8 weeks after monocrotaline injection. BM-MNCs were incorporated into the lung at 30 minutes after transplantation, and significant vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulation and almost no change of its receptor expression were observed in the lung tissue 1 week after transplantation. Moreover the improvement of pulmonary arterial hypertension was inhibited by simultaneous administration of VEGF receptor-2 inhibitor with BMMNC transplantation. BMMNC transplantation improves monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by favorable pulmonary artery remodeling through VEGF upregulation and its receptor system.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：肺高血圧 骨髄単核球移植 マウスモデル

## 1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患の外科的修復術の成否は心臓の形態、機能的因子のみならず、良好な肺血管床があることが必須である。実際の臨床の場において、特に次のような病的肺血管床を持つ先天性心疾患に外科治療を施すにあたり問題となる。1) 肺動脈閉塞性病変を有する肺高血圧症例、2) 多数かつ細小の主要体肺側副動脈(major aorto-pulmonary collateral artery; MAPCA)を有し、それらの統合(unifocalization)が困難な症例、3) 先天的に左右の肺動脈が分断され、どちらか一方の肺動脈が未発達な症例がある。このような症例では、時に肺/心肺移植以外に救命の手段が閉ざされる場合があるが、これらの病的な肺血管を再生、もしくは新生することができれば、自己の心臓による修復が可能になることが期待できる。

近年、骨髄、血液、臍帯血中の内皮前駆細胞(EPC: endothelial progenitor cells)の存在が明らかになり、その血管新生作用が確認され、虚血心筋、閉塞性動脈硬化症などに対しその臨床応用が始められているが、肺血管新生に関しては、いまだ基礎実験の段階である。

骨髄単核球移植による肺血管新生効果とVEGFとそのレセプターによるパラクライン効果が大きくかかわっていることが、いまだ結論には至っていないのが現状である。

そこで、骨髄単核球移植による肺血管新生療法において、移植細胞の具体的な役割について研究する。

上記のような病的肺血管床を持つ症例においては、肺/心肺移植以外には外科的治療を断念せざるを得ないケースが存在するが、周知の通り我が国の小児の移植医療は未だ確立されていない。したがって、現状では、肺血管床を再生あるいは新生する以外に残された治療はない。

血管新生は、前述のように肺血管にも応用できる可能性も報告されており、その機序を明らかにすることができれば、安全性の確立、効果的な治療方法の計画が可能となり、本研究においてこれを確立できれば、小児の先天性心疾患の治療に大きな選択肢を増やすことが可能となり、その意義は大きい。

虚血心筋、閉塞性動脈硬化症などに臨床応用が始められているが、肺血管新生に関しては、血管内皮前駆細胞移植をはじめとした骨髄細胞移植による肺血管新生の可能性は報告されているものの、いまだ基礎実験の段階であった。さらに今後これに加えて、骨髄単核球細胞の生体内動態、分子機構、分化過程などの詳細な解明により責任分子を制御することによってより安全で個々の病態に応じた細胞移植による肺血管再生治療が可能となり、臨床応用への発展が期待される。

## 2. 研究の目的

近年、虚血臓器への骨髄単核球移植による血管新生療法が注目を浴びている。我々は血

管新生療法による肺高血圧治療の基礎研究を経て、今回の研究では、肺において血管新生の起こるメカニズム、特に移植骨髄細胞の生体内での動態を分析し、どこでどのように血管新生に対して影響を及ぼしているのかを検討する。また臨床応用へ向けての安全性の評価も併せて行う。

## 3. 研究の方法

monocrotaline (MCT)誘導肺高血圧モデルマウスを用いる。同種マウス骨髄から骨髄単核球を分離、経静脈投与法にて、肺血管の新生、再生を図る。そのときの移植前後の血液および肺標本および全身の臓器、骨髄から血管内皮前駆細胞が血管新生にどの部位でどのように関与しているかどうか、また VEGFなどの血管新生にかかわる因子を測定し、これらの由来や局所での作用を総合的に判定し肺血管新生の機序を明らかにする。

### 実験モデルの作製

- (1) 生後8週齢、体重20gの雌性C57/BL6マウスを用いる。
- (2) MCT 80mg/kgを腹腔内投与する。約4週間で肺高血圧マウスモデルが完成する。
- (3) 動物実験施設にて飼育する。

### 骨髄細胞の採取と単核球層の分離

- (1) ドナーとして生後8週齢、体重20gの雌性C57/BL6マウスを用いる。
- (2) 同マウスに十分に麻酔を施し迅速に大腿骨、脛骨を摘出後安楽死せしめる。
- (3) 採取した骨髄を遠心法にて単核球層を分離する。

### 骨髄単核球細胞の移植

- (1) 移植細胞を $1 \times 10^7/0.25\text{ml}$ となるようにPBS浮遊液として調整する。
- (2) 眼窩静脈より経静脈投与を行う。
- (3) 移植後4週間を細胞治療のEND POINTとし、1クールの実験期間を8週間とする。

### 肺内の血管新生因子発現の遺伝学的検索

- (1) 実験開始時、肺高血圧モデル完成時、治療後1週間から1週間ごとにマウス肺を摘出し、液体窒素にて急速冷凍後、ホモゲネイトし、VEGF、VEGF receptor2、 $\beta$ -actin(コントロール)などの遺伝子発現を電気泳動法、ウエスタンブロッティング法を用いることにより測定する。

### 移植細胞のマウス生体内での動態

- (1) 移植予定の骨髄細胞をDi-I(カルボシアニン蛍光)にて染色しておき、移植直後、1日後、1週間後と経時的にレシピエントマウス肺内および全身臓器(脳、肝臓、脾臓、腎臓、肺、心筋および骨髄)、血液中での移植骨髄細胞の存在、動態を確認する。
- (2) また、GFP(Green Fluorescent Protein)マウスをドナーとして使用しGFPをマーカー

として同様に移植細胞のレシピエント体内での局在や動態について検討する。

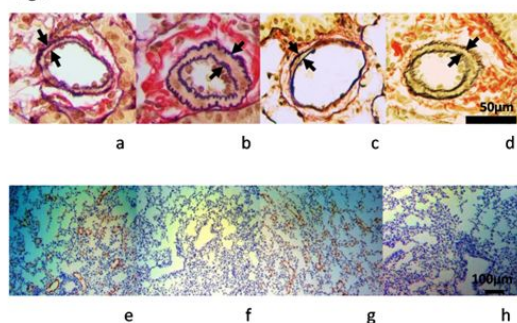
#### 血管新生機序の評価

- (1) 血中サイトカイン測定の結果(液性因子の関与の検討)
- (2) 血管再生因子の発現度
- (3) 移植細胞のマウス生体内での動態

#### 4. 研究成果

(1) MCT 投与 4 週間後には MCT 投与前のコントロール群と比較して右室・左室心筋重量比は  $0.203 \pm 0.02$  から  $0.296 \pm 0.04$  へ ( $p < 0.01$ )、%medial thickness は  $7.5\% \pm 2.2\%$  から  $21.5\% \pm 5.2\%$  へ上昇し ( $p < 0.01$ )、1 視野あたりの肺小動脈数は  $20.9 \pm 4.8$  から  $5.1 \pm 1.7$  に減少し ( $p < 0.01$ )、マウス肺高血圧モデルが完成した。

Fig 1



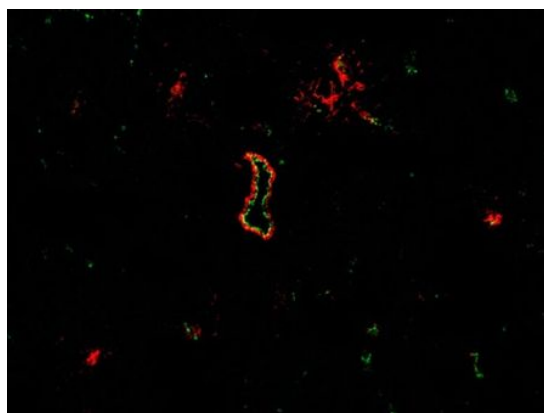
(2) BM-MNCs 移植 4 週間後には右室・左室心筋重量比は  $0.218 \pm 0.01$  へ ( $p < 0.05$ )、%medial thickness は  $7.7\% \pm 2.2\%$  へ改善し ( $p < 0.01$ )、1 視野あたりの肺小動脈数は  $17.1 \pm 2.6$  に増加し ( $p < 0.01$ )、肺高血圧症が改善した。MCT 投与 8 週間後の非移植群では、さらに肺高血圧の増悪を認めた。

(3) 肺における VEGF の発現は、BM-MNCs 移植 1 週間後に著明に上昇したが VEGF receptor-2 の発現には影響はなかった。

(4) BM-MNCs 移植と同時に VEGF receptor-2 拮抗薬投与を行うとその 4 週間後には肺高血圧改善効果は抑制された。

(5) BM-MNCs 移植後の肺組織を EVG 染色で観察すると、肺高血圧コントロール群では肺小動脈中膜の肥厚と周囲の炎症所見が観察された。

(6) BM-MNCs 移植 30 分後の肺組織を免疫染色で観察すると、肺小動脈の内皮細胞近傍に赤色に染色された移植細胞が検出された。



以上より、monocrotaline 誘発肺高血圧モデルにおいて、経静脈的 BM-MNCs 移植により肺高血圧症が改善する。その機序として、細胞移植に伴う肺組織でのパラクリン効果による VEGF の増大と、それによる VEGF-VEGF receptor システムの活性化が最終的に肺小動脈のリモデリングを引きおこし、肺高血圧症を改善すると考えられる。

#### 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 8 件)

Taisuke Nakayama, Takashi Kitaichi, Tetsuya Kitagawa, Gastrointestinal hemorrhage caused by aortoenteric fistula due to aortic aneurysm, Asian Cardiovascular and Thoracic Annals published online, 査読有, Vol.22(5), 2013, 629, DOI: 10.1177/0218492313478434

Kurobe H, Hirata Y, Matsuoka Y, Sugawara N, Higashida M, Nakayama T, Maxfield MW, Yoshida Y, Shimabukuro M, Kitagawa T, Sata M, Protective effects of selective mineralocorticoid receptor antagonist against aortic aneurysm progression in a novel murine model, J Surg Res, 査読有, 185(1), 2013, 455-462, DOI: 10.1016/j.jss.2013.05.002.

Taisuke Nakayama, Hirotsugu Kurobe, Noriko Sugawara, Hajime Kinoshita, Mayuko Higashida, Yuki Matsuoka, Yasushi Yoshida, Yoichiro Hirata, Mie Sakata, Mark Maxfield, Yousuke Takahama, Masataka Sata, Toshiaki Tamaki, Tetsuya Kitagawa, Shuhei Tomita, Role of macrophage-derived Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 as a mediator of vascular remodeling, Cardiovasc Res, 査読有, 2013, 99(4), 705-715, DOI: 10.1093/cvr/cvt146.

[学会発表](計 27 件)

菅野幹雄、菅澤典子、黒部裕嗣、中山泰介、吉田 誉、北市 隆、木下 肇、神原 保、藤本鋭貴、苛原 稔、北川哲也、臍帯血細胞移植は肺高血圧を改善させるか、第44回日本心臓血管外科学会学術総会、2014年2月19日-21日、ホテル日航熊本/熊本県民交流館パレオ/鶴屋ホール(熊本県)

Taisuke Nakayama, Hirotsugu Kurobe, Noriko Sugawara, Hajime Kinoshita, Yasushi Yoshida, Yoichiro Hirata, Mie Sakata, Mark Webster Maxfield, Michio Shimabukuro, Yousuke Takahama, Masataka Sata, Toshiaki Tamaki, Tetsuya Kitagawa, Shuhei Tomita, Macrophage-Specific Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1-Deficient Mice Suppress the Vascular Remodeling and Regulate M2 Macrophage Polarization, American Heart Association AHA 2013, November 16-20, 2013, Dallas Convention Center (USA)

中山泰介、菅澤典子、黒部裕嗣、木下 肇、菅野幹雄、神原 保、藤本鋭貴、北市 隆、粟飯原賢一、宅見央子、東口文治、北川哲也、ヘスペリジンの血管内皮治療への応用、第66回日本胸部外科学会定期学術集会、2013年10月16日-19日、仙台国際センター/東北大学百周年記念会館川内萩ホール(宮城県)

中山泰介、富田修平、黒部裕嗣、菅澤典子、木下 肇、菅野幹雄、神原 保、藤本鋭貴、北市 隆、玉置俊晃、佐田政隆、北川哲也、小口径グラフト開存を目的とするマクロファージ HIF と極性の動脈リモデリング基礎研究、第43回日本心臓血管外科学会学術総会、2013年2月25日-27日、ホテル グランパシフィック LE DAIBA (東京都)

Nakayama T, Kurobe H, Sugawara N, Kinoshita H, Higashida M, Matsuoka Y, Yoshida Y, Hirata Y, Sakata M, Maxfield MW, Shimabukuro M, Takahama Y, Sata M, Tamaki T, Kitagawa T, Tomita S, Role of Macrophage-derived Hif-1 as a Mediator of Vascular Remodeling, American Heart Association AHA 2012, 2012年11月3日-7日、Los Angeles Convention Center (USA)

中山泰介、黒部裕嗣、菅澤典子、東田真由子、吉田恭史、佐田政隆、玉置俊晃、北川哲也、富田修平、小口径グラフト開存性改善を目的とするマクロファージ HIF 制御に関する基礎研究、第42回日本心臓血管外科学会学術総会、2012年4月18日-20日、秋田アトリエ/秋田キャスルホテル(秋田県)

〔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

中山 泰介 (NAKAYAMA, Taisuke)  
徳島大学・大学病院・医員  
研究者番号：80582791

##### (2) 研究分担者

北川 哲也 (KITAGAWA, Tetsuya)  
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号：80240886

菅野 幹雄 (SUGANO, Mikio)  
徳島大学・大学病院・医員  
研究者番号：70563807

##### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：

〔図書〕(計0件)