

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591080

研究課題名(和文) 血管内皮前駆細胞の投与組織環境改善で治療効果の増強を図る次世代型血管新生療法

研究課題名(英文) Next-generation therapeutic angiogenesis by a pharmaceutical pretreatment for the ischemic tissue before an intramuscular injection of endothelial progenitor cells

研究代表者

佐々木 健一郎 (SASAKI, KEN-ICHIRO)

久留米大学・循環器病研究所・講師

研究者番号：70320190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：虚血下肢骨格筋組織は高度の酸化ストレスに暴露しており、そこへ筋注射与された血管内皮前駆細胞の多くが、その血管新生能力を発揮することなく細胞死を迎えていた。虚血性骨格筋細胞のミトコンドリア機能、炎症系血管新生作用タンパク分泌機能、糖エネルギー輸送機能は障害されていた。薬用化学物質プロピオン酸塩をマウス下肢虚血組織に噴霧投与し、低酸素傷害骨格筋細胞の機能回復を図ったところ、血管内皮前駆細胞投与後の血管新生効果が高まる傾向にあり、細胞投与組織の環境改善を図るという次世代型血管新生療法開発への有用なヒントとなった。

研究成果の概要(英文)：Ischemic limb tissue was highly exposed to oxidative stress and a lot of endothelial progenitor cells injected to the tissue were led to apoptosis before playing the role for augmenting neovascularization in mice. The tissue condition impaired the mitochondria function, the neovascularization-related inflammatory cytokine secretory function, and the glucose transport function of the skeletal muscle cell. A pretreatment with the nebulization of propionate, which is a pharmacologic chemical agent with a potential for curing low oxygen-induced mitochondria dysfunction, for the mouse ischemic limb tissue augmented the recovery of blood flow in the limb that was subsequently injected endothelial progenitor cells. This result might be due to a recovery of the impaired functions of the skeletal muscle cell, suggesting a hint for the development of next-generation therapeutic angiogenesis.

研究分野：循環器内科、カテーテル治療、血管新生療法

キーワード：血管新生療法 虚血下肢組織 酸化ストレス 血管内皮前駆細胞 アポトーシス

### 1. 研究開始当初の背景

虚血性末梢血管病の中でも特に従来の治療で改善が見込まれない重症下肢虚血(critical limb ischemia: CLI)状態へ進行している患者は、著しい日常生活制限を強いられるだけでなく、年間8万人以上の対象者が下肢の切断を余儀なくされている。久留米大学では血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell: EPC)の血管新生能力を応用した「自家骨髄細胞移植による血管新生療法」を実施し、数多くの当該虚血下肢を救済してきた。しかしその一方で、約2~3割に効果不十分例を認めている。この問題を解決すべく、「EPCの細胞機能を投与前に増強させることで血管新生療法効果を高める」という新たな治療法の開発研究結果をこれまで報告してきたが、臨床実施に必要な細胞培養センター設立は容易でなく、別の視点での新たな治療法の開発研究を立案した。

### 2. 研究の目的

長期の虚血状態にある骨格筋細胞の恒常性は破綻しており、既存血管由来の側副血行路発達に貢献する血管新生作動タンパクを分泌する機能が障害されている可能性がある。その機能障害は、虚血組織内に投与されたEPCが血管新生能力を発揮する過程にも悪影響を及ぼしている可能性がある。本研究では、「EPC投与組織の環境を改善することで血管新生療法効果を高める」という新たな治療法仮説を検証した。

### 3. 研究の方法

虚血肢切断手術を受けたCLI患者から譲り受けた切断肢組織、下肢虚血動物モデルから採取した虚血下肢組織を用いて、組織内におけるアシルカルニチン蓄積状態(酵素サイクリング法による濃度測定)、酸化ストレス暴露状態(DHE染色法)、骨格筋細胞におけるミトコンドリア機能、血管新生作動タンパク分泌機能(ウエスタンブロット法)、糖エネルギー輸送機能(RT-PCR法)を評価した。

虚血組織における環境変化がEPCにもたらす影響の一つ、細胞死(アポトーシス)をTUNEL染色法で評価した。

低酸素環境でミトコンドリア機能を回復させる薬用化学物質「プロピオン酸塩」をマウス虚血下肢組織(主に骨格筋細胞組織)に反応させ、傷害された骨格筋細胞機能が回復するか否かを評価した。

その機能改善がEPC投与後のマウス虚血下肢における血管新生反応増強に貢献するか否かについて評価した。

### 4. 研究成果

#### 虚血下肢組織の環境変化とEPCへの影響

CLI患者10名(男性3名、女性7名、平均年齢83.9歳)の虚血下肢組織を「虚血部」、「健常部」、「境界部」に分け、各組織内のア

シルカルニチン濃度を測定したが、同じ分類組織内でさえも計測値幅は著しく広く、各分類組織間における虚血の程度との相関性も認められなかった。ラット虚血肢組織でも同様の結果であり、評価困難であると同時に測定法として不相当であった。

マウス虚血組織は高度に破壊されており、DHE染色で酸化ストレス暴露状態が観察された(図1)。ヒト組織は染色不良で評価困難であった。

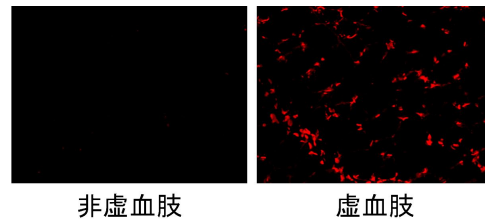


図1: マウス下肢組織のDHE染色像  
酸化ストレスが赤色に染まっている。

EPCに対し、*in vitro*で低酸素負荷、低栄養負荷、酸化ストレス負荷を加えたところ、EPCは酸化ストレス負荷時に最もアポトーシスに陥っていた(図2)。

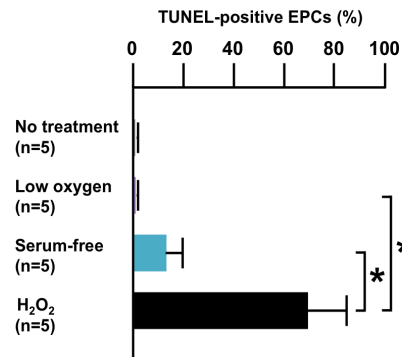


図2: EPCのTUNEL染色陽性率  
酸化ストレス(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)負荷時にEPCのアポトーシス率が有意に高かった(\*: p<0.001)。

マウス下肢虚血組織へEPCを直接投与する*in vivo*実験では、EPCが虚血組織内で高度の酸化ストレスに暴露したためか、その多数がアポトーシスに陥っていた(図3)。

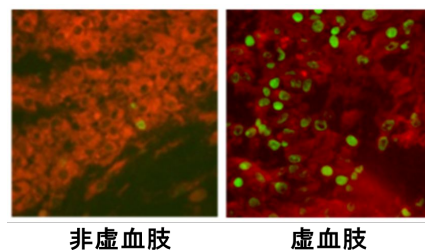


図3: 虚血組織内EPCのTUNEL染色像  
アポトーシスEPCが緑色に染まっている。

### 虚血下肢組織骨格筋細胞の機能変化

マウス下肢虚血組織において cytochrome-C の発現低下 (ミトコンドリア機能障害)、interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、interleukin-6 (IL-6) の発現低下 (炎症系血管新生作動タンパク分泌能障害) を認めた (図 4、左パネル群)。

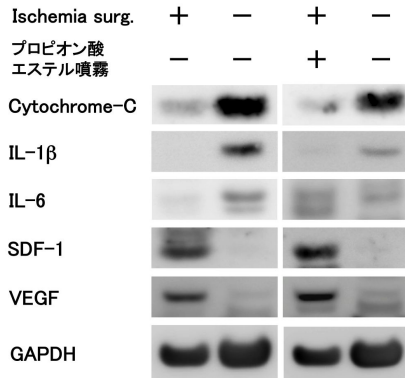
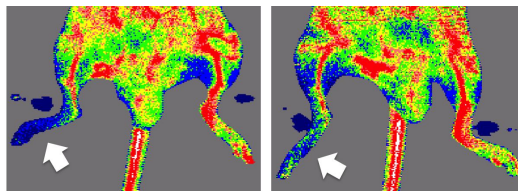


図 4 : マウス下肢組織ウエスタンブロット像

ヒト組織ではこれらの発現が著しく不安定で、評価困難であった。一方、RT-PCR 法では glucose transporter (GLUT)/solute carrier family-2 (SLC2A) の発現低下 (糖エネルギー輸送機能障害) を認めた。

### 虚血組織へのプロピオン酸塩前投与がもたらす血管新生療法効果の変化

マウス片側下肢虚血モデル作製 48 時間後にプロピオン酸塩 (ベクロメタゾンプロピオン酸エステル、市販薬: キュバール) を下肢虚血組織へ直接噴霧投与 (100mg/push、ヒト投与量相当) し、その後、総数 50 万個の EPC を同部へ筋注投与した。14 日後の同組織において、IL-6、stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)、vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現は増強しており (図 4、右パネル群) レーザードップラー法による下肢血流評価では、プロピオン酸塩非投与群に比べ、虚血下肢の血流回復に増強傾向を認めた (図 5)。プロピオン酸が虚血性骨格筋細胞のミトコンドリア機能、その後の血管新生作動タンパク分泌機能回復をもたらしたことが要因の一つと考えられた。



プロピオン酸塩噴霧 (-) プロピオン酸塩噴霧 (+)

図 5 : マウス下肢の血流像

白矢印は虚血下肢を示す。青色は低血流、黄緑色は中程度血流、赤色は高血流を示す。

今回のプロピオン酸塩投与法は統計学的に有意な血管新生増強法とならなかったが、他の投与法 (全身投与や筋注投与など) についての追加検討によって、改良・発展する可能性が示唆された。

### 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. Nakayoshi T, Sasaki K, Kajimoto H, Koiwaya H, Ohtsuka M, Ueno T, Chibana H, Itaya N, Sasaki M, Yokoyama S, Fukumoto Y, Imaizumi T. FOXO4-knockdown suppresses oxidative stress-induced apoptosis of early pro-angiogenic cells and augments their neovascularization capacities in ischemic limbs. PLoS One. 2014; 9: e92626.

[学会発表](計 4 件)

1. The 82<sup>nd</sup> European Atherosclerosis Society Congress (Madrid, Spain, June 1, 2014)

Nakayoshi T, Sasaki K, Imaizumi T, Ueno T, Ohtsuka M, Itaya N, Chibana H, Fukumoto Y. Augmented Neovascularization Capacities of Endothelial Progenitor Cells via Anti-apoptotic Effect by FOXO4 siRNA Transfection in Rats.

2. The 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting (IVBM2014) (Kyoto, Japan, April 16, 2014)

Nakayoshi T, Sasaki K, Imaizumi T, Ueno T, Ohtsuka M, Itaya N, Chibana H, Sasaki M, Fukumoto Y. FOXO4 knockdown augments anti-apoptosis and neovascularization capacities of human early endothelial progenitor cells in rat ischemic limbs.

3. The 19<sup>th</sup> Asian Pacific Society of Cardiology 2013 Congress (Pattaya, Thailand, February 23, 2013)

Nakayoshi T, Sasaki K, Kajimoto H, Koiwaya H, Ohtsuka M, Ueno T, Chibana H, Itaya N, Sasaki M, Yokoyama S, Fukumoto Y, Imaizumi T. FOXO4 knockdown augments anti-apoptosis and neovascularization capacities of human early endothelial progenitor cells.

4. 第 77 回日本循環器学会学術集会 (横浜, 2013 年 3 月 16 日)

Nakayoshi T, Sasaki K, Kajimoto H, Koiwaya H, Ohtsuka M, Ueno T, Chibana H, Itaya N, Sasaki M, Yokoyama S, Fukumoto Y, Imaizumi T. FOXO4 knockdown augments anti-apoptosis and neovascularization capacities of human early endothelial progenitor cells.

〔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：  
出願年月日：  
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

佐々木健一郎 (SASAKI KEN-ICHIRO)

久留米大学・医学部・講師(平成 24-25 年度)

久留米大学・循環器病研究所・講師(平成 26 年度)

研究者番号：70320190

##### (2) 研究分担者

なし( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

なし( )

研究者番号：