

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790735

研究課題名(和文)再生血管に効果的に機能する間葉系幹細胞

研究課題名(英文)Analysis of mesenchymal stem cells for vessel formation

研究代表者

長野 真澄(NAGANO, Masumi)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：30436282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：閉塞性動脈硬化症は下肢切断に至る難治性の疾患である。閉塞性動脈硬化症の患者から侵襲性が軽度である脂肪組織より間葉系幹細胞(AT-MSC)を単離し、将来の組織幹細胞治療を見据えた「治療効果の高い細胞群」の単離同定および機能解析を行った。AT-MSCを投与したマウス虚血足において、AT-MSCはCCL5を発現することによってマクロファージの遊走を増加させ、血管新生に寄与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To compare the abilities of MSC, characterize how those MSC affect the repair of ischemic tissue, vascular occlusion was performed by ligation of the femoral artery and vein. Of note, the blood flow in the ischemic region rapidly increased in mice injected with AT-MSC, as contrasted with mice injected with BM- or DT-MSC. The number of CD45+ and F4/80+ cells at the femoral region was higher in AT-MSC recipients than in recipients of BMMSC or DT-MSC. We evaluated the mRNA expression of angiogenic and migration factors in MSC and found the expression of CCL5 mRNA was higher in AT-MSC than in BM-MSC or DT-MSC. Transplantation of ATMSC with impaired expression of CCL5 clearly showed a significant delay in the recovery of blood flow compared with the control.

研究分野：再生幹細胞生物学

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：間葉系幹細胞 閉塞性動脈硬化症 血管再生

1. 研究開始当初の背景

(1) 手術時に生じる余剰脂肪組織を採取し、間葉系幹細胞 (MSC) を分離培養を試みた。AT-MSC をアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) 活性を指標として発現の有無により分離を試みた。申請者は、先行研究においてヒト臍帯血より血管内皮前駆細胞 (EPC) を単離し、ALDH 活性を指標として血管内皮前駆細胞を分離し、ALDH 活性の低い EPC (Alde-Low) が「治療効果の高い細胞群」であることを、マウス有茎皮弁モデルを用いて証明している。(Nagano et al., Blood, 2007)

(2) 末梢血由来 EPC は樹立が難しく、基礎疾患を有する患者では細胞数が少なすぎて治療に必要な量を確保できない。そこで侵襲性が軽度であり自家移植可能な脂肪組織由来 MSC (AT-MSC) に焦点を絞り、機能的に作用する AT-MSC の単離同定と、血流改善能について動物モデルを作製して他の骨髄由来 MSC (BM-MSC) や歯髄由来 MSC (DT-MSC) と比較して解析を行った。

2. 研究の目的

手術時に生じる余剰脂肪組織を採取し、MSC を分離培養した。AT-MSC を ALDH 活性を指標として発現の有無により分離した。得られた細胞に対して、増殖能・血管形成能解析・遺伝子発現解析を正常酸素状態と低酸素状態における比較を行う。また、血流改善効果の高い細胞群を明らかにするために、マウス下肢動脈閉塞モデルを用いた移植実験を行う。加えて、血流改善効果において有意差が見られた AT-MSC および他の MSC に対して分子生物学的解析を行い、どの因子が MSC の血流改善に効果に働いたのかを解析した。

3. 研究の方法

(1) インフォームド・コンセントを得た糖尿病等の内科的疾患を合併しない患者より、手術時に発生する余剰脂肪組織を採取し、MSC を単離培養した。得られた細胞が MSC であることの証明は、骨、脂肪、軟骨への分化能を有していることを確認する *in vitro* 分化能解析により行った。継代維持可能となった AT-MSC に対して ALDH 活性、あるいは CD349 抗体によりそれぞれ細胞分離を行った。ALDH 活性を認識する Aldefluor 試薬を用いて、ALDH 活性陽性 AT-MSC と ALDH 活性陰性 AT-MSC に分離する。分離した細胞は 14 日後に ALDH 活性を維持しているかどうか、再度 Aldefluor 試薬で確認した。ALDH 活性を保持していない場合は、再度 ALDH 活性陽性 AT-MSC を細胞分離した。

マウス下肢動脈閉塞モデルによる血流改

善能解析

虚血改善効果の判定はマウス下肢虚血モデルを用いて行った。マウスには 2 日前から Cyclosporin-A を投与し免疫抑制処理を継続した。マウス大腿動脈を単径部から膝関節付近までの範囲で血管を結紮・切除した。対側はコントロールとして用いるので、処理しなかった。翌日、マウス 1 匹辺り 5×10^5 個の AT-MSC・BM-MSC・DT-MSC あるいはネガティブコントロールして細胞を含まない PBS を調製し、血管を切除した部位に 4 ヶ所筋肉注射にて細胞を移植する。ポジティブコントロールとして、当研究室で樹立した血管内皮前駆細胞 (EPC) を使用した。血流は後脛骨動脈を、細胞投与日、1, 3, 5, 7, 10, 14 日目に測定し、健常足に対する処置足の血流比を比較検討した。

MSC 移植後の新生血管の解析

MSC 移植 14 日後のマウスに対して、血管壁を染める Banderiraea simplicifolia Lectin I-TRITC を尾静脈より注入し、凍結切片を作製した。蛍光顕微鏡下の観察から、新生血管数をカウントし解析を行った。観察はランダムに選出した 3 切片から行い、それぞれ 10 視野を観察し集積した細胞数を算出した。MSC をあらかじめ GFP (蛍光色素蛋白質) により標識し、マウス下肢動脈閉塞モデルを作製し移植した。移植後 7 日目に大腿部をコラゲナーゼ処理し、GFP 陽性細胞を FACS を用いて分離し遺伝子発現解析を行なった。

(2) MSC がどのようなメカニズムで血流改善に働くかを明らかにする

血流改善能を有する MSC と有しない MSC との間において、マイクロアレイ解析を行い、候補遺伝子を選別した。

得られた候補遺伝子について、Real time PCR 法により発現量に有意差が認められることを確認した。

候補遺伝子に対して、shRNA を用いてノックダウンした AT-MSC を作成し、マウス下肢動脈閉塞モデルを用いて機能解析を行った。

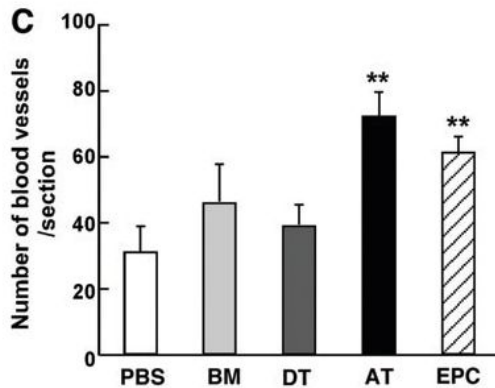
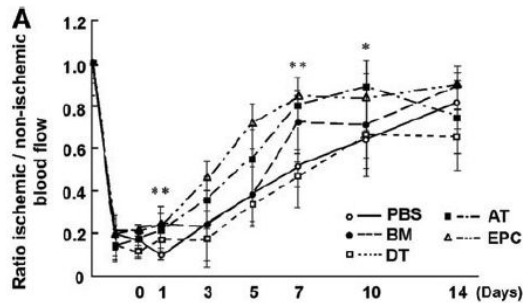
4. 研究成果

(1) AT-MSC を ALDH 活性により分離し、14 日後に再度検証を行ったところ、ALDH 活性は不変的ではないことが明らかとなった。流動的な酵素活性をもとに実験を進めるのは得策ではないと考えた。

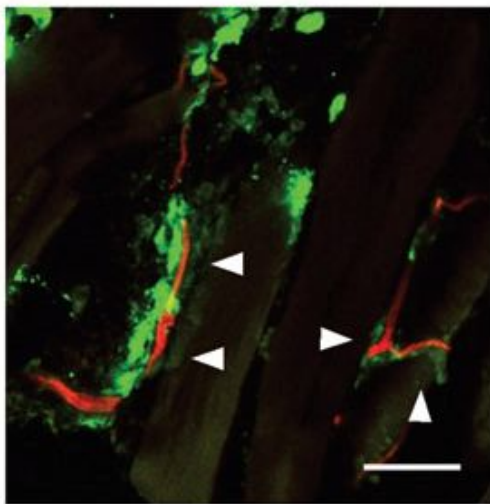
次に、AT-MSC, BM-MSC, DT-MSC の 3 群間で比較検討した。

In vitro での分化能は 3 群に差は見られなかったが、マウス下肢動脈閉塞モデルにおいて AT-MSC は他の MSC と比較して有意に虚血を改善することが明らかとなった。血管数も AT-MSC は他の MSC と比較して有意に増加して

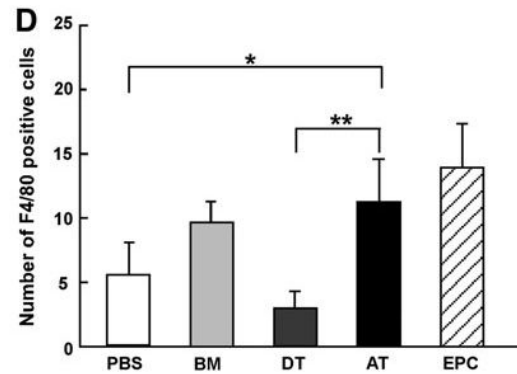
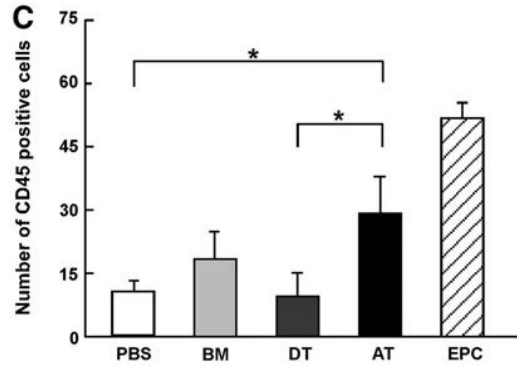
いた。



血管内皮のマーカである CD31 と GFP で着色した AT-MS C の蛍光写真より、AT-MS C は血管内皮にはならず、血管周囲に分布していた。



(2)AT-MS C 移植群ではマクロファージの遊走が多く、これが血流改善の一因であると考えた。



どの因子が、AT-MS C の虚血改善能に働くのかについて調べた。AT-MS C ではマクロファージの遊走に関わる CCL5 が他の MS C に比較して高く、かつ CCL5 の発現を減弱させた AT-MS C がコントロール群と比較して、虚血改善効果が低下することが明らかとなった。AT-MS C により産生される CCL5 が、骨髄からマクロファージを動員して虚血改善に働い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4件)

Kimura K, Nagano M, Salazar G, Yamashita T, Tsuboi I, Mishima H, Matsushita S, Sato F, Yamagata K, Ohneda O. The role of CCL5 in the ability of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to support repair of ischemic regions. *Stem Cells Dev.* 23. 2014. 488-501. 査読有
DOI: 1089/scd.2013.0307

Mukai HY, Suzuki M, Nagano M, Ohmori S, Otsuki A, Tsuchida K, Moriguchi T, Ohneda K, Shimizu R, Ohneda O, Yamamoto M. Establishment of erythroleukemic GAK14 cells and characterization of GATA1 N-terminal domain. *Genes Cells.* 18. 2013. 886-98. 査読有

Fukuda S, Nagano M, Yamashita T, Kimura K, Tsuboi I, Salazar G, Ueno S, Kondo M, Kunath T, Oshika T, Ohneda O. Functional endothelial progenitor cells selectively recruit neurovascular protective monocyte-derived F4/80(+)/Ly6c(+) macrophages in a mouse model of retinal degeneration. Stem Cells. 31. 2013. 2149-61. 査読有
DOI: 10.1002/stem.1469

Akimoto K, Kimura K, Nagano M, Takano S, To'a Salazar G, Yamashita T, Ohneda O. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells inhibit, but adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote, glioblastoma multiforme proliferation. Stem Cells Dev. 22. 2013. 1370-86. 査読有
DOI: 10.1089/scd.2012.0486

[学会発表](計6件)

秋本恵子, 木村健一, 長野真澄, 山下年晴, 高野晋吾, 大根田修. ヒト間葉系幹細胞のグリオブラストーマ増殖抑制に対する作用機構解明. 第12回日本再生医療学会総会 2013.3.21, パシフィコ横浜 横浜

加藤俊貴, 木村健一, 長野真澄, 山下年晴, 秋本恵子, 三島初, 大根田修. ステロイド薬投与による脂肪組織由来間葉系幹細胞への影響. 第12回日本再生医療学会総会 2013.3.21 パシフィコ横浜 横浜

小林里美, 山下年晴, 長野真澄, 木村健一, 坪井一輝, 大根田修. Hypoxia inducible factor-3a regulates its target genes in association with HIF-1a and HIF-2a. 第10回 がんとハイポキシア研究会 2012.12.6 横浜開港記念館 横浜

白石章, 木村健一, 長野真澄, 山下年晴, 坂東裕子, 原尚人, 大根田修. HIF-1a expression in ALDH-positive breast cancer is involved in cancer progression. 第10回 がんとハイポキシア研究会 2012.12.6 横浜開港記念館 横浜

坪井一輝, 山下年晴, 木村健一, 小林里美, 長野真澄, 大根田修. Deficient expression of HIF-2a in endothelial cell cause upregulation of HIF-1a and compensatory angiogenesis. 第10回 がんとハイポキシア研究会

2012.12.6 横浜開港記念館 横浜
小林里美, 山下年晴, 長野真澄, 木村健一, 大根田修.
肺由来血管内皮細胞における低酸素応答転写因子 HIF-3a の機能解析
第35回 日本分子生物学会年会
2012.12.12 福岡国際会議場・マリンメッセ
福岡 福岡

[その他]
ホームページ等
<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/emed/stemcell/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長野 真澄 (NAGANO, Masumi)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号: 30436282