

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460914

研究課題名(和文) 組織内性幹細胞を標的とした末梢動脈疾患治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel angiogenic therapy with adult tissue stem cells in peripheral artery disease

研究代表者

磯 良崇 (Iso, Yoshitaka)

昭和大学・スポーツ運動科学研究所・准教授

研究者番号：60384244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSC)は骨髄のみでなく様々な組織に分布していることが明らかとなり、我々含め骨格筋組織内においても同定した。本研究では、骨格筋MSC活性化を応用した末梢動脈疾患治療の開発を目指し、その細胞特性の検討を行った。骨格筋MSCは、骨髄由来と同様の幹細胞特性を有するがより向血管新生能が優れていることが示され、エリスロポエチンにより活性化することも明らかとなった。一方で、FGF-23はMSC細胞老化を誘導し負に制御することが明らかとなった。これら慢性腎臓病関連サイトカインの制御による骨格筋MSC活性化は新規血管新生治療になり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) are present in all adult tissues including bone marrow and skeletal muscle. Aim of this study was to investigate stem cell properties of MSCs from skeletal muscle for development of a novel angiogenic therapy in peripheral artery disease (PAD). Properties of proliferation and differentiation in the MSCs were similar to bone marrow MSCs, whereas pro-angiogenic property in muscle MSCs was superior to the bone marrow cells. The angiogenic potential was activated by erythropoietin. Fibroblast growth factor (FGF)-23 induced cellular senescence of the muscle MSCs via oxidative stress/p53/p21 pathway. PAD is prevalent in patients with chronic kidney disease (CKD). Thus, results of this investigation suggested that disruption of productive balance of those factors in the CKD deteriorated the muscle MSC function. Activation of muscle MSCs via regulation of CKD-related cytokines may become a new therapeutic strategy for PAD.

研究分野：循環器内科学

キーワード：末梢動脈疾患 間葉系幹細胞 血管新生 骨格筋 エリスロポエチン FGF-23

1. 研究開始当初の背景

(1) 下肢末梢動脈疾患は、心・脳血管病合併により予後不良なことが知られている (TASC-II, J Vasc Surg 2007)。Hirsch ら (JAMA 2001) が末梢動脈疾患診療の重要性を強調した通り、その後、人口の高齢化や糖尿病・慢性腎臓病の増加に伴い、その罹患率および重症例が増加し、高齢者医療において重要な課題のひとつとなっている。また、血行再建術ならびに運動療法が主な治療法であるが、重症例や難治例に対しての新規治療法の開発が必要となっている。

(2) 末梢動脈疾患への自家骨髄単核球移植による血管新生治療は、世界に先駆けて本邦で実施され、有効性が示された (Lancet 2002)。申請者は、自施設において同治療法を実施し、移植細胞中の幹・前駆細胞量が長期下肢予後に影響し、新鮮分離細胞を用いる本法では幹・前駆細胞数の個人差を解消できず、治療効果に差が生じることを報告した。この結果より、新規の血管新生治療の開発が必要であることが認識され、申請者は改良点を明確にするため、基礎検討により移植効果の機序の解析を行った。ラット下肢虚血モデルにおいて、骨髄細胞移植により血管周囲間質組織において増殖活性を示す細胞の増加を認めた。それら増殖細胞は、免疫染色により、骨格筋芽細胞ではなく PDGF 受容体陽性の骨格筋間葉系幹細胞 (MSC) であることが分かった。移植細胞などの外的刺激によりホストの組織内在性幹・前駆細胞が活性化され、血管新生を含めた内因性再生機構が賦活化される可能性が考えられた。

(3) MSC は、従来、骨髄に存在し恒常性の維持に関与していることが広く知られていたが、最近になり、他の臓器でも内在され同様の性質をもつことが明らかになってきた。骨格筋組織内の MSC も報告され、その骨格筋 MSC は PDGF 受容体陽性であり、主に血管周囲間質組織に局在し、筋変性疾患

の病態に関与していることが明らかとなった (Uezumi et al. Nat Cell Biol 2010)。

申請者らは、骨格筋 MSC が骨髄 MSC と比較して血管新生因子の発現が高いことを予備試験で確認しており、末梢動脈疾患において、骨格筋 MSC の機能が低下し、病態増悪に関連していると考えられた。すなわち、骨格筋 MSC の機能低下因子および活性化因子を探索することが新規治療の開発につながると考えられた。

2. 研究の目的

骨格筋 MSC 活性化を介した内因性再生機構賦活化による新規虚血肢治療法は、血管新生のみならず自己周囲の骨格筋再生・微小環境修復も促進することが推測され、従来の血管新生治療にはない骨格筋の機能・代謝面での効果も期待される。

本研究は、骨格筋 MSC の機能低下因子および活性化因子の探索が主目的とする。また、同定した活性化因子の *in vivo* での効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋 MSC の採取、培養、機能評価：

(採取) ラット細胞・大腿骨格筋を採取し、組織を細断・コラゲナーゼ処理し、細胞成分を分離。比重遠心法で単核細胞を単離し、プラスチック接着法で採取する。ヒト細胞・インフォームドコンセントの下、整形外科手術時に少量の骨格筋組織を採取し、ラット細胞と同様の手順で細胞を得る。(培養) 基本培地 MEM と 20% FBS で培養を行う。当該研究室で標準化されたプロトコールに沿って培養を行う。(細胞機能評価) 1. 多分化能：骨・脂肪・軟骨。2. 細胞老化：増殖能評価・細胞老化関連分子発現検討。3. 細胞生存能：ストレス環境下培養、アポトーシス評価。4. 血管新生因子産生能：ELISA 法による培養上清中の VEGF・HGF 濃度測定。

(2) MSC機能活性化因子・抑制因子の探索：骨格筋MSCと骨髄MSCの網羅的遺伝子発現解析を行い、受容体発現の差異から骨格筋MSCに特異的に作用し得るサイトカインやケモカインの候補を同定する。

以下の評価項目を用い、候補因子の骨格筋MSCに対する効果を検討する。1. 多分化能：骨・脂肪・軟骨。2. 細胞老化：増殖能評価・細胞老化関連分子発現検討。3. 細胞生存能：ストレス環境下培養、アポトーシス評価。4. 血管新生因子産生能：ELISA法による培養上清中のVEGF・HGF濃度測定。

(3) 下肢虚血モデルにおける骨格筋MSCを標的とした血管再生治療：(ラット下肢虚血モデル)ラット右大腿動脈を外科的に結紮し、虚血下肢を作成する。治療群では、骨格筋MSC移植やMSC活性化因子投与を行う。モデル作成直前後、1, 2週後までレーザードップラー血流計により定量的に血流評価を行ない、治療効果を判定する。(筋組織の病理組織学的検討)14日後に組織学的評価を行なう。免疫組織染色法により新生血管数 筋組織内増殖細胞数 骨格筋MSC動態の評価を行う。

4. 研究成果

(1) 骨格筋MSC特性

虚血筋組織における骨格筋MSCの動態や病態への関与は不明のため、右大腿動脈結紮によるラット下肢虚血モデルで検討を行った。レーザー血流計の評価では、このモデルは、動脈結紮直後から虚血作成後1週にかけて下肢血流は自然回復し、2週まで維持される。MSCはPDGF受容体陽性であるため、免疫染色によりPDGF受容体陽性細胞を検索したところ、健常下肢では骨格筋間質にごく僅かに散見される程度であったが、虚血1週後ではその数は増加し間質内に集簇している所見が見られ、2週後では再び減少していた。また、二重免疫染色により、PDGF受容体陽性細胞は血管内皮増殖因子(VEGF)を産生して

いることが示された。

ラット・ヒト骨格筋組織よりMSCを単離した。形態は骨髄由来細胞と同様に線維芽細胞様で、増殖能・分化能は骨髄由来細胞と同様であった。受容体の遺伝子発現解析では、線維芽細胞増殖因子(FGF)受容体1-4とエリスロポエチン受容体の発現を認めた。

(2) 骨格筋MSCの向血管新生能

虚血回復過程において、MSCは反応性に増殖しVEGFを産生して血管新生を促進している可能性が考えられた。そのため、向血管新生能を検証するため、培養実験での検討を行った。培養上清中のVEGF濃度を測定したところ、骨格筋MSCはVEGFを産生・分泌しており、骨髄由来MSCおよび骨格筋細胞と比べてもその濃度は有意に高値であった。培養血管内皮細胞を用いたin vitro血管新生アッセイで、骨格筋MSC由来液性因子は、コントロール培地と比較し、有意に内皮細胞管腔形成を促進した。

in vivoでの血管新生能を評価するため、ラット下肢虚血モデルに培養骨格筋MSCの細胞移植を実施した。組織学的検討で、細胞移植群では、非移植群と比し、有意な新生血管数の増加を認めた。

また、エリスロポエチン受容体発現を認めたため、培養骨格筋MSCをエリスロポエチンで刺激したところ、細胞増殖が促進され、VEGF遺伝子発現が亢進した。ラット虚血筋組織への直接エリスロポエチン製剤投与では、PDGF受容体陽性細胞の増殖ならびに血管再生促進が認められた。

(3) 骨格筋MSC機能抑制因子

骨格筋MSCではFGF受容体発現を広く認め、FGFにより機能制御されていることが想定された。FGF-2ならびにFGF-23で培養骨格筋M

SCを刺激したところ、FGF-23が機能抑制因子であることが示された。

MSCではAngiotensin (Ang)-IIタイプI受容体発現も認められたため、FGF-23とAng-IIが細胞に与える影響を検討した。無血清培地(control)にAng-II(0.1 μ M)もしくはFGF-23(10ng/ml)を48時間刺激し比較したところ、FGF-23群で、controlと比較し有意にMSC細胞数が減少していた。Ang-II群では、統計的に有意な減少を認めなかった。老化関連gal染色で細胞老化を検討したところ、FGF-23は、有意に老化MSC数を増加させた。ウェスタンブロットでは、FGF-23により細胞老化因子であるp53とp21発現亢進を認めた。免疫染色でp53の核内移行が確認された。酸化ストレスを示すNOX2遺伝子の発現亢進および抗酸化を示すMnSOD遺伝子の発現低下も認めた。

末梢動脈疾患症例の骨格筋組織の病理標本で免疫染色を行ったところ、脂肪浸潤部位において、核内p53陽性を示すPDGF受容体陽性MSCの存在が同定された。

(4)まとめと今後の展望

末梢動脈疾患・虚血肢モデルにおいて、これまで血管新生因子や細胞移植による筋内微小血管を標的とした血管新生治療が試みられてきたが、本研究では、骨格筋に内在するMSCを介した内因性再生機構賦活化による新規虚血肢治療法の開発を目指した。

本研究において、骨格筋MSCは、骨髄由来と比較してもVEGF産生能が高く向血管新生能を有していることを初めて明らかにし、エリスロポエチンがその細胞機能を活性化することを示した。一方、FGF-23は、細胞内酸化ストレス亢進/p53/p21経路を介して骨格筋MSCの細胞老化を誘導し、負の制御因子であることも明らかにした。

骨格筋MSCは、血管新生治療の新たな細胞源・治療標的となる可能性が示された。また、慢性腎臓病の病態に関連するサイトカインが骨格筋MSC機能を修飾することが明らかとなった。慢性腎臓病において、エリスロポエチンは産生低下しFGF-23は産生亢進となる。慢性腎臓病では末梢動脈疾患の合併が多いが、その原因に、サイトカイン産生環境による骨格筋MSC機能低下が関わっていることが示唆され、これらサイトカインの制御が治療につながる可能性が考えられた。

今後も、骨格筋MSCの細胞特性を追求することは、治療応用の可能性を開くとともに、末梢動脈疾患の病態本体を明らかにすることにつながると思う。

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 11 件)
主たるもの6件

Sato C, Iso Y, Mizukami T, Otabe K, Sasai M, Kurata M, Sanbe T, Sekiya I, Miyazaki A, Suzuki H. Fibroblast growth factor-23 induces cellular senescence in human mesenchymal stem cells from skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;470:657-662. 査読有

Mizukami T, Iso Y, Sato C, Sasai M, Spees JL, Toyoda M, Umezawa A, Miyazaki A, Suzuki H. Priming with Erythropoietin Enhances Cell Survival and Angiogenic Effect of Bone-Marrow Mesenchymal Stem Cell Implantation in Rat Limb Ischemia. *Regenerative Therapy* 2016;4:1-8. 査読有

Iso Y, Suzuki H. Exercise therapy for intermittent claudication in peripheral artery disease. *E-Journal of Cardiology Practice of the European Society of Cardiology*. 2015;13:N4. 査読有

Usui S, Iso Y, Suzuki H, et al. (他7名) Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow

Enhance Neovascularization and Stromal Cell Proliferation in Rat Ischemic Limb in the Early Phase after Implantation. The Showa University Journal of Medical Sciences. 2014;26:121-129. 査読有

磯 良崇, 鈴木 洋: 末梢動脈疾患の新規治療標的としての骨格筋間葉系幹細胞. 「JJCR (日本心臓リハビリテーション学会誌)」2014;19:61-64. 査読有

Suzuki H, Iso Y. Clinical application of vascular regenerative therapy for peripheral artery disease. Biomed Res Int. 2013;2013:179730 査読有

〔学会発表〕(計 16 件)
主だったもの6件

C Sato, Y Iso, H Suzuki, et al. Fibroblast Growth Factor-23 Induces Cellular Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells from Skeletal Muscle Independently of Klotho Pathway. American Heart Association Scientific Sessions 2015 (Orlando (米国) 2015年11月)

磯 良崇, 小和板仁, 梅澤明弘, 鈴木 洋. 血管再生医療における骨髄間葉系幹細胞の有用性と補完治療としての運動療法の可能性. 第21回日本心臓リハビリテーション学会学術集会シンポジウム8 (福岡, 2015年7月)

佐藤千聡, 磯 良崇, 鈴木 洋ほか. Fibroblast growth factor-23による骨格筋間葉系幹細胞の細胞老化誘導. 第5回日本腎臓リハビリテーション学会学術集会「Young Investigator Award (YIA) 優秀賞」(東京, 2015年3月)

水上拓也, 磯 良崇, 鈴木 洋ほか. エリスロポエチンは間葉系幹細胞の向血管新生能を修飾する. 第14回日本再生医療学会学術集会 (横浜, 2015年3月)

Mizukami T, Iso Y, Suzuki H et al. Priming with Erythropoietin Enhances Survival and Pro-Angiogenic Properties in Mesenchymal Stem Cells. American Heart

Association Scientific Sessions 2014
(Chicago (米国) 2014年11月)

磯 良崇, 鈴木 洋. 末梢動脈疾患の新規治療標的としての骨格筋間葉系幹細胞. 第19回日本心臓リハビリテーション学会学術集会シンポジウム6 (仙台, 2013年7月)

〔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:
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

磯 良崇 (Iso Yoshitaka)
昭和大学・スポーツ運動科学研究所・准教授
研究者番号: 60384244

(2) 分担研究者

鈴木 洋 (Suzuki Hiroshi)
昭和大学・医学部・教授
研究者番号: 90266106

(3) 研究協力者

佐藤千聡 (Sato Chisato)
昭和大学大学院医学研究科博士課程
水上拓也 (Mizukami Takuya)
昭和大学大学院医学研究科博士課程
関矢一郎 (Sekiya Ichiro)
東京医科歯科大学