

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293382

研究課題名(和文) 幹細胞と増殖因子徐放剤の併用による成熟血管再生と再生組織“血管化”基盤技術の開発

研究課題名(英文) Development of vascular maturation and vascularization into the regenerative tissue via co-administration of stem cells and control-released growth factors

研究代表者

水野 博司 (Mizuno, Hiroshi)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80343606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、生体内外で作成された再生組織の内部に十分かつ効果的に血管誘導を促すことを目的に、幹細胞と増殖因子の複合体移植による再生血管の成熟化現象の解明、筋膜弁で被覆することにより皮弁化された再生組織への血流増強効果、について研究を実施した。その結果、脂肪組織幹細胞と徐放化塩基性線維芽細胞増殖因子との複合体投与によって、マウス虚血肢モデルおよび糖尿病マウス創傷治療モデルにおいて再生血管の成熟化が確認された。筋膜弁内においても血管の成熟化が確認されたが、再生組織への血管新生増強効果については有意な所見を得るには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Sufficient blood supply into any regenerative tissues and organs is mandatory for their long-time survival. In this study, we sought to determine if (1) co-administration of both stem cells and growth factors may facilitate inducing blood vessel maturation as well as increasing blood supply or vascular density and (2) co-administration of both stem cells and growth factors into the fascia flap which wrapped the beta tricalcium phosphate cube could also augment blood supply in order to regenerate bony tissue. The results showed that (1) maturation of the blood vessel was successfully induced by co-administration of both adipose derived stem cells and control-released basic fibroblast growth factor in both murine ischemic hindlimb model and wound healing model in diabetic mice, and (2) vessel maturation was also confirmed in prefabricated fascial model. However, we have not yet found any significant angiogenesis into the beta tricalcium phosphate.

研究分野：再生医学

キーワード：血管再生 再生医療 幹細胞 増殖因子

1. 研究開始当初の背景

我々は2001年にヒトの皮下脂肪組織中に多分化能を有する幹細胞が存在することを世界で初めて証明し、以来この脂肪組織幹細胞(Adipose-derived Stem Cells、以下ASCs)を用いた軟部組織再生、硬組織再生、神経再生、血管再生など、一貫してこの幹細胞を用い、常に臨床の“出口を見据えた”再生医療研究に従事してきた。しかしながらASCsに限らず、細胞を用いた再生医療の中でこれまで臨床応用された多くは、細胞浮遊液の移植あるいは細胞シート移植であり、3次元的な立体構造を有した再生組織の移植は殆どない。その大きな理由の1つに再生組織への血管導入技術、いわゆる“血管化”がまだ確立されておらず、そのため大きな3次元組織では組織中心部への血流供給が困難なため移植後の壊死を招来してしまう。また3次元組織はもとより、細胞シートといえども血流供給への観点から、現時点でも積層化可能なのは数枚程度と言われており、細胞移植といえども十分な血管導入は必須事項である。かかる状況を打破するため、これまでバイオリアクター培養下での血管(vascular conduit)再生研究や毛細血管レベルでの血管再生研究など行われてきているものの、いずれも臨床応用の見通しは立っていない。従って再生組織への血管導入技術の確立は今後の再生医療を進展させるためにも喫緊の課題であり、言い換えればいかにして組織の隅々まで血管を行き渡らせることができるかであり、再生医療の成功は、再生組織の“血管化”にかかっているといっても過言ではない。

これまで我々が行ってきた基礎研究および前臨床研究において、ASCsの局所投与による皮弁生着域の拡大、組織再灌流障害の改善や、徐放化塩基性線維芽細胞増殖因子(以下徐放化bFGF)の局所投与による組織再灌流障害の改善や創傷治癒の促進効果など、両者がそれぞれに血管再生効果を有することを報告してきたが、いずれも再生される血管の大きさは20~50 μ mと細く、内皮細胞から成る程度の未熟な血管と言わざるを得なかった。しかし我々が独自に開発したマウス重症下肢虚血モデルに両者を同時投与したところ、単独投与で再生された血管の約2~4倍の太さを有し、かつ血管壁周囲にCD146陽性のpericytesを有し、内外弾性板と推測される構造物によって再生血管が厚く極めてしっかりとしたものになること、すなわち“再生血管の成熟化”が起こることを突き止めた。一方で、臨床においては既に我々の研究グループにより、動静脈血管束を皮下に埋入することで血管束周囲の皮膚との血管新生を介した皮弁化(prefabricated flap)技術が確立されているが、我々はこの手法を用いて、ASCsとTCPを用いて作成した構造物に血管導入させた結果、骨組織としての特性を有したまま豊富な血管を有する再生骨組織ができることも報告した。

再生組織の“血管化”に関し、血管束と毛細血管を組織工学的に作成し実施することは究極の血管化と言えるかもしれない。しかしヒトの体には犠牲にしても临床上全く問題ない多くの血管束がいくつも存在するわけであるし、この血管束から再生組織に急速に大量かつ質の良い血管流入を促す技術を構築するほうが実用化に近いだけでなくより自然で生理的な組織内血管再生をもたらすのではないかとこの着想に至った。このコンセプトに基づいた再生組織“血管化”技術に関し詳細に調査した研究報告は申請者らが涉猟しえた限り全くなかった。従って本研究はこれまで我々が実施してきた一連の研究の延長線上にあり、将来の斬新な再生組織血管導入手法の開発につながる、世界を確実にリードする可能性のある非常に有意義な研究と位置づけることが出来ると考えた次第である。

またSuzukiらの報告に示されるごとく、iPS細胞を用いた血管再生効果は高齢者由来のiPS細胞であっても若年者と遜色のない血管再生効果を有することから、本研究でも同様の手法を取り入れることで患者年齢に左右されない結果を生み出すことが期待できる。以上より本研究は、今後の再生医療全般を飛躍的に押し上げ、すべての再生組織臓器の“血管化”に不可欠な基盤(プラットフォーム)技術の確立に繋がる点で意義深いものと思われる。

2. 研究の目的

本研究においては、生体外ないし生体内で作成した再生組織を実用に足るものとすべく、いかにしてそれらを効果的に“血管化”させ、再生組織の隅々まで血流の通う真の“生きた組織再生”となし得るかについて検証することを最終的な目的とする。その手段として、生体内の比較的太い動静脈血管束の近傍に移植した再生組織の周辺に、幹細胞(脂肪組織幹細胞、血管内皮前駆細胞、iPS細胞)と徐放型増殖因子との混合物を移植することで、血管束-再生組織間における血管発芽の量や質、血管の成熟度、そして再生組織に対する流入出血管の量や質を形態学的、組織学的、免疫組織学的、分子生物学的に検証する。こうして得られる知見を礎として、最終的には現在我が国の成長戦略に位置づけられている再生医療を飛躍的に実用化させるため、すべての再生組織臓器の“血管化”に不可欠な基盤技術を確立することにある。

3. 研究の方法

本研究の最終目標は再生組織の隅々まで血流が通り、生きた状態での移植が可能なる再生組織の“血管化”を達成することであり、3か年計画で実施した(最終的には1年間延長)。全体の流れとしてはまず初めにマウス正常下肢および重症虚血下肢モデルにASCsないしEPCsと徐放化増殖因子(bFGF、PRP)

を混合移植し、再生血管の違いを種々の方法で群間比較評価する。次に iPS 細胞由来 EPCs を用いて同様の実験を行い、組織幹細胞による再生血管との質や量の違いについて同様の手法で比較評価する。ラット深下腹壁動静脈を茎とする筋膜弁内に幹細胞 (ASCs、EPCs ないし iPS 細胞由来 EPCs) + 徐放化増殖因子 (bFGF ないし PRP) を混合移植し、再生血管の量、成熟度、階層化、動静脈相への分化の程度を明らかにする。各パターンにおける再生血管の特徴が明らかになったところで、後述する軟部組織再生モデルおよび硬組織再生モデルを用い、幹細胞 - 徐放化増殖因子複合体の投与による、再生組織内および周辺再生血管の量的質的評価について形態学的、組織学的、分子生物学的に検討する。

【重症虚血下肢モデルを用いた幹細胞 - 徐放化増殖因子複合体同時投与における再生血管の“成熟度”評価】

1. マウス重症下肢虚血モデルの作成と幹細胞 - 徐放化増殖因子複合体の投与

図 3 の如くマウス大腿動静脈を完全に抜去し周辺の筋枝を焼灼することで、下肢全体が壊疽に至るまで行かない、ヒト重症虚血肢に近似したモデルを作成した後、マウス由来 ASCs、EPCs および iPS 由来 EPCs と、ゼラチンハイドロゲル封入徐放化 bFGF および PRP を組み合わせたものを大腿部筋内に注入投与する。ASCs および EPCs の調整法は既に報告されたプロトコールに従う (Uysal AC, et al, *Plast Reconstr Surg* 2009, Tanaka R et al, *Diabetes in press*)。マウス iPS 細胞は理化学研究所バイオリソースセンターより供与いただく予定であり、EPCs への分化誘導は Narazaki らの方法に従う (Narazaki G et al, *Circulation* 2008) すなわち、型コーゲンでコーティング加工されたディッシュ使用のもと、分化誘導培地 (10% FBS + 5×10^{-5} mol/L metacapro-ethanol 添加 DMEM) で培養後、EPCs のマーカーである Fetal liver kinase-1 (FLK-1) 陽性細胞を MACS で回収し用いる。重症下肢虚血モデルの対象群として同系マウス正常下肢を用いる。またこれら一連の実験で使用する PRP に含まれる増殖因子の組成を明らかにするため、ELISA を用いて IGF-1、TGF- β 1、HGF、VEGF、PDGF-AB の濃度を測定する。

2. 再生血管の量的および質的評価

幹細胞 - 徐放化増殖因子複合体の局所投与による血流改善全般を非侵襲的に評価するため、移植後 2 週目までレーザードップラー血流計を用いて経時的に血流測定し、健側との血流比を算出して量的評価を実施する。また移植後 2 週目に組織採取し、走査電子顕微鏡による再生血管の太さと配列の微小形態学的観察、抗 CD31 抗体を用いた血管内皮細胞に対する免疫組織学的検索、 α -SMA、デスミンに対するモノクローナル抗体を用いた血管壁細胞 (血管平滑筋細胞 +

pericytes) の評価を行う。とりわけ血管の成熟度の質的評価には抗 VE cadherin 抗体を用いた免疫染色法により評価する。更には共焦点レーザー顕微鏡を用いて、内皮細胞と壁細胞との間の立体構造解析を行う。最後に採取した組織中より Total RNA を抽出し、IGF-1、VEGF、HGF などの血管新生関連遺伝子の発現を qRT-PCR にて定量化する。なお移植細胞の挙動を追跡する目的で一部の実験モデルにおいては、GFP(+)マウス由来 ASCs および EPCs を用い、抗 GFP 抗体を用いた免疫染色を実施することで移植細胞の血管内皮細胞や pericytes への分化の有無や程度を確認する。

【血管付筋膜弁モデルを用いた幹細胞 - 徐放化増殖因子複合体同時投与における主軸血管 - 再生血管間の“階層化”および“成熟度評価”と、再生組織 (軟部組織、骨組織) の“血管化”および組織機能評価】

1. ラット深下腹壁動静脈を茎とする筋膜弁の作成と幹細胞 - 徐放化増殖因子複合体の投与

ラット深下腹壁動静脈を茎とする筋膜弁の挙上は Okuda らの方法に従って行う (Okuda T, et al, *Ann Plast Surg* 2010) 前年度に実施した研究において、どの組み合わせの幹細胞 (ASCs、EPCs、iPS 由来 EPCs) - 徐放化増殖因子 (bFGF、PRP) 複合体が血管再生効果や再血管の成熟化に寄与したかを参考にし、筋膜弁挙上後に同複合体を筋膜内投与し癒着防止吸収性バリアフィルムで周辺組織との血流再開を阻害して元の位置に戻す。術後 2、4 週間目に再度筋膜弁を挙上後、レーザードップラー血流計による血流量の評価、組織採取後の走査電子顕微鏡での微小血管構築の評価、CD31、CD146、 α -SMA、VE cadherin などに対する抗体を用いた免疫染色による再生血管の量的および質的評価を同様に実施する。

2. 筋膜弁主軸血管と末梢再生血管との間で起こる再生血管の“階層化”現象に対する検証

深下腹壁動静脈から筋膜弁末梢へと起こる血管再生が、単なる毛細血管レベルの無秩序なものであるのか、それとも両者の間に細動静脈に代表されるような中等度レベルの再生血管の構築、つまり再生血管の“階層化”が起こり得るのかを主として形態学および分子生物学的に検証する (図 4)

まず形態学的には、免疫染色 (CD146、 α -SMA) による壁細胞の量的増加、走査電子顕微鏡による血管壁の厚みや太さを観察する。分子生物学的には血管の成熟化に必要とされ、血管内皮細胞に発現する受容体型チロシンキナーゼ Tie2 とそのリガンドであり壁細胞から分泌される Angiopoietin-1 (Ang-1) 両者の発現が亢進状態にあるか、また Ang-1 のアンタゴニストである Ang-2 の発現が低下状態にあるかどうかについて Western Blotting で検証する。

4. 研究成果

【重症虚血下肢モデルを用いた幹細胞-徐放化増殖因子複合体同時投与における再生血管の“成熟度”評価】

まず C57BL/6J マウス鼠径部脂肪塊より ASCs を分離精製後、徐放化 bFGF 添加群、非添加群に分けて培養し得られた培養上清中に含まれる種々の増殖因子 (HGF、VEGF、TGF-1) を ELISA 法で計測した。次に C57BL/6J (雄性 12-15 週) マウス下肢虚血モデルを作成し、以下に示す如く虚血下肢大腿に筋肉内投与した。ゼラチンハイドロゲル群 (実験群 1)、ASCs 1×10^6 移植群 (実験群 2)、徐放化 bFGF $30 \mu\text{g}$ 移植群 (実験群 3)、徐放化 bFGF $30 \mu\text{g}$ + ASCs 1×10^4 混合移植群 (実験群 4)、徐放化 bFGF $30 \mu\text{g}$ + ASCs 1×10^6 混合移植群 (実験群 5)。評価方法は経時的肉眼観察およびレーザー Doppler による血流量評価を移植 0, 4, 7 日後に実施した。また移植 7 日後に虚血肢を採取し、組織学的及び免疫学的観察 (SMA、CD31、CD146、TGF-1) を実施した。

その結果、ELISA においては ASCs より放出される増殖因子は徐放化 bFGF の添加により増強された。下肢虚血モデルに対するレーザー Doppler による血流量解析の結果、移植 4, 7 日後において実験群 4 および 5 が他群と比較して有意な血流改善率を認めた。組織学的評価においても実験群 4, 5 は他群と比較して内腔が大きく血管壁も厚く、かつ SMA、CD146、TGF-1 陽性が示す如く申請血管の構造的安定化と成熟化が認められた。以上より、会々下肢虚血モデルにおいて ASCs と徐放化 bFGF の混合移植は単体投与群に比べより効果的な血管再生効果を提供し、かつ新生血管の構造的安定化と成熟化に寄与することが示唆された。

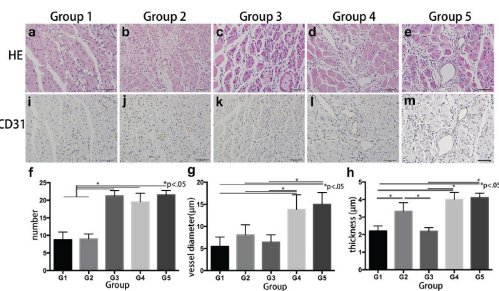


図 1 各群における再生血管の組織評価 混合投与群において再生血管の“成熟化”が認められる

本結果は当初の期待に即したものであったことから ASCs と徐放化 bFGF の使用に特化すべく他の細胞種および増殖因子の使用は留保させることとした。

【難治性皮膚潰瘍モデルを用いた幹細胞-徐放化増殖因子複合体同時投与における創傷

治癒促進効果の検証と組織評価】

糖尿病マウス (BKS.Cg+Leprdb/+Leprdb/Jcl) の鼠径部皮下脂肪より ASCs を準備した。同種同系マウスの背部に直径 9mm の皮膚全層欠損創を作成後、以下に示す投与物に応じて 5 群に分類した。グループ 1: 低用量 ASCs + 徐放化 bFGF、グループ 2: 高用量 ASCs + 徐放化 bFGF、グループ 3: 低用量 ASCs、グループ 4: 徐放化 bFGF、グループ 5: 生理食塩水群。皮膚欠損層のサイズを継続的に観察し、投与後 14 日後に組織採取後評価した。その結果混合投与群 (グループ 1 および 2) において潰瘍の縮小傾向が顕著であった。組織学的観察においても混合と読群においては十分な厚みのある皮下構造とともに連続する重症扁平上皮構造が観察され、各種免疫染色 (CD31、CD146、SMA、型コラーゲン) の結果では申請血管の大きさが大きく、成熟化が示唆された。

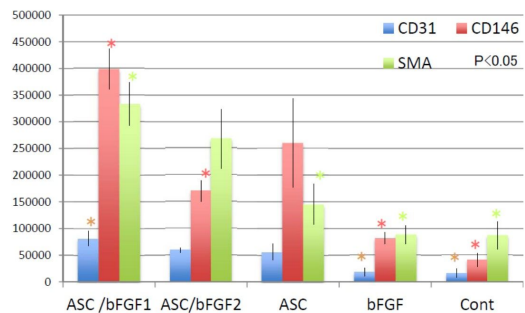


図 2 各群における局所の増殖因子発現 混合移植群において CD31、SMA の発現頻度が高い

【ラット血管付筋膜弁モデルを用いた幹細胞-徐放化増殖因子複合体同時投与における主軸血管-再生血管の階層化及び成熟度評価と、再生組織 (軟部組織、骨組織) の血管化および組織機能評価】

Okuda らの方法 (Okuda, Ann Plast Surg, 2010) に従ってラット深下腹壁動脈を茎とする大きさ約 $3 \times 2 \text{ cm}$ の筋膜弁を作成し、挙上し、上記と同様に筋膜弁にそれぞれ投与物を注入した。筋膜弁を再度元の位置に戻し、周辺との血行を阻害するためシリコンシートで被覆後創閉鎖した。2, 4 週目に組織採取して組織学的に評価した。その結果、各実験群において CD31、CD146、SMA、TGF-1 の発現の程度が異なり、特に SMA、TGF-1 が強く発現するなど定性的に実験群間における差が認められた。しかしながら筋膜弁主軸血管と末梢再生血管との間で起こる再生血管の階層化現象に対する検討は、検体サイズが小さかったことなどの理由から十分な確認はできなかった。再生組織の血管化に関して十分な検証は出来なかった。

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 11 件)

Tajima S, Tobita M, Orbay H, Hyakusoku H and Mizuno H
Direct and indirect effects on bone regeneration of a combination of adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma
Tissue Eng Part A 21: 895-905, 2015 (査読: 有)

Shingyochi Y, Orbay H and Mizuno H
Adipose-derived stem cells for wound repair and regeneration
Expert Opinion on Biological Therapy 15: 1285-1292, 2015 (査読: 有)

Tobita M, Tajima S and Mizuno H
Adipose tissue-derived MSCs and Platelet-rich plasma: Stem cell transplantation methods that enhance stemness
Stem Cells Res Ther 6: 215-221, 2015 (査読: 有)

Oshita T, Tobita M, Tajima S and Mizuno H
Adipose-derived stem cells improve collagenase-induced tendinopathy in a rat model
Am J Sports Med 44: 1983-1989, 2016 (査読: 有)

Horikoshi-Ishihara H, Tobita M, Tajima S, Tanaka R, Oshita T, Tabata Y and Mizuno H
Co-administration of adipose-derived stem cells and control-released basic fibroblast growth factor facilitates angiogenesis in a murine ischemic hind limb model
J Vasc Surg 64: 1825-1834, 2016 (査読: 有)

[学会発表](計 25 件)

Mizuno H
The clinical role of adipose-derived stem cells in facial plastic surgery - today and tomorrow
5th Annual Conference of The Pan Asia Academy of Facial Plastic and Reconstructive Surgery (Bangkok, 2015)

Mizuno H
Direct and/or indirect effect and the role of adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration
Regeneration potential of bone

marrow derived cells used fresh or propagated in clinical settings (Wroclaw, Poland, 2015)

Mizuno H
Role of adipose derived stem cells in tissue repair and regeneration
The 1st Makassar International Conference on Stem Cells and Regenerative Medicine (Makassar, Indonesia, 2016)

Orgun D, Tajima S, Horikoshi-Ishihara H, Tobita M, Oshita T, Tanaka R and Mizuno H
Direct and /or indirect effect and the role of adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration
14th Annual Meeting of International Federation for Adipose Therapeutics and Science (San Diego, CA 2016)

Mizuno H and Karibe A
Multipotency and the secretome: the mechanisms behind the regenerative potential of ASCs
PRS KOREA 2017 (Seoul, South Korea, 2017)

[図書](計 4 件)

Mizuno H and Hyakusoku H
(分担) Fat grafting to the breast and adipose-derived stem cells 「Stem Cells with Fat Transfer in Aesthetic procedures: Science, Art and Clinical Techniques」
Editors: Shiffman MA, Giuseppe AD and Bassetto F 2014; pp557-562, Springer, New York, NY

Mizuno H, Tobita M, Orbay H, Uysal AC and Lu F
(分担) Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine 「Stem Cells and Cancer Stem Cells」
Editor: Hayat MA 2014; 12: pp165-174, Springer, New York, NY

Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Orbay H, Fujimura J, Ono S, Kakudo N, Kusumoto K and Hyakusoku H
(分担) Adipose-derived stem cells in regenerative medicine 「Principle of gender-specific medicine」
Editor: Legato MJ 2017; pp459-479, Elsevier, San Diego, CA

Tajima S, Tobita M and Mizuno H
(分担) Bone regeneration with a combination of adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma 「Adipose Derived Stem Cells: Methods and Protocols, Second

Edition」
Editors: Bunnell BA and Gimble JM
2018; pp261-272, Springer, New York,
NY

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 博司 (MIZUNO, Hiroshi)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号: 8034606

(2) 研究分担者

林 礼人 (HAYASHI, Ayato)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号: 10365645

田中 里佳 (TANAKA Rica)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 70509827

飛田 護邦 (TOBITA Morikuni)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 10599038

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

新行内 芳明 (SHINGYOCHI Yoshiaki)
順天堂大学・医学部・助教

門 真起子 (KADO Makiko)
順天堂大学・医学部・非常勤助教

長谷川 悠 (HASEGAWA Yu)
順天堂大学・医学部・非常勤助手