

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462111

研究課題名(和文) 低酸素プレコンディショニングとApelinの相乗効果による細胞移植治療の向上

研究課題名(英文) Synergistic effects of hypoxic preconditioning with apelin administration on cell-based therapy.

研究代表者

末廣 晃太郎 (SUEHIRO, Kotaro)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10569312

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)：重症下肢虚血に対する細胞移植療法における有効性と安全性に疑いの余地はない。しかし現状、高い治療効果が得られているとは言い難く更なる改良が必要とされる。本研究では、低酸素暴露により機能賦活化した末梢血単核球移植による新生血管誘導に加えて、血管成熟化因子アペリンを投与するハイブリッド治療法の有用性を検証した。検証の結果、低酸素暴露し機能賦活化したマウス末梢血単核球の移植と同時にアペリンを投与することで、虚血下肢において単核球により誘導された新生血管がアペリンによって成熟化することが明らかとなった。本治療法は、比較的低侵襲な新たな治療法として、今後、重症下肢虚血治療に用いられると期待される。

研究成果の概要(英文)：Cell-based therapy for severe hindlimb ischemia is promising in its effectiveness and safety. However, it is necessary to be improved in effects of cell-based therapy for hindlimb ischemia because of its poor therapeutic outcomes. In this study, we investigated if hybrid strategy which is composed by transplantation of preconditioned peripheral blood mononuclear cells and co-administration of apelin was useful therapy for severe hindlimb ischemia. As a result, this hybrid therapeutic strategy resulted in effective maturation of new vessels by cell-based therapy. This strategy will be expected to become novel and low invasive therapeutic approach for severe hindlimb ischemia.

研究分野：血管外科

キーワード：細胞移植治療 下肢虚血 低酸素プレコンディショニング アペリン

1. 研究開始当初の背景

重症下肢虚血に対する細胞移植治療

当教室は長年自己骨髄由来細胞を用いた心血管再生治療に関する基礎研究と臨床研究に携わっている。細胞移植による血管再生治療を開発し、世界初となる重症下肢虚血患者に対する臨床試験で、その有効性と安全性を証明した (Jpn Circ J. 2001. 65: 845, Cell Transplant. 2002. 11: 747)。現在、骨髄幹細胞を含め、末梢血、脂肪組織、心筋細胞など様々な自己組織由来の幹細胞を用いた細胞移植治療は世界中の多くの施設で臨床応用がなされ、虚血組織の血流増加や臨床症状の改善など、その有効性の裏付けがなされている (Lancet. 2002. 360: 427, Circulation. 2003. 107: 2294)。これらの自己組織由来幹細胞を用いた心血管再生治療は難治性重症虚血疾患に対する有望な治療法であり、大きな期待が寄せられている。しかし、現時点で必ずしも十分満足いく治療効果が得られているとは言えない。その理由として、主に虚血組織への移植細胞の生着率の低さと新生血管の未熟性の2つが挙げられる。我々は移植細胞の生着率を上昇させるため、移植する細胞を移植前に低酸素に短時間暴露する方法 (低酸素プレコンディショニング) を考案した。これまでの研究で、低酸素プレコンディショニング後の細胞では、血管成長因子の産生亢進、酸化ストレス抵抗性の獲得、および細胞接着分子発現の上昇により、生着率が向上し、細胞移植治療による血管再生の増加作用を示すことを明らかにした (Cardiovasc Res. 2006. 70: 254)。さらに臨床応用を視野に入れ、より簡便で安全に採取可能な末梢血単核球を用いた実験でも同様の有効性を明らかにし (Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008. 294: H590)、加えて、ラビットを用いた中型動物の実験でもその有効性を証明している (Biochem Biophys Res Commun. 2014. 444: 370)。

血管成熟化とApelin

我々はさらなる治療効果向上のためには、新生血管の成熟も必要であると考え、近年血管成熟に直接関与する因子として同定されたApelinの研究を進めてきた。ApelinはAngiopoietin 1の刺激により血管内皮細胞から分泌され、その受容体であるAPJに結合し、作用する (Biochem Biophys Res Commun. 1998. 251: 471)。また、APJは血管内皮細胞、血管平滑筋を始めとする種々の細胞で発現しており (Regul Pept. 2005. 126: 233)、VEGFでその発現が亢進することが報告されている (Thromb Haemost. 2009. 101: 999)。特に新生血管の血管径の調節作用や構造の安定化作用から、新生血管の成熟化に直接関与する因子として知られている (Blood. 2010. 115: 3166)。低酸素プレコンディショニングにより生着率が向上した細胞移植治療に、Apelinの持つ血管成熟化作用

を加えることで、より高い治療効果が得られる可能性があると考えている。

2. 研究の目的

血管再生治療として細胞移植治療は、世界中で臨床応用がなされ、その有効性と安全性が示されている。しかし、必ずしも満足いく治療効果は得られていない。その原因として明らかにされているのが、「虚血組織での移植細胞の生着率の低さ」と「新生血管の未熟性」である。当教室では、移植細胞に対するex vivoでの低酸素プレコンディショニングが生着率を向上させ、血管新生効果を増強させることを明らかにしてきた。この治療にさらに「新生血管成熟」を付加することで、細胞移植治療効果のさらなる向上が期待できると考えた。そこで近年、血管成熟に直接関与する因子として注目されているApelinの同時投与を行い、細胞移植治療の問題点を同時に解決することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルの作製

本研究には、8-9週齢のオスC57BL/6マウスを用いた。下肢虚血モデルは、左肢大腿動脈を結紮し全ての側副枝を切除することにより作製した。全ての動物実験は、山口大学動物使用委員会の承認を受けて実施した。

(2) 末梢血単核球の単離と低酸素プレコンディショニング

末梢血単核球は、マウス全血からLympholyte-Mammalを用いた比重遠心法により単離した。採取した末梢血単核球は、1ml当たり 2×10^6 個の細胞数になるよう10%FBSを含むRPMI培地で調整した。細胞懸濁液を通常酸素培養条件 (20%酸素) および低酸素培養条件 (2%酸素) で24時間培養し、末梢血単核球における遺伝子発現解析や虚血下肢への移植に用いた。

(3) 大動脈リングアッセイ

切離したマウス胸部大動脈をopti-MEM培地に入れ、培養シャーレ上で0.5mm長になるように大動脈を切断した。opti-MEM培地中で24時間培養後、通常酸素濃度もしくは低酸素濃度で培養した末梢血単核球を含むマトリゲル中に大動脈を埋め込み、さらに $1\mu\text{M}$ のアペリンを含むopti-MEMを添加して培養した。培養7日後に血管平滑筋に対する免疫蛍光染色を実施し、出芽した血管数と成熟した新生血管密度を評価した。

(4) 末梢血単核球の移植と治療効果の検証

通常酸素濃度もしくは低酸素濃度で24時間培養した末梢血単核球を、マウス下肢虚血モデルへ移植した。この際、アペリンも同時

投与 (0.1 μ mol/kg/day ; 腹腔内に 7 日間連続投与) し、末梢血単核球移植とアペリンの同時投与の下肢虚血治療の有効性について検討した。

(5) 統計解析

他群間比較には one-way ANOVA、2 群間比較には Student's t-test を用い、すべての統計解析には STATA software を用いた。P<0.01 もしくは P<0.05 を統計的に有意な差とした。

4. 研究成果

(1) 低酸素プレコンディショニングの末梢血単核球に対する効果

これまでに我々は、末梢血単核球を短時間低酸素に暴露すると、血管新生因子や細胞接着因子の発現が増加し、結果として細胞の機能賦活化が誘導されることを見出している。本研究では、機能賦活化した末梢血単核球の移植と同時に血管成熟化因子であるアペリンを投与することを計画した。本アプローチは、細胞移植により増加した未成熟な新生血管に対する成熟効果を狙ったものであるが、そもそも、アペリンが末梢血単核球に対しても影響を与えるか否かの報告はこれまでにない。そこでまず、末梢血単核球におけるアペリンレセプター (APJ) の発現について、通常酸素条件および低酸素培養条件のそれぞれについて検証した。その結果、驚いたことに、末梢血単核球においても APJ の発現が認められ、さらにその発現レベルは低酸素プレコンディショニングによりさらに増加することがわかった (Fig.1)。このことは、アペリンが血管成熟化のみならず移植した末梢血単核球に対しても何らかの作用を及ぼすことを示唆している。

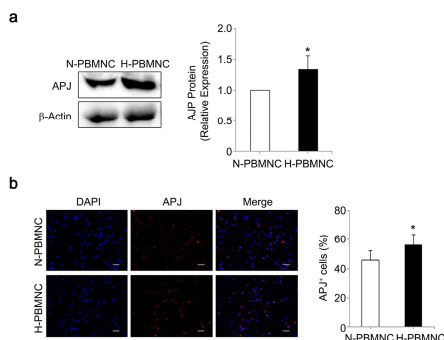


Fig.1. 低酸素刺激の末梢血単核球にアペリンレセプター発現に対する作用
低酸素プレコンディショニングは末梢血単核球におけるアペリンレセプター (APJ) 発現を増加させる。
(a) :ウエスタンブロットによる検証、(b) :免疫蛍光染色による検証。
N-PBMNC : 通常培養した末梢血単核球、H-PBMNC : 低酸素培養した末梢血単核球

(2) 大動脈リングアッセイによる末梢血単核球とアペリン同時投与の効果の検証

末梢血単核球とアペリンの同時投与方法の効果を明らかにする為に、マウス胸部大動脈を用いたリングアッセイを実施した。マウス

大動脈リングを、末梢血単核球 (通常酸素濃度で培養した群と低酸素濃度で培養した群) を含むマトリゲルに包埋し、アペリンを含むもしくは含まない培地中で培養し、7 日後に新生血管数および成熟血管数を評価した。その結果、【アペリン + 低酸素培養末梢血単核球の群】において新生血管数および成熟血管数の有意な増加が認められた (Fig. 2)。このことは、本研究の仮説、「機能賦活化末梢血単核球移植とアペリンの同時投与により虚血部において成熟した多数の血管が得られる」を強く示唆する結果であり、さらに *in vivo* での検証を行った。

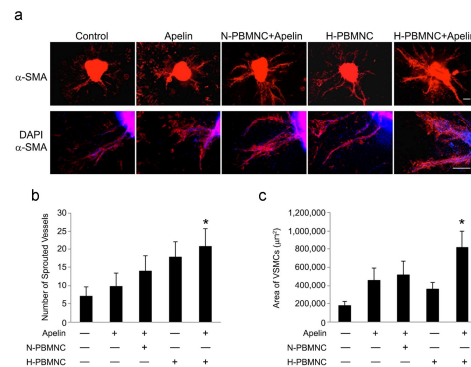


Fig.2. 大動脈リングアッセイによる検証
低酸素プレコンディショニングとアペリンの存在下では、血管新生および血管成熟化が促進される。(a) α -SMAは血管平滑筋のマーカーであり、成熟血管を示す。(b) 新生血管数、(c) 成熟血管密度。*p<0.05 vs PBS.

(3) マウス下肢虚血モデルへの末梢血単核球とアペリンの同時投与

末梢血単核球とアペリンの同時投与の効果を *in vivo* で検証する為に、マウス虚血下肢へ低酸素暴露もしくは通常培養した末梢血単核球を移植し、さらにアペリンを腹腔内投与した。下肢虚血誘導 28 日後に、下肢骨格筋を採取し、薄切片において成熟血管数を比較検討したところ、予想通り、*in vivo* においても同時投与群において高い成熟血管形成効果が得られた (Fig.3)。

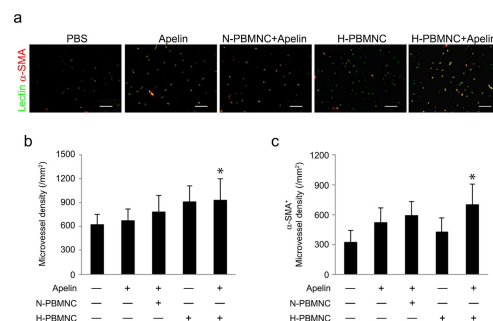


Fig.3. マウス下肢虚血モデルへの末梢血単核球とアペリンの同時投与
低酸素プレコンディショニングとアペリンの存在下では、虚血下肢においても血管新生および血管成熟化が促進される。(a) 細胞移植後の筋切片、(b) 新生血管数、(c) 成熟血管密度。*p<0.05 vs PBS.

(4) まとめ

本研究では、我々がこれまでに進めてきた「低酸素暴露により機能賦活化した末梢血単核球移植による下肢虚血治療法」をさらに

発展させるべく、未熟な新生血管の成熟化誘導を試みた。結果として、血管成熟化因子アペリンとの併用効果は期待通りであり、実臨床への応用も近い成果と言える。しかし、その分子作用機序は不明な点も多く、今後、詳細な検討を行うことでより確度の高い治療法の開発へと結び付けていきたい。

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)

Samura M, Morikage N, Suehiro K, Tanaka Y, Nakamura T, Nishimoto A, Ueno K, Hosoyama T, Hamano K. Combinatorial Treatment with Apelin-13 Enhances the Therapeutic Efficacy of a Preconditioned Cell-Based Therapy for Peripheral Ischemia. Sci Rep. 2016. 6: 19379. DOI: 10.1038/srep19379. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

佐村 誠、森景則保、田中裕也、上田晃志郎、原田剛佑、山下 修、村上雅憲、末廣晃太郎、濱野公一 「細胞移植血管新生療法における Apelin の相乗効果」第 55 回日本脈管学会総会 2014 年 10 月 30-11 月 1 日 倉敷市芸文館 (岡山県・倉敷市)

〔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

末廣 晃太郎 (SUEHIRO, Kotaro)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10569312

(2) 研究分担者

濱野 公一 (HAMANO, Kimikazu)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60263787

細山 徹 (HOSOYAMA, Tohru)

山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20638803

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし