

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462339

研究課題名(和文) 高濃度酸素吸入が幹細胞の動員と臓器虚血再灌流障害に与える影響

研究課題名(英文) The effect of hyperoxygenation on stem cell mobilization and ischemia/reperfusion injury.

研究代表者

稲富 千亜紀 (INADOMI, Chiaki)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：20508444

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)：虚血プレコンディショニングが幹細胞の動員を誘導し虚血再灌流障害から保護することが知られている。マウスで一過性の高濃度酸素投与が幹細胞の動員と心臓の虚血再灌流障害に与える影響を調べた。5分間の高濃度酸素投与後1時間と24時間では末梢血中の幹細胞数が有意に増加するが、血漿中のSDF-1の濃度に有意な変化は認めなかった。5分間の高濃度酸素投与後3時間で虚血再灌流を行った心臓組織では、心臓の線維化面積やアポトーシス細胞数に有意な変化は認めず、幹細胞数は増加したが群間で有意差はなかった。マウスでは一過性の高濃度酸素投与で幹細胞の動員が起こるが、心臓の虚血再灌流障害に対しては明らかな保護効果はなかった。

研究成果の概要(英文)：It is well known that ischemic preconditioning induces stem cell mobilization and protects against ischemic/reperfusion (I/R) injury. In this study, we investigated the effect of transient oxygenation on stem cell mobilization and I/R injury of the heart in mice. The number of c-kit⁺ stem/progenitor cells in peripheral blood was significantly increased at 1 or 24 hours after oxygenation for 5 minutes. Oxygenation for 5 or 20 minutes did not significantly change the SDF-1 level measured in plasma. Oxygenation for 5 minutes did not significantly alter the fibrotic area or cell apoptosis. Oxygenation for 5 minutes increased the number of c-kit⁺ cells in hearts damaged by I/R injury. However, this difference was not significant between groups. Although transient oxygenation induces stem cell mobilization, it does not appear to protect against I/R injury of the heart in mice.

研究分野：医歯薬学 麻酔蘇生学

キーワード：循環・高血圧 虚血再灌流障害 高濃度酸素 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔や外科手術の際の臓器虚血により、術後に臓器虚血再灌流障害を生じることがある。臓器における虚血再灌流障害を防ぐため、これまで多くの努力が注がれてきたが、未だ完全には解決されていない。

心臓の虚血再灌流障害を軽減する方策としては、虚血プレコンディショニングの効果がよく知られている。近年、虚血プレコンディショニングによる心臓虚血再灌流障害への保護効果に関する機序として、末梢血中の骨髓由来幹細胞の動員と虚血再灌流組織への集積の増大が関与していることが明らかになった。

一方、全身麻酔導入時には虚血（低酸素）状態とは全く逆に、一過性に高濃度の酸素投与を行う状況が生じるため、細胞や生体に様々な影響を及ぼすと思われる。高濃度酸素投与に関しては、脳血管障害、末梢循環障害などに対する高気圧酸素療法の効果が認められているが、高濃度酸素投与により濃度依存性・時間依存性に様々な臓器が障害されることも報告されている。

高濃度酸素投与による細胞や生体への影響についてはコンセンサスが得られておらず、高濃度酸素曝露による組織幹細胞への影響や虚血再灌流障害への保護効果については、調べられる範囲で生体レベルにおいての研究報告が見当たらない。

2. 研究の目的

全身麻酔の導入時によく行われる一過性の高濃度酸素の投与が生体に及ぼす影響、特に臓器虚血再灌流障害に対する保護効果について明らかにすることを目的とする。また、障害臓器の保護・修復に重要な役割を果たす組織幹細胞に焦点をあて、骨髓由来幹細胞の動態変化の角度から一過性の高濃度酸素投与による生体への影響に関するメカニズムを明らかにする。

具体的には、マウスでの短時間高濃度酸素曝露による末梢血中の心筋保護液性因子および骨髓由来幹細胞の経時的な変化を調べ、心臓の虚血再灌流障害に及ぼす影響とその分子・細胞機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)高濃度酸素曝露後の末梢血中の臓器保護関連液性因子および幹細胞の経時的変化

実験動物と高濃度酸素曝露

12週齢の健常 C57BL/6 マウスを 100%の高濃度酸素にそれぞれ、5、20 分間曝露させ、以下の実験に用いる。

血液サンプリングと末梢血中幹細胞数の定量評価、血清中の心筋保護液性因子の測定

高濃度酸素曝露の 1、3、6、24 時間後に腹部大静脈より末梢血を採取する。

採取した血液を用いてフローサイトメトリーによる c-kit 陽性幹細胞数の定量測定と、ELISA 法による血漿中の SDF-1、VEGF の定量測定を行う。

(2)高濃度酸素曝露の心筋虚血再灌流障害に対する保護作用とそのメカニズム

GFP 陽性骨髓細胞移植キメラマウスの作製

C57BL/6 マウスを全身照射（10Gy）後、GFP-transgenic C57BL/6 マウスから採取した骨髓細胞を経静脈的に投与し、骨髓細胞のみ GFP 陽性細胞に置換したキメラマウスを作製する。

高濃度酸素曝露と心臓虚血再灌流障害モデルの作製

12～14 週齢の GFP 陽性骨髓細胞移植キメラマウスに 100%の高濃度酸素を 5 分間曝露させ、3 時間後に全身麻酔下に気管挿管、左開胸を施行し、前下行枝を 30 分間結紮し再灌流を行う。同様に酸素曝露をさせない GFP 陽性骨髓細胞移植キメラマウスで同様に心臓虚血再灌流モデルを作成し、コントロール群とする。

心臓虚血再灌流障害に対する保護作用の評価と心臓組織内の骨髓由来幹細胞の定量

虚血再灌流後 3 日目、14 日目にキメラマウスを犠牲死させ心臓を取り出し、パラフィン固定後に組織標本作製を行う。

高濃度酸素曝露の心臓虚血再灌流障害に対する保護作用の有無を、Sirius Red 染色による心臓内線維化組織面積の測定、TUNEL 染色による心筋アポトーシス細胞数の測定で、群間比較検討にて評価する。

心臓組織内の骨髓由来幹細胞の定量評価として、免疫染色法による左室心臓組織内の GFP 陽性細胞数・c-kit 陽性幹細胞数の測定を行い、群間比較検討にて評価する。

4. 研究成果

(1)高濃度酸素曝露後の末梢血中の臓器保護関連液性因子および幹細胞数の経時的変化

c-kit 陽性幹細胞数は、コントロールと比較し 5 分間高濃度酸素曝露後 1 時間と 24 時間で有意に増加し、20 分間高濃度酸素曝露後においても 1 時間で有意に増加した。

5 分間と 20 分間の高濃度酸素曝露では血漿中の SDF-1 の濃度に有意な変化は認めなかった。しかし、血漿中の VEGF の濃度は 20 分間酸素曝露後 3 時間で低下傾向を認めた。

(2)高濃度酸素曝露の心筋虚血再灌流障害に対する保護作用とそのメカニズム

虚血再灌流後 14 日目の心臓組織において、5 分間の高濃度酸素曝露群はコントロール群と比較して心臓の線維化組織面積に有意差は認めなかった。

虚血再灌流後 3 日目の心臓組織において、TUNEL 染色では 5 分間の高濃度酸素曝露群はコントロール群と比較して左室前壁での心筋アポトーシス細胞数は少ない傾向であったが、両群間に有意差は認めなかった。

GFP 陽性細胞と GFP 陽性 / c-kit 陽性細胞は、虚血再灌流の影響を受けない部位より虚血再灌流の影響を受ける左室前壁で多く認められたが、総細胞数では両群間に有意差を認めなかった。しかし、5 分間の高濃度酸素曝露群ではコントロール群と比較してより多くの GFP 陽性 / c-kit 陽性細胞の集積を認めた。

以上より、C57BL/6 マウスでは短時間の高濃度酸素曝露により幹細胞の動員が起こるが、虚血再灌流後の心筋保護については明らかではないことが示唆された。

これまでの実験結果をまとめ論文を作成し、PLoS ONE に投稿し掲載された。

低酸素/虚血性の刺激は、幹細胞の動員を誘導し、臓器を虚血再灌流障害から保護することが知られている。したがって、全身麻酔中に挿管前に毎回行われる 100%酸素の吸入は、一時的な高酸素血症を誘発し、幹細胞の動員および動員を阻害し、患者を虚血再灌流障害に対し敏感にする可能性があるかと推測していた。

一過性的高濃度酸素投与後の若い健康なマウスの末梢血における幹細胞の動員、および VEGF および SDF-1 のレベルの変化に関しては、100%酸素に 5 分または 20 分間曝露すると、末梢血中の c-kit 陽性幹細胞の数がわずか 1 時間後に有意に増加することを示した。5 分間酸素に曝露してから 24 時間後にも幹細胞数の増加が観察された。しかし、血漿中の SDF-1 および VEGF レベルは、5 分または 20 分間の酸素投与によって有意に増加しなかった。以前の研究では、虚血プレコンディショニングは後期 (24 時間) には幹細胞を動員するが、初期段階 (1-6 時間) ではしなかった。対照的に、虚血プレコンディショニングでは、非常に早い時点 (1 時間) で血漿中の VEGF および SDF-1 レベルが上昇するが、これらのレベルは 6 時間以内に正常に戻る。Hyp-1 を誘導する低酸素および虚血による刺激はよく知られており、VEGF の産生が促進される。低酸素/虚血による刺激が幹細胞を動員することもよく知られている。

対照的に、幹細胞動員に対する酸素化の効果は、ほとんど知られていない。高濃度酸素

は HIF-1 経路を阻害することが報告されており、これは VEGF 産生の阻害をもたらす。実際に、血漿中の VEGF レベルは、20 分間の酸素投与の 3 時間後に減少した。しかし、5 分間の酸素投与は VEGF レベルを変化させなかった。血漿中の SDF-1 および VEGF レベルは増加しないのに、一過性の酸素化がどのようにして c-kit 陽性幹細胞の動員を誘導するかは依然として謎であり、一時的な高酸素血症および VEGF の一時的な減少が、c-kit 陽性幹細胞の動員における役割を果たすかどうかを知ることは重要である。酸素曝露後の幹細胞動員の機序を解明するために、さらなる実験が必要である。

また、以前の研究で、虚血プレコンディショニングの後期 (24 時間) に心臓の虚血再灌流障害を保護する幹細胞の動員が示されているため、虚血再灌流障害に対する一過性酸素曝露の効果を検討した。今回の結果では、5 分間の酸素曝露後 24 時間で末梢血中の c-kit 陽性幹細胞の数は増加するのにも、虚血再灌流障害を抑制しないことが示されたが、これらの研究間の違いの理由は不明である。我々は、酸素曝露後の SDF-1 および VEGF の増加がなければ、少数の c-kit+細胞の動員は心臓の虚血再灌流障害を効果的に防御するには不十分であると推測している。

結論として、今回の実験結果は、一過性の酸素曝露が骨髄由来の幹細胞の動員を阻害するのではなく、誘導したことを示した。しかし、5 分間の酸素曝露は心臓の虚血再灌流障害に非常に限定された効果しか及ぼさなかった。長期間に渡って酸素が毒性を有するかどうかは明らかではないが、全身麻酔中の 100%酸素の一時的な (20 分未満) 投与は安全であると思われるが、臓器の虚血再灌流障害に対しては限定された効果しかないと考えられる。

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)

Yano R, Inadomi C, Luo L, Goto S, Hara T, Li TS. The effect of transient oxygenation on stem cell mobilization and ischemia/reperfusion heart injury. PLoS ONE 13 巻, 2018 年, e0192733, 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0192733

[学会発表](計 0 件)

[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〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲富 千亜紀 (INADOMI, Chiaki)
長崎大学・病院 (医学系)・講師
研究者番号：20508444

(2) 研究分担者

李 桃生 (LI, Tao-Sheng)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授
研究者番号：50379997

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

矢野 倫太郎 (YANO, Rintaro)
長崎大学・病院 (医学系)・助教