

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 1 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860540

研究課題名(和文)毛細血管幹細胞におけるAPE1の役割解明 高性能化幹細胞調整法の開発にむけてー

研究課題名(英文)Role of Ape1 on Capillary Stem Cells

研究代表者

山内 敦司(Yamauchi, Atsushi)

旭川医科大学・大学病院・非常勤医師

研究者番号：60726462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的「Ape1遺伝子導入による高機能幹細胞導入療法の開発」をしていくために、以下の研究を遂行した。毛細血管幹細胞(CapSCs)あるいは、心臓幹細胞(CSC)におけるApe1の機能を評価するために、Ape1遺伝子の強制発現するために、Ape1アデノウイルスを導入したり、内因性のApe1遺伝子発現を抑制するために、Ape1特異的siRNAを導入した。本実験から、Ape1導入により、酸化ストレスによる細胞障害を低下させ、組織導入後の残存率を高めた。組織虚血モデル(心筋梗塞後)で、Ape1導入したCSCを導入することにより、CSC導入の心筋保護効果を有意に高めることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to develop the method to improve Cell transplantation therapy using Ape1 gene, we performed a series of Ape1 loss/gain function study. Ape1-recombinant adenovirus was used for Ape1-overexpression and Ape-specific siRNA was used for knockdown of endogenous Ape1 in target stem cells, i.e., capillary stem cells and cardiac stem cells. We found that Ape1 protected these cells from damage of oxidative stress and increased the survival rate after transplantation into ischemic tissues. Transplantation of Ape1-expressed Sca1-positive cardiac stem cells (CSC) into ischemic/reperfusion mouse heart significantly improved cardiac function compared to control CSC.

研究分野：循環器内科

キーワード：組織幹細胞 酸化ストレス 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 新規の毛細血管由来幹細胞の発見

殆どの組織に限らず分布している毛細血管周細胞 (pericytes; PCs) の中に間葉系幹細胞 (MSCs) 様の細胞が存在することが明らかになり、様々な組織の形態機能維持や難治性疾患における組織リモデリングに重要な役割をもつことが推測されている。しかし、世界中で大きな注目を受けているものの、同細胞を同定する適当なマーカーがなく、詳細な細胞機能解析は進んでいないのが現状である。

我々は、独自に樹立した不死化毛細血管細胞株の中から、多分化能をもつ周細胞株 (capillary derived stem cells; CapSCs) を見だし、この細胞株を利用した網羅的アレイ解析により特異的マーカーを選定し、世界で初めて、正常組織から CapSCs を同定、分離することに成功している。

CapSCs は①自ら血管構成細胞 (内皮および周細胞) に分化して、組織再生に不可欠な成熟した毛細血管網を構築し、②間葉系中胚葉および神経系外胚葉細胞への多分化能をもつ。また、③生体組織内導入により毛細血管とともに組織実質細胞へ分化し、従来報告されている組織幹細胞に比べ高い組織再生能を示す。以上の特徴から、CapSCs は将来の再生医療における基盤となる新規の細胞ツールとしても期待できる。

### (2) 幹細胞機能を改善する APE1

現在、本邦においても、対象患者由来の血管内皮前駆細胞 (EPCs) や MSCs などの細胞を用いた細胞導入療法が試され、その安全性、有効性の点から将来性のある再生医療として期待されている。しかし、患者由来の幹細胞を用いる場合、導入細胞の機能の低下が治療効率を下げる要因として問題となっている。この本質的な問題点を解決することは、本格的な細胞療法を臨床応用していく上で重要である。

## APE1 (Apurinic/apyrimidinic

endonuclease 1) は、酸化ストレスなどによる損傷遺伝子の修復酵素であると共に、酸化ストレスによって不活化される様々な転写因子の再活性化などの多機能作用により強力な抗酸化ストレス能を発揮する遺伝子である。我々は、EPCs に APE1 を発現させることにより、EPCs の生体内生着性を高め、EPCs の本来の再生機能を著明に高めることを報告した。

APE1 は、EPCs ばかりでなく我々の同定した CapSCs においても強く発現しており、幹細胞一般の機能維持に重要な役割をもつことが推測され、我々の開発した細胞内 APE1 活性化法は、導入細胞の有効かつ基盤的な機能改善法として期待できる。

## 2. 研究の目的

以上の研究背景を踏まえ、『CapSCs における APE1 は、生体内の生着を高め、そして組織再生機能を維持するために重要である』という仮説をたて、これを検証することにより『APE1 遺伝子導入による、高機能 CapSCs 細胞導入療法』を開発していく。

### 目標 1 CapSCs 細胞機能における APE1 の役割

患者由来導入細胞の機能低下をもたらす原因のなかでも、糖尿病、老化は非常に大きな因子である。我々は、老化マウスあるいは糖尿病マウス由来の CapSCs を分離し、その細胞機能を評価するとともに、APE1 含め細胞内遺伝子発現量を評価する。

### 目標 2 APE1-導入 CapSCs の細胞機能評価

分離した CapSCs 細胞を特定の負荷条件 (高血糖、酸化ストレス) で処置した後の細胞機能と APE1 発現、機能との関連性を確認する。また、APE1 の強制発現や、内因性 APE1 発現や活性を低下させた場合の、上記の負荷条件による CapSCs の細胞機能に与える影響を評価する。

### 目標3 疾患病態モデルマウスを用いた APE1 導入 CapSCs の治療効果；

老化・糖尿病マウス由来 CapSCs において、APE1 遺伝子導入あるいは、内因性 APE1 低下細胞を作成し、同細胞の導入療法による疾患病態改善効果を評価する。 利用する疾患マウスモデルは、すでに CapSCs の効果が確認されている下肢重症虚血および骨格筋挫滅モデルを用いていく。

#### 3. 研究の方法

(1) 細胞機能低下リスク疾患マウスの準備； 患者由来の導入幹細胞の機能低下をもたらす原因のなかでも重要な糖尿病、老化モデルマウスを用いる。 糖尿病マウスは、Stz 投与のより血糖値 300 以上を 4 週経過したものを、老化マウスは、本大学動物センターで繁殖飼育して、すでに保有している 1~1.5 年齢マウスを用いる。

(2) CapSCs の分離・調整； 本研究室で確立している分離法に従って分離調整する。 上記マウスの皮下脂肪組織から stromal cells を培養し、MACS による周細胞マーカー (NG2) 陽性細胞を、さらに、FACS により我々が独自に見出した CapSC 細胞表面マーカーに対する抗体を用いて、CapSCs を分離、培養する。

(3) CapSCs 細胞機能評価； 基本的な細胞増殖能、遊走能やコロニー形成能の他、間葉系細胞、神経系細胞への多分化能を評価するほか、3D ゲル内での毛細血管構築能を評価する。 APE1 や幹細胞関連因子など細胞内遺伝子発現量を比較検討する。

(4) 細胞負荷実験； 分離した CapSCs に対して、①高血糖条件での培養、②H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> や TNF・/IL1・などの炎症性サイトカインで酸化ストレスを与える。

(5) 細胞内 APE1 発現・機能制御； ①内因性 APE1 抑制 (APE1 特異的 siRNA、特異的 APE1 阻害薬 (E3330)) および②APE1 強制発現 (APE1 プラスミド) を導

入する。 APE1-siRNA および APE1 発現用プラスミドはすでに作成され、EPCs でその働き (過剰発現および knock down 効果) は確認されている。

(6) CapSCs 細胞機能評価； (2) で準備した細胞に対して、(1) の条件下で、上記のように CapSCs の細胞機能を評価する。

(7) CapSCs の調整； 細胞機能低下リスク疾患マウス由来 CapSCs (目標 1-(1) 参照) を分離した後、APE1 遺伝子発現あるいは発現抑制細胞を調整する (目標 2-(2) 参照)。 特に、導入細胞の組織内局在を確認するために、GFP 過剰発現 (GFP-Tg) マウスから GFP 発光 CapSCs 細胞を調整する。 本講座所有の GFP-Tg マウスは、本大学動物センターで繁殖飼育しているものを用いる。

(8) 疾患モデルマウスの作成および病態評価； 正常マウス由来の CapSCs により著明な病態改善効果を確認している①ヌードマウスにおいて左大腿動静脈を剥離した重症下肢虚血モデル、②下肢腓腹筋組織に cardiotoxin 処置して骨格筋障害させた骨格筋挫滅モデルを作成する。 下肢虚血改善度は、ドップラー血流計で評価する他、骨格筋組織の再生度を、免疫組織学的に評価する。

(9) CapSCs 細胞導入と疾患病態の改善効果評価； 正常マウス及び細胞機能低下リスク疾患マウス (目標 1-(1)) 由来の CapSCs において、APE1 過剰発現あるいは APE1 発現低下 GFP 細胞を準備し (目標 2-(2) 参照)、上記 (2) 疾患下肢に直接導入し、その病態改善度を評価する。 ウイルス MOCK 感染細胞を対照群 1 として、また代表的な再生医療に用いられている既知の幹細胞 (EPCs や MSCs) を非 CapSCs 対照群 2 とする。

#### 4. 研究成果

(1) Ape1 導入による幹細胞機能への影響  
マウス脂肪組織あるいは骨格筋組織から毛

細血管由来の CapSC を、またマウス心筋組織から心筋幹細胞 (CSCs) を FACS あるいは MACS を用いて分離調整した。CapSC については、一部、不死化細胞株を用いて検討した。細胞機能に与える影響を観察するために、SiRNA を用いた Ape1 遺伝子発現抑制 (loss of function) および、Ape1 リコンビナントアデノウイルスを用いて細胞内 Ape1 遺伝子過剰発現 (gain of function) 細胞を調整した。内因性 Ape1 低下 CapSC あるいは CSCs において、H2O2 酸化ストレスによる細胞障害およびアポトーシス細胞数は、対照細胞にくらべ、上昇していた。一方、Ape1 過剰発現させた細胞において、ストレスによる細胞障害は低下した。また細胞老化の程度も、低下することを確認した。

(2) Ape1 導入による病態モデルでの影響  
マウス心筋梗塞モデルにおいて CSC による導入実験を用いて、Ape1 遺伝子導入による病態改善効果を評価した。マウス冠動脈 (左下降枝) 狭窄・再灌流モデルで、心筋虚血障害を誘導した。同時に、マウスから調整した CSC を導入 (Ape1 導入 CSC およびコントロール CSC (DsRed 発光遺伝子発光ウイルス導入)) し、4 週間後に心機能や組織学的解析を行った。Ape1 導入 CSC において、CSC による虚血心の機能改善および心筋保護効果が有意に亢進した。また、Ape1 導入により、CSC の組織への残存性も亢進し、一部は、心筋への分化を確認できた。

## 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 3 件)

- ① Aonuma, T., Yamauchi, A, Kawabe J, Hasebe N. Apoptosis-Resistant Cardiac Progenitor Cells Modified With Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease/Redox Factor 1 Gene Overexpression Regulate Cardiac Repair After Myocardial Infarction. *Stem Cells Transl Med* 5 (8): 1067-1078, 2016.
- ② Kabara M, Kawabe J. ... Yamauchi A,

Aonuma T et al. Immortalized multipotent pericytes derived from the vasa vasorum in the injured vasculature. A cellular tool for studies of vascular remodeling and regeneration. *Lab Invest* 94:1340-1354, 2014

- ③ Asanome A, Kawabe J, Kabara M, Yamauchi A et al. Nerve growth factor stimulates regeneration of perivascular nerve, and induces the maturation of microvessels around the injured artery. *Biochem Biophys Res Commun* 443:150-155, 2014.

[学会発表] (計 1 件)

- ① Aonuma T, Takehara N, ...Yamauchi A, Kawabe, Hasebe, ape1 gene provides anti-apoptotic effect to Scal positive cardiac progenitor cells and promotes cardiac regeneration in ischemic environment. AHA 2015, 11gatu 07, Orland USA.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称: Ape1 遺伝子導入による高機能化幹細胞・前駆細胞  
発明者: 川辺淳一、山内敦司、長谷部直幸  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特許 5880867 号  
出願年月日: 平成 23 年 8 月 9 日  
取得年月日: 平成 28 年 2 月 12 日  
国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内敦司 (YAMAUCHI Atsushi)  
旭川医科大学・大学病院・非常勤医師  
研究者番号: 60726462