

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20326

研究課題名(和文) 膠原病四肢潰瘍に対する新しい血管・組織再生治療の開発

研究課題名(英文) Development of the new therapeutic revascularization for non-healing ulcer patients with collagen disease.

研究代表者

播野 裕子 (HARINO, Yuko)

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号：00750655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：膠原病難治性潰瘍に対する新しい治療法として細胞移植再生治療が注目されている。自己の骨髄・血液から得た幹細胞移植による臨床試験が実施され一定の有効性が報告されているが、膠原病患者自体の血管幹細胞(EPC)数の減少や機能低下が報告されより効果的な細胞治療の開発が望まれる。我々はEPCの質と量を改善する新たな培養法(無血清生体外培養増幅法:QQc)を開発した。膠原病マウスや膠原病患者の末梢血単核細胞に対するQQcの有効性を検証すると、EPCの割合は約3～10倍、血管再生能力は約10～15倍に改善した。この新たな培養法を用いた幹細胞移植を膠原病難治性潰瘍患者に対する新しい細胞治療法として期待する。

研究成果の概要(英文)：The efficacy of stem cell therapy with endothelial progenitor cell (EPC) for non-healing wound patients with collagen disease is recently reported. However, its efficacy is reported to be limited due to the dysfunction of EPCs from collagen disease patients. Therefore, we have newly developed a stem cell therapy using an ex vivo culture system that can improve patient's EPC function. We developed the new culture system which we named Quality and Quantity culture(QQc) system to improve the quality and quantity of EPCs. We investigated the efficacy of QQc with circulating mononuclear cells from collagen mouse and patient. EPC after QQc was increased from 3 to 10 times and vasculogenic potential was improved from 10 to 15 times. We believe that QQc therapy will be a new therapy for collagen patients with intractable ulcer in the near future.

研究分野：形成外科

キーワード：膠原病 再生医療 難治性潰瘍 血管内皮前駆細胞 血管再生

1. 研究開始当初の背景

(1) 膠原病は全身性炎症疾患であり、血管炎のどのによる血行障害が引き起こされ四肢虚血から潰瘍や壊死が生じ最終的に四肢切断に至る場合も多く新たな有効性の高い治療の開発が望まれている。その中でも膠原病性難治性潰瘍に対する新しい治療法として細胞移植再生治療が注目され自己骨髄幹細胞や末梢血幹細胞移植による臨床試験が実施されるようになった。2002年にInabaらやTakeishiらによって膠原病患者に対する末梢血幹細胞移植が局所の血管新生を促すことが報告され、G-CSF(顆粒球コロニー刺激因子)を併用した血管再生治療が行われ一定の成績をあげるようになった。また、2011年に三浪らはG-CSFを使用せずにアフェレーシスによって末梢血単核細胞より調整したCD34陽性細胞の移植治療を行い良好な結果をえた。このように一定の有効性が報告されている一方で、広範囲に及ぶ潰瘍部を治療するに十分な移植細胞数を確保することが困難である為、完全な治療法とは言えない。更に、難治性潰瘍の原因の一つとされている膠原病患者自身の血管内皮前駆細胞(Endothelial Progenitor Cells:以下EPC)数の減少や血管を形成する機能の低下が報告されており(Westerwheel PE, Verhaar MC: Nat Rev Rheumatol 5:332-340, 2009)、関節リウマチでは炎症性マーカーと重症度(DAS28)がEPC数と負の相関を示すことやEPCの形成単位での減少が報告されており、また全身性硬化症の慢性期にもEPC数が減少し機能が低下すると報告がある(Lambova SN, Muller-Ladner U: Microvasc Res 80:534-539, 2010)。このように現在行われている細胞移植治療には様々な課題があり、より効果的な幹細胞治療の開発が望まれる。

(2) 血管内皮前駆細胞(EPC)とは骨髄中や血液中に存在し、血管を形成・再生する際に働く血管幹細胞である。様々な疾患環境下ではEPCの数や機能低下が生じることにより血管再生機能障害が発生している。研究協力者の田中らはこのEPCに着目し糖尿病とEPCに関係について様々な研究を実施している。糖尿病マウスを用いてEPCの機能解析を行い、骨髄中EPCは健常マウスよりも数の減少・血管形成機能が低下していることを明らかにした。そこで田中らによって開発されたEPCの細胞数増加・機能改善を計る新しい細胞培養法:無血清生体外培養増幅法(Quality and Quantity Culture: QQc)を用いて糖尿病マウスEPCを培養し、マウス皮膚潰瘍モデルに移植したところ再生効果の高い効果を得た(Rica T: Diabetologia; 62(9):3207-17, 2013)。さらにこのQQc法を用いて初めて糖尿病難治性四肢潰瘍患者に対する有効性を実証した。EPCを含む末梢血単核細胞をQQc法にて培養したMNCQQ細胞を用いた臨床試験を実施し、従来の移植法よりもはるかに高い治

療効果を得ている。

2. 研究の目的

このQQc法を用いて糖尿病患者のEPCの量と質を改善することを確認した。しかし、膠原病患者においてはQQcの有効性はいまだ解明していない。QQc法で培養された細胞を用いた移植治療は従来の細胞移植治療に比べはるかに効果が高いことが予想される。膠原病難治性四肢潰瘍患者にMNCQQ細胞を移植することで従来の末梢血管幹細胞移植よりも高い有効性が得られれば、多くの患者の四肢救済につながり、患者QOLの向上、医療費削減につながる。本研究は膠原病患者を対象としたMNCQQ細胞移植という新たな血管幹細胞治療の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究に適した膠原病(SEL)マウスの検討:SELモデルマウスはBXSBマウス・BWF1マウス、症状が雄のみまたは雌のみに発症する系統など多数存在する。この中から過齢や雄雌性別なども考慮しBXSB/yaaマウス、C57BL/6-lprマウスの2系統を用いて本研究においてどちらが良好な結果を得られるか検討した。予備実験としてEPCの割合や機能を調べたところ、C57BL/6-lprマウスにおいてより良好な結果を得ることができた。よって、本研究における以下の動物実験はC57BL/6-lprマウスを膠原病マウスとして使用することとした。

(2) 膠原病(SLE)マウスにおける末梢血単核細胞(PBMNC)及びEPCの機能解析:SELマウスとしてC57BL/6-lprマウス(lpr群)と対照群(control群)のC57BL/6マウスの末梢血単核細胞(PBMNC)中のEPC数(Sca-1+/ckit+細胞)をFACSにて測定した。さらに血管再生能をVasculogenic Colony Forming Assay (VCFA)にて解析した。更にマウス骨髄中のEPCについてもその割合と機能を測定した。

(3) SLE-MNCに対するQQcの有効性を検討する為に、分離したMNCをQQcにて培養し、QQc後の細胞(MNCQQ細胞)中のEPC数と血管再生能を評価した。

(4) 膠原病患者に対するMNCQQ培養有効性の検討を実施した。膠原病患者の血液からMNCを分離し、MNCQQ培養にて7日間培養する。その後、培養前のMNCとMNCQQ細胞中のEPCの割合をEPC細胞表面マーカーCD34で、抗炎症性細胞の割合をCD206で染色し、そのほかにもCCR2、CD4、CD8、CD3、CD14、CD31、CXCR4の割合をFACSにて測定した。また、血管再生能をVCFAにて評価した。

4. 研究成果

(1) SELマウスMNC中のEPC数と機能評価

について、lpr 群、control 群での末梢血 1 mL あたりの MNC 数に有意な差はなかった (cont vs lpr= $1.32 \pm 0.63 \times 10^6$ vs $1.37 \pm 0.76 \times 10^6$)。MNC 中 EPC の割合を測定したところ、EPC 細胞表面マーカーである Sca-1+/ckit+細胞数が lpr 群で 0.039%、control 群で 0.06%と SLE マウスで割合が減少していた (cont vs lpr= 0.06 ± 0.01 vs 0.039 ± 0.008 、 $p=0.032$) (図 1)。

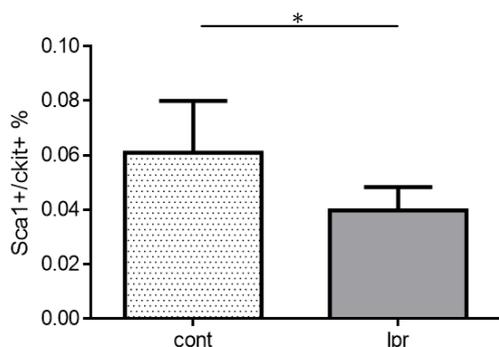


図 1: MNC 中の EPC 割合の比較

VCFA とは EPC やそれを含む MNC 細胞を用いて血管幹細胞が血管内皮細胞へ分化していく過程を in vitro 環境下で可視化したアッセイである。主に二種類の細胞集団: コロニーが形成され、血管形成に迅速に働く能力の高い分化型コロニーと、細胞増殖性を兼ね分化型コロニーに次ぐ分化能を持つ未分化型コロニーが観察できる。これらのコロニーを血管形成能の指標として計測する。この VCFA 評価では、lpr 群で EPC の分化能の指標となる分化型コロニー数が control 群より減少していた ($p < 0.05$)。未分化型コロニーは両群で有意な差はなかった。膠原病マウスの末梢血単核細胞中の EPC は数の減少だけでなく血管形成機能も低下していることが示唆された。

また、骨髄中 EPC について、骨髄 EPC の割合は健常マウスと同等かまたは増加傾向にあり、血管形成機能は健常マウスより低下していた。膠原病マウス骨髄 EPC の割合は健常マウスと変化が無く末梢血 EPC の割合が減少していることから、膠原病マウスでは EPC が骨髄から末梢環境へと動員される機序に何らかの障害が生じている可能性が考えられる。

(2) 膠原病マウス MNC を QQc 法で培養すると、QQ された総細胞数は lpr 群で 0.17 倍、control 群で 0.28 倍と有意に減少していたが ($p=0.0023$)、QQ 細胞中の EPC の割合は増加していた。VCFA 評価では未分化型・分化型コロニー共に増加した。総コロニー数が QQ 後に lpr 群で 10 倍、control 群で 9 倍となり両群において血管形成能力が優位に増加した (図 2)。

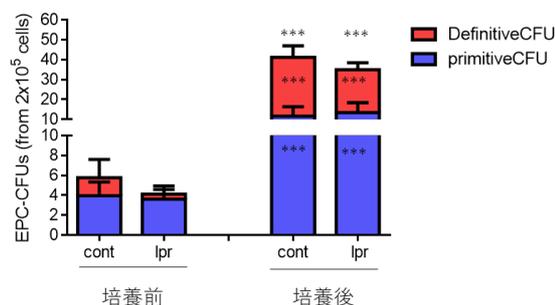


図 2: 血管形成能評価

(3) 膠原病患者に対しても同様の試験を実施した。膠原病患者 MNC 中の EPC の割合: CD34 陽性細胞は 0.08%であり QQ 培養後の MNCQQ 細胞中の CD34 陽性細胞は 1.22%と 15 倍近く数が増加した。また、炎症・抗炎症性細胞にも注目すると QQ 培養後は炎症性細胞指標の CCR2 陽性細胞が大幅に減少し、抗炎症性細胞指標の CD206 陽性細胞が優位に増加した。そのほかの細胞表面マーカーについては、CD133 陽性細胞: 0.02%から 0.14%に増加、CD14 陽性細胞: 18%から 8%に減少、CD4 陽性細胞: 26%から 56%に増加、CD8 陽性細胞: 20%から 12%に減少、CD3 陽性細胞: 56%から 60%と横ばい、CD31/CXCR4/CD3 陽性細胞 (angiogenic T cell): 9%から 15%に増加、という結果をえた。VCFA 評価は、QQ 培養後に分化型コロニーが有意に増加し総コロニー数が 5 倍近く増加した。

以上の結果より、膠原病マウスは末梢血 EPC 数とその血管形成機能は健常マウスに比べ低下を認めたが、QQc 法はこれらを有意に改善することを明らかにした。

また膠原病患者においても QQc 培養法によって CD34 陽性細胞数を増加させ血管形成機能も大幅に回復させた。さらに、炎症性細胞を減少させ抗炎症性細胞が増加した。自然免疫を担当し様々な疾患に関与する炎症・抗炎症性細胞: M1/M2 マクロファージの比率を変え病変組織の修復に関与する細胞の増加にも作用していることが考えられる。

当初の研究計画では血管幹細胞に着目していたが、MNCQQ 培養は血管幹細胞の量と質を改善させ血管再生形成を促し、かつ抗炎症性細胞による組織修復作用効果をも期待できる。膠原病難治性四肢潰瘍に対する新しい細胞移植治療の一つとなることを大いに期待する。

また、予備試験において、リウマチマウスにおいても同様の試験を実施した。リウマチマウスの末梢血中の EPC 数は健常のマウス EPC よりもその割合は増加していた。ところが VCFA 評価では colony 形成能が健常マウスと比較して著しく低下していた。リウマチ疾患

患者においても末梢血中の EPC の割合が通常よりも増加傾向にあるということが報告されている。EPC の数は増加しているが血管形成機能が低下していることが分かった。このように、膠原病のなかでもその疾患症状によって EPC の数や機能に違いがあることが判明した。今回我々はその中でも全身性エリテマトーデス疾患に的を絞って研究を実施したが、リウマチ疾患や全身性硬化症など様々な膠原病疾患に対して EPC 数やその機能を調べ、さらにこの QQc 法が各々の膠原病疾患に対して有効であるかを解明することも大変興味深い内容である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 13 件)

主な発表

平野理恵、田中里佳、播野裕子、水野博司・「無血清生体外培養増幅膠原病マウス血管内皮前駆細胞の機能解析」・第 25 回形成外科学会基礎学術集会・2016 年 9 月 15 ~ 16 日・ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター(大阪府・大阪)

田中里佳、平野理恵、播野裕子、有田佳代、藤村聡、水野博司・「難治性四肢潰瘍を対象とした新・血管組織再生治療の開発」・第 31 回日本臨床リウマチ学会・2016 年 10 月 29 ~ 30 日・京王プラザホテル(東京都・新宿)

平野理恵、田中里佳、萩原裕子、播野裕子、水野博司・「膠原病マウス無血清生体外培養増幅血管内皮前駆細胞の機能解析」・第 16 回日本再生医療学会総会・2017 年 7 ~ 9 日・仙台国際センター(宮城県・仙台)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

播野 裕子 (HARINO, Yuko)

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号: 00750655

(4) 研究協力者

平野 理恵 (Hirano, Rie)

順天堂大学・医学部・形成外科学講座(ゲノム再生治療センター)・研究補助員

有田 佳代 (Arita Kayo)

順天堂大学・難治の診断と治療研究センター・難治性疾患再生医療実用化研究室・技術員

田中 里佳 (Tanaka Rica)

順天堂大学・医学部・形成外科学講座・准教授

水野 博司 (Mizuno Hiroshi)

順天堂大学・医学部・形成外科学講座・教授