

## 科学研究費補助金成果報告書

平成21年 4 月24日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590857

研究課題名（和文） 心血管疾患における SDF-1/CXCR4 システムの役割の解明と治療への応用

研究課題名（英文） Role and therapeutic potential of SDF-1/CXCR4 system in cardiovascular diseases

研究代表者

高橋 将文 (TAKAHASHI MASAFUMI)

信州大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号 40296108

研究成果の概要：

我々は、自己骨髄細胞を用いて重症下肢虚血や心筋虚血患者を対象に血管再生療法を行い、その有効性と安全性を報告してきたが、本治療法では全身麻酔下で骨髄細胞を採取する必要があり侵襲が大きいことや、治療を行ってもその効果が十分ではない症例があることを経験してきた。そこで、治療の有効性を高め、かつ患者への侵襲の少ない新たな心血管再生療法の確立を目的として、ケモカイン SDF-1 とその受容体である CXCR4 (SDF-1/CXCR4 システム) に着目して研究を行ってきた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：ケモカイン・血管新生・虚血・骨髄細胞・炎症・移植

## 1. 研究開始当初の背景

近年、幹細胞移植による心血管再生療法が研究・臨床応用されている。特に、血管分野における再生医療の発展は著しく、重症虚血に対する骨髄幹細胞を用いた血管再生療法は、現在数多くの施設で行われている。この血管新生療法は自己骨髄細胞を使用するため免疫学および倫理的な問題が少ないという利点があるが、全身麻酔下で 400-600mL の骨髄液を採取する必要があることから、全身状態の不良な患者や高齢者などではその適応に限界がある。さらに、再移植における安全性も確立されていないことから、より侵襲が少なく治療効果のある新たな治療法の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究では、より侵襲が少なく治療効果のある新たな治療法の開発を目的として、ケモカイン Stromal cell-derived factor-1 とその受容体である CXCR4 との相互作用 (SDF-1/CXCR4 システム) に着目して研究を施行した。

## 3. 研究の方法

C57BL/6 (♂、8-12 週齢)、ヌードマウス、CXCR4<sup>+/+</sup>-マウス (京都大学再生医科学研究所・長澤丘司教授より供与) を用いた。骨髄細胞膜表面上分子の発現はフローサイトメトリー法を用いて評価した。虚血モデルとしてはマウス右大腿動脈結紮による下肢虚血を作製して、レーザードップラー法により血流を評価し、局所におけるサイトカイン/増殖因子の発現は免疫組織染色法や real-time RT-PCR 法、ELISA 法にて解析した。また、血球細胞上の各種分子発現はフローサイトメトリーを用いて解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 培養による骨髄細胞における CXCR4 発現増加効果

培養により骨髄細胞の CXCR4 発現が有意に増加することを見出した。この発現増加作用は骨髄細胞に発現している他の分子 (CCR7、Gr-1、CD3、Mac-1、CD34、Sca-1、Flk-1) では認められず、CXCR4 に特異的な作用であると考えられた。また、この発現増加作用には、マウス血清に骨髄細胞が暴露されなくなることが、その機序の一部として関与していることを明らかとした。

### (2) 培養骨髄細胞移植による血流改善効果

この CXCR4 発現の増強された培養骨髄細胞は新鮮骨髄細胞と比較してマウス下肢虚血モデルにおける血流改善を有意に促進すること、CXCR4<sup>+/+</sup>マウス由来の培養骨髄細胞移植では、その血流改善効果が有意に低下することを明らかとした。また、CD31 および VE-cadherin 抗体を用いた免疫組織染色により、培養骨髄細胞移植群では有意に毛細血管形成も増加していることが示された。

### (3) 培養骨髄細胞移植による血流改善効果の機序の解明

この血流改善機序として、虚血部位へと移植した骨髄細胞がそこで発現している SDF-1 (CXCR4 リガンド) と相互作用してより局所に留まりやすくなることと、CXCR4 高発現の骨髄細胞が IL-1 $\beta$  や VEGF などの血管新生作用を有するサイトカインや増殖因子をより多く産生することを明らかとした。

今後、SDF-1/CXCR4 システムの役割と血管新生における詳細な機序が解明されることにより、SDF-1/CXCR4 システムを標的としたより効果の高い血管新生療法が開発されることが期待される。

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 7 件)

\*Corresponding author

1. Shiba Y, Takahashi M\*, Hata T, Murayama H, Morimoto H, Ise H, Nagasawa T, Ikeda U. Bone marrow CXCR4 induction by cultivation enhances therapeutic angiogenesis. *Cardiovasc Res* 81: 169-177, 2009 査読有
2. Kobayashi S, Ise H\*, Takahashi M, Goto M, Akaike T, Ikeda U. Surface coating of bone marrow cells with N-acetylglucosamine for bone marrow implantation therapy. *Biomaterials* 30: 574-582, 2009 査読有
3. Takahashi M\*, Yajima N (equally contribution), Morimoto H, Shiba Y, Takahashi Y, Masumoto J, Ise H, J Sagara, Nakayama J, Taniguchi S, Ikeda U. Critical role of bone marrow-derived ASC, an inflammasome adaptor molecule, in neointimal formation after vascular injury in mice. *Circulation* 117: 3079-3087, 2008 査読有
4. Murayama H, Takahashi M\*, Takamoto M, Shiba Y, Ise H, Koyama J, Tagawa Y, Iwakura Y, Ikeda U. Deficiency of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in bone marrow cells synergistically inhibits neointimal formation following vascular injury. *Cardiovasc Res* 80: 175-180, 2008 査読有
5. Takahashi M\*. High-mobility group box 1 protein (HMBG1) in ischemic heart disease: beneficial or deleterious. (Editorial) *Cardiovasc Res* 80: 5-6, 2008 査読有
6. Morimoto H, Hirose M, Takahashi M\*, Kawaguchi M, Ise H, Kolattukudy PE, Yamada M, Ikeda U. MCP-1 induces cardioprotection against ischemia/reperfusion injury: Role of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res* 78: 554-562, 2008 査読有
7. Shiba Y\*, Takahashi M, Ikeda U. Models for the study of angiogenesis. *Curr Pharm Design* 14: 371-377, 2008 査読有

[学会発表] (計 15 件)

1. 小林 聡、伊勢裕彦、高橋将文、後藤光昭、麻生真一、池田宇一：人工的な糖鎖修飾を行った骨髄細胞の心筋組織へのターゲティング法の開発。第31回日本分子生物学会・第18回日本生化学学会合大会(神戸) 2008.12.9-12
2. 小林 聡、伊勢裕彦、高橋将文、後藤光昭、麻生真一、池田宇一：人工的な糖鎖修飾を行った骨髄細胞の心筋組織へのターゲティング法の開発。日本バイオマテリアル学会(シンポジウム)(東京) 2008.11.17-18
3. Takahashi M, Ishigatsubo Y, Fujimoto K, Miyamoto M, Minota S, Horie T, Aizawa Y, Amano J, Murohara T, Matsubara H, Ikeda U. Therapeutic angiogenesis by mononuclear cell implantation for critical digit ischemia of patients with connective tissue diseases. *American Heart Association Scientific Sessions*, New Orleans, 2008.11.8-12
4. Izawa A, Takahashi M, Ise H, Morimoto H, Yajima N, Tagawa Y, Ikeda U. Role of interleukin-6 and its crosstalk with AT1R in acute and chronic rejection of murine cardiac allografts. *American Heart Association Scientific Sessions*, New Orleans, 2008.11.8-12
5. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Takahashi Y, Morimoto H, Ise H, Sagara J, Hongo M, Taniguchi S, Ikeda U. Role of an Inflammasome adaptor molecule ASC in myocardial ischemia-reperfusion injury. *American Heart Association Scientific Sessions*, New Orleans, 2008.11.8-12
6. Hata T, Takahashi M, Kawaguchi T, Kashima Y, Shiba Y, Ise H, Hida S, Iwakura Y, Taki S, Ikeda U. Critical role of Th17-CD4+ T cells in angiogenic response to hindlimb ischemia in mice. *American Heart Association Scientific Sessions*, New Orleans, 2008.11.8-12
7. Murayama H, Takahashi M, Shiba Y, Ise H, Takamoto M, Tagawa Y, Iwakura Y, Ikeda U. Double Deficiency of Tumour Necrosis

- Factor- $\alpha$  and Interferon- $\gamma$  in Bone Marrow-derived Cells Prevents Neointimal formation in a Murine Model of Vascular Injury. *American Heart Association Scientific Sessions*, New Orleans, 2008.11.8-12
8. 高橋将文、石ヶ坪良明、藤本和輝、宮本正章、相澤義房、天野純、簗田清次、室原豊明、松原弘明、池田宇一：自己骨髄細胞移植による難治性血管炎に対する血管新生療法. 第49回日本脈管学会総会（シンポジウム）（東京）2008.10.24-26
  9. 伊勢裕彦、小林 聡、高橋将文、伊勢真美子、池田宇一：細胞骨格分子デスミン・ビメンチンの細胞膜上の発現とN-アセチルグルコサミン結合活性. 第29回日本炎症・再生医学会（東京）2008.7.8-9
  10. Ise H, Kobayashi S, Takahashi M, Aso S, Akaike T, Ikeda U : Desmin and vimentin have N-acetylglucosamine-binding lectinic properties and are expressed on the cell surface. 第60回日本細胞生物学会（横浜）2008.6.29-7.1
  11. Murayama T, Takahashi M, Shiba Y, Ise H, Tagawa Y, Takamoto M, Ikeda U : Impact of TNF-alpha and IFN-gamma on neointimal formation after vascular injury in mice. 第72回日本循環器学会（福岡）2008.3.28-30
  12. Shiba Y, Takahashi M, Ise H, Ikeda U : Upregulation of CXCR4 in bone marrow cells enhances the angiogenic potency in a murine model of hindlimb ischemia. 第72回日本循環器学会（福岡）2008.3.28-30
  13. Morimoto H, Takahashi M, Hirose M, Kawaguchi M, Ise H, Yamada M, Ikeda U : Cardioprotection of MCP-1 against ischemia/reperfusion injury is mediated through a redox oxygen species (ROS)-dependent but  $K_{ATP}$  channel-independent pathway. 第72回日本循環器学会（福岡）2008.3.28-30
  14. Abe H, Takahashi M, Tsukioka K, Kitahara H, Tsunemoto H, Suzuki J, Yaegashi H, Eda S, Yamazaki K, Kamikozawa M, Ikeda U : Clinical Significance of sleep-disordered breathing (SDB) in a large population of

Japanese patients: Efficacy of CPAP therapy in SDB-associated arrhythmias. 第72回日本循環器学会（福岡）2008.3.28-30

15. 小林 聡、伊勢裕彦、高橋将文、後藤光昭、麻生真一、池田宇一：人工的な糖鎖修飾を行った骨髄細胞の心筋組織へのターゲティング法の開発. 第7回日本再生医療学会総会（名古屋）2008.3.13-14

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 将文 (TAKAHASHI MASAFUMI)  
 信州大学・医学系研究科・准教授  
 研究者番号：40296108

### (2) 研究分担者

池田 宇一 (IKEDA UICHI)  
 信州大学・医学系研究科・教授  
 研究者番号：30221063

伊勢 裕彦 (ISE HIROHIKO)  
 信州大学・医学系研究科・助教  
 研究者番号：10324253

### (3) 連携研究者