

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17540

研究課題名(和文)超音波処理を施した酸化ストレス耐性細胞を用いる新規血管新生療法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel angiogenic therapy using ultrasound-treated oxidative stress-resistant cells

研究代表者

吉川 尚宏(Takahiro, Yoshikawa)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70811082

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):重症下肢虚血の新たな治療法として、患者の皮下脂肪組織に存在する間葉系幹細胞(ADRCs)を虚血組織へ移植して側副血行を促す血管新生療法が注目されている。本研究では投与前の血管新生細胞に超音波刺激を加え、酸化ストレス耐性を高める手法を試みた。ADRCs 1.0×10^6 個を入れた培養液を細胞培養バッグへ注入し、臨床用プローブを用いて超音波照射を行った。条件として、超音波照射なし、および超音波照射(Mechanical Index: MI 0.5 5分/15分、MI 1.2 5分/15分)で比較した。MI 1.2 15分では細胞生存率が低下したものの超音波なしの条件と比較してHGFの有意な増加がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究結果は臨床用エコープローブによる超音波照射を用いて血管新生因子の産生を促せる可能性を示した初の報告であり、今後の血管新生療法の効果増強への寄与が期待される。

研究成果の概要(英文):Angiogenesis therapy, in which mesenchymal stem cells (ADRCs) residing in patients' subcutaneous adipose tissue are transplanted into ischemic tissue to promote collateral blood circulation, is attracting attention as a new treatment for critical limb ischemia. In this study, we attempted to enhance oxidative stress tolerance of angiogenic cells by applying ultrasound stimulation to the cells prior to administration. The results were compared under no sonication and sonication (Mechanical Index: MI 0.5 5 min/15 min, MI 1.2 5 min/15 min). 1.2 15 min MI resulted in a significant increase in HGF compared to the no sonication condition, although cell viability was reduced.

研究分野：血管新生療法

キーワード：血管新生療法 重症下肢虚血 皮下組織由来再生細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

末梢動脈疾患の中でも患者のQOL低下や死亡のリスクが高い重症下肢虚血は、多くの症例で既存の治療法が有効でない。この症例を救済する新たな治療法として、患者の自己細胞を虚血組織へ移植して側副血行を促す血管新生療法が注目されている。自己細胞の供給源として、皮下脂肪組織に存在する間葉系幹細胞(ADRCs)は他組織よりも低侵襲で多量に採取できることより主流となりつつある。当研究室は、血管新生細胞へ超音波刺激を与えて血管新生療法の効果を増強することに成功した(Cardiovascular Research (2012) 95, 448-459)。しかしこの手法には細胞を培養・処理する施設(CPC)が必要であり、臨床応用には至らなかった。

2. 研究の目的

本研究では投与前の血管新生細胞に臨床用のプローブで超音波刺激を加え、酸化ストレス耐性を高めることで、その問題解決を試みる。

3. 研究の方法

ADRCs(LONZA, PT-5006)を増殖培地(LONZA, PT-4505)で培養し、 1.0×10^6 個ずつ凍結保存(細胞保存液CellBanker Plus, 成分にウシ血清を含む)した。

ADRCsを温浴で解凍し、増殖培地21mlと混合した細胞浮遊液を細胞培養バッグ(タカラバイオ, CultiLife 215 Culture bag)へ注入した。

診断用エコープローブ(GE Healthcare LOGIQ E10 C1-6)で細胞培養バッグの外側から超音波を照射した。照射の際は細胞培養バッグの上に超音波ゲルパッド(Parker lab, Aquaflex ultrasound gel pad)、および細胞培養バッグの下に音響吸収剤(EASTEK AptFlex-F28 EUA201A(F28))を敷き、超音波の反響を防いだ。超音波の強度はMechanical Index(MI): 0.5および1.2、照射時間は5分および15分としてコントロール群(超音波照射なし、0分・5分・15分)と併せて7条件、 $n=5$ とした。また、非接触型赤外線温度計を使用して超音波照射前、1分後、5分後、15分後の細胞浮遊液の温度を計測した。

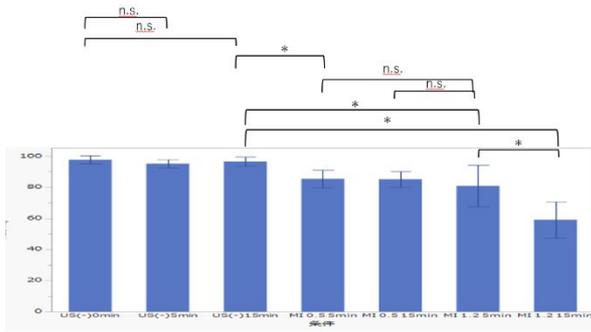
セルカウンター(ChemoMetec, NucleoCounter NC-200)により細胞生存率を計測した。

ELISA法により血管新生因子(HGF(R&D DHG00B)・VEGF(R&D DVE00)・Ang-1(R&D DANG10)・Ang-2(R&D DANG20))濃度を計測した。Ang-1およびAng-2は細胞培養液に多量に含まれるため、対照として培養液中の濃度も測定した。

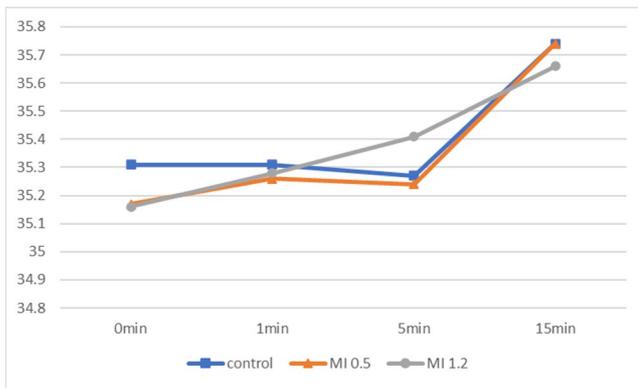
統計解析ソフト(JMP Pro 17.0.0)を用いて生存率および血管新生因子濃度をペアごとのWilcoxon検定で比較した。

4. 研究成果

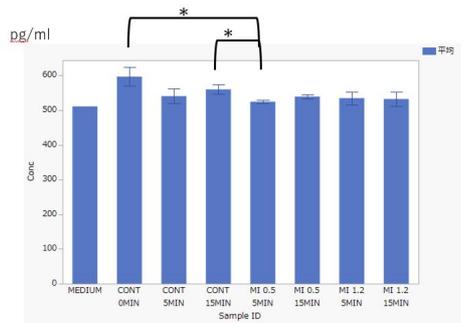
細胞生存率はMI 1.2, 15分の群で有意な低下がみられた(図1)。超音波照射15分後で細胞浮遊液の温度上昇がみられたもののコントロール群とその他の群とで有意差はなかった(図2)。Ang-1, Ang-2, VEGFは超音波照射群とコントロール群とで有意な濃度差はみられなかった(図3-5)。一方で、HGF濃度はMI 1.2, 15分の群でコントロール群より有意な増加がみられた(図6)。この結果は、臨床用エコープローブによる超音波照射を用いて血管新生因子の産生を促せる可能性を示した初の報告であり、今後の血管新生療法の効果増強への寄与が期待される。



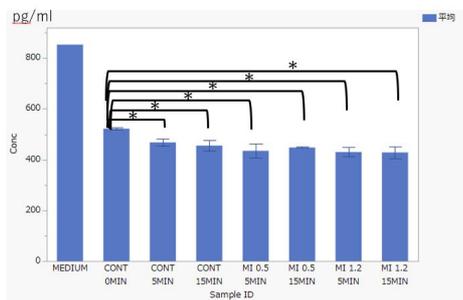
(図 1.) ADRCs 超音波照射後の細胞生存率 (n=5)



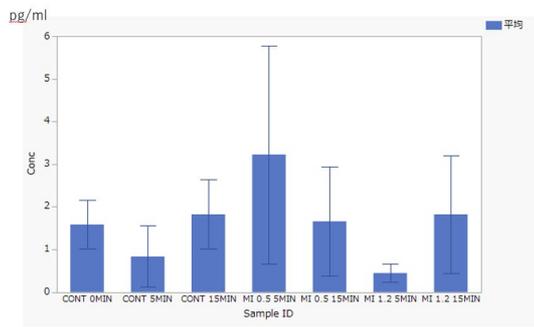
(図 2.) ADRCs 超音波照射における温度変化



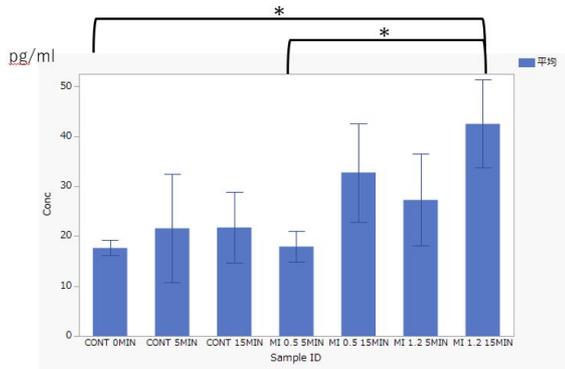
(図 3.) Ang-1 濃度



(図 4.) Ang-2 濃度



(图 5.) VEGF 濃度



(图 6.) HGF 濃度

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------