

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：84503

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19468

研究課題名（和文）末梢血白血球細胞を使った血管再生医療の実現

研究課題名（英文）Realization of vascular regenerative medicine using peripheral white blood cells

研究代表者

小川 優子（Ogawa, Yuko）

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構・その他部局等・研究員

研究者番号：00454497

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々は造血幹細胞の血管再生・修復メカニズムが、障害によりエネルギー源が枯渇した血管内皮細胞に対し、低分子メタボライトを供与することに伴うエネルギー代謝の活性化であり、幹細胞の生着が不要であることを明らかにした。すなわち、血管修復・再生能には、必ずしも「幹細胞」が必要無い。そこで新たなソースとして、循環末梢血中の血球細胞を用いることが出来ないかと考えた。しかし様々な検証結果から、末梢血中の血球細胞は個体差が大きく、一律の結果を得るための条件を見つけることが出来なかった。そこで、循環末梢血中のCD34陽性細胞に着目し、脳梗塞モデルマウスに投与した際の血管再生・修復能を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

献血により採取した血液中に含まれるCD34陽性細胞に関しては、これまで殆ど研究されていない。その理由として、血中における含有率が低く、造血能および幹細胞としての分化・増殖能がほとんど認められないことが挙げられる。しかし、今回の結果から末梢血中のCD34陽性細胞も再生医療用の細胞ソースとして利用できることが明らかになった。末梢血中のCD34陽性細胞を用いた再生医療は、他の幹細胞治療と比し圧倒的に安価で、発展性も極めて高い。すなわち、本研究で得られた成果は医療経済面でも非常に有意義な課題であるといえる。

研究成果の概要（英文）：From the results of non-clinical and clinical studies, it is clear that hematopoietic stem cells have a remarkable pro-angiogenic effect. We demonstrated previously that direct cell-cell interaction between transplanted hematopoietic stem cells (HSCs) and energy-deficient endothelial cells via gap junction is the mechanism of promoting angiogenesis for HSCs. It is not necessary for the treatment mechanism of HSCs to engraft or differentiation. That is, stem cells are not necessarily required for blood vessel repair/regeneration ability. We wondered if it would be possible to use blood cells in circulating peripheral blood as a novel cell source. However, there are large individual differences in peripheral blood cells, and it was not possible to find conditions for obtaining uniform results. Therefore, we focused on CD34 positive cells in circulating peripheral blood and clarified their ability to regenerate and repair blood vessels when administered to stroke model mice.

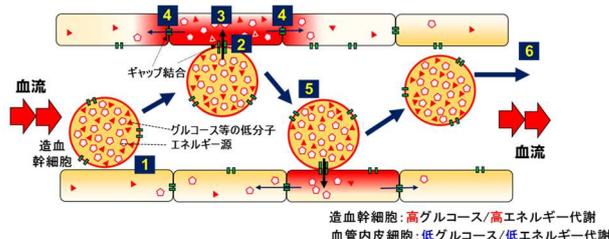
研究分野：幹細胞治療学

キーワード：造血幹細胞 末梢血白血球 細胞治療 虚血性疾患

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は顕著な血管再生促進能を示す。そのため、造血幹細胞を使った再生医療により、今まで全く治すことが出来なかった虚血性疾患の治療が可能となっている。我々はこの治療メカニズムが、サイトカインによるシグナル伝達やパラクライン効果ではなく、ギャップ結合（細胞間トンネル）を介し、造血幹細胞から障害された血管内皮細胞に対してグルコースやアミノ酸等の低分子メタボライトをエネルギー基質として供与することで、障害された血管内皮細胞のエネルギー代謝を活性化するものであることを明らかにした (Taura et

al., stroke, 2020)。また、造血幹細胞の治療メカニズムに投与細胞の生着、分化、増殖が不要であることが判明した (図1)。この治療メカニズムを考えると、血管再生医療は造血幹細胞でなくても実現が可能なのではないかと考えた。



- [1] 病巣部位の血管内皮細胞に到達（ホーミング）した後、血管内皮細胞と短時間の接着。
- [2] ギャップ結合（細胞間トンネル）を介して、造血幹細胞と血管内皮細胞が連結。
- [3] 造血幹細胞がエネルギー源が枯渇した血管内皮細胞に対し、エネルギー源となる低分子メタボライトを供与。
- [4] 血管内皮細胞同士がギャップ結合で繋がっており、周辺の細胞も次々とエネルギー代謝が活性化。
- [5] 短時間の接着が離れると、別の細胞と結合・連結を繰り返し、適宜メタボライトを供与。
- [6] 投与細胞は血流に乗って移動し、病巣部位に生着・分化・増殖しない。

図1 造血幹細胞の血管再生促進メカニズムの概略

2. 研究の目的

造血幹細胞には顕著な血管再生促進能があるにも関わらず、造血幹細胞が分化した血球細胞には血管再生能は確認されていない。その違いは何か？

我々は造血幹細胞だけでなく末梢血白血球も血管内皮細胞とギャップ結合を介して物質のやり取りを行っている可能性を示唆するデータを得た。血管再生促進能に幹細胞としての生着・分化が不要である以上、条件が揃えば末梢血白血球細胞でも実現可能なのではないかと考えた。そこで本研究では、造血幹細胞と末梢血白血球の違いについて検証を行い、末梢血白血球細胞に必要な処理を行うことで末梢血白血球を用いた血管再生医療の実現を目指す。

3. 研究の方法

1) 細胞内における代謝状態の比較

造血幹細胞の治療メカニズムの鍵がエネルギー代謝の活性化であることから、まず初めに① 血管再生能を有する造血幹細胞 (CD34⁺ cells)、② 血管再生能を有しない末梢血白血球細胞 (CD34⁻/CD45⁺ cells)、③ 血管内皮細胞 (ヒト臍帯静脈内皮細胞: HUVEC) のそれぞれの代謝状態について、メタボローム解析を行った。

2) 末梢血白血球細胞の機能向上

細胞の機能評価方法としては、我々が開発した血管再生促進能を評価するための in vitro アッセイ法 (PCT/JP2020/030921) を用いて評価を行った。本アッセイ法は、HUVEC と評価の対象となる細胞を共培養した際、HUVEC が自身の細胞内に VEGF を取り込む能力を評価するものである。HUVEC 単独で培養した時と比較して、造血幹細胞

胞と共培養することで HUVEC の VEGF 取り込み能が顕著に増加する。そこで本研究では、造血幹細胞を共培養した際と比較して VEGF 取り込み能がどの程度上昇したかを細胞の機能向上のレベルを評価した。

なお、試薬が細胞の機能に与える影響を見る際は、①HUVEC との反応前に細胞単独で試薬を添加し、PBS を用いた洗浄後に HUVEC と目的細胞を共培養して、HUVEC における VEGF の取り込み能を評価する、または②HUVEC と細胞を共培養させる際に試薬を同時に添加し、未添加の際と比較して対してどの程度 VEGF 取り込み能が上昇したかを評価した。まずはプレ評価としてマウスの骨髄単核球、および胎児末梢血であるヒト臍帯血を用いた検討を行った。

3) 循環末梢血中の造血幹細胞を用いた検証

成人の末梢血由来単核球から CD34 MicroBead Kit Ultra Pure, Human (ミリテニー社) を用いて CD34 陽性細胞を分離し、胎児末梢血(臍帯血)中の CD34 陽性細胞と細胞の性状比較および治療効果の比較を行った。また、両者を脳梗塞モデルマウスに投与した後の治療効果についても検証を行った。

4. 研究成果

1) 細胞内における代謝状態の比較 (Ogawa et al., *Cell transplant*, 2022)

① 血管再生能を有する造血幹細胞(CD34⁺ cells)、② 血管再生能を有しない末梢血白血球細胞(CD34⁻/CD45⁺ cells)、③ 血管内皮細胞 (ヒト臍帯静脈内皮細胞: HUVEC) を用い、各細胞の代謝状態についてメタボローム解析を用いて比較した。その結果、造血幹細胞は嫌気性代謝を示すことから解糖系基質が高く、また ATP や GTP 産生能も顕著に高い値を示した。一方、造血幹細胞から分化した末梢血白血球細胞では、解糖系代謝産物は低下する傾向が見られ、細胞内のエネルギー状態が顕著に低い結果が得られた。また、代謝経路の網羅的な解析結果から、造血幹細胞はエネルギーを蓄積するのに対し、分化した末梢血白血球はエネルギー消費の傾向を示すことが明らかになった。

2) 末梢血白血球細胞の機能向上

① プレ検証-1: マウスの骨髄単核球を用いた評価

メタボローム解析の結果から、末梢血白血球にエネルギーを蓄積させ、高エネルギー状態にすることで血管再生促進能を示す可能性があると考えた。そこで、まず最初にプレ検証としてマウスの骨髄単核球 (BM-MNC) を用い、グルコースを枯渇させた RPMI 中に 37°C・24 時間の培養を行い、その後、高グルコースの培地で 1~3 時間培養 (37°C) することで、単核球の血管再生促進能は顕著に増加し、また再現性も確認出来た (in vitro 試験)。そこで、この細胞を機能向上した BM-MNC として脳梗塞モデルマウスに投与 (梗塞作製

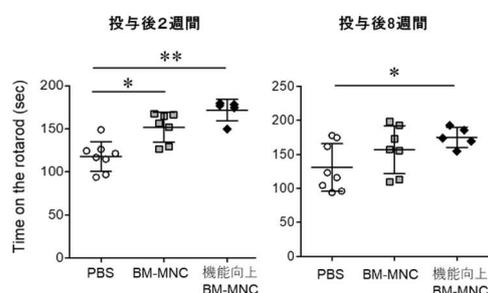


図 2 機能向上させたマウス骨髄単核球の治療効果

投与細胞数: BM-MNC: 1×10^5 個、機能向上 BM-MNC: 6×10^3 個、投与時期: 梗塞作製 48 時間後、投与経路: 静脈内投与

48 時間後に iv 投与、単回投与) したところ、通常の BM-MNC と比較して機能向上した細胞は 1/17 の生細胞数で有意な治療効果を示した (図 2)。また、その治療効果は投与後 8 週間、持続することが判明した。

② プレ検証-2：胎児末梢血（臍帯血）由来の単核球を用いた機能向上

臍帯血から Ficoll を用いた比重遠心分離法により得られた単核球画分について、①と同条件で培養したところ、in vitro アッセイを用いた評価の結果では機能が約 1.3 倍に向上した。しかし、グルコースを枯渇した条件下で 24 時間の培養を行うと、細胞のサイズが小さくなり、7AAD 陽性細胞の割合も急増する。7AAD 陽性細胞の割合は個体毎で異なっており、陽性率が全細胞のうち 90%を超えるケースもあれば 30%程度に留まるケースも認められた。

臍帯血は個体毎に状態が異なる。その臍帯血を用いた検証結果はプレ検証-1 で実施したマウス骨髄単核球と比してばらつきが大きく、再現性を検証するにあたり一律の条件下で実験を行うことは難しいと判断された。そこで、個体間の差を出来るだけ少なくする目的で、マウス末梢血を用いた検証に切り替えることとした。

③ マウス末梢血を用いた機能向上

上述の条件下、マウス末梢血を用いて検証を行ったが、結果には個体差が大きく、機能向上する個体もある一方で、ほぼ全て死滅しており評価を行えない個体も存在していた。また、マウス末梢血から一定の細胞数を確保するためにはかなりの匹数のマウスが必要になる。そのため動物愛護の観点からマウス末梢血を用いた検証は中断した。

エネルギー源を枯渇した培養条件では細胞にとってかなりダメージを与えることから、物質の添加による機能向上を目指した。各種物質を添加して in vitro アッセイを行ったところ、機能が微増する化合物は複数挙げられた (クエン酸、アスコルビン酸、乳酸、ペプチド類など) もの、反応には個体差が大きかった。また、上述したグルコース枯渇させた条件以上に機能を向上させるものを見つけることには至らなかった。

3) 末梢血中の造血幹細胞に着目した検証

末梢血白血球の機能向上という点では組成の個体差の問題からも困難と判断した。そこで少し視点を変え、循環末梢血中の造血幹細胞に着目をした。

循環末梢血中にも造血幹細胞はごく微量ながらも存在する。循環末梢血中の造血幹細胞については、造血能を殆ど示さないことが知られているが、その働きについては明らかにされていない。

臨床データにおいて、循環末梢血中の造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) の数が多い人は各種疾患 (脳梗塞、心疾患、腎疾患など) に対する予後が良いという報告が多数報告されていることから、造血能を示さなかったとしても組織再生・修復能は保持しているのではないかと考えた。そこで、成人の末梢血単核球画分から CD34 陽性細胞を分離し、その性状を検証する一方で、組織修復能について検証した。なお、比較の対象には胎児末梢血である臍帯血を用いた。

i) 細胞内メタボライト濃度の違い

CD34 MicroBead Kit Ultra Pure, human (Miltenyi Biotec 社) を用いて成人の末梢血および臍帯血から CD34 陽性細胞を分離した (n=3)。その結果、臍帯血は平均して 99.2% の純度が確認出来たのに対し、末梢血は純度が 95.7% を示した。臍帯血に比して成人の

末梢血中の CD34 陽性細胞の含有率はかなり低いことが知られており、純度も低いものとなった。両者を用いて ATP 産生能やグルコースやグルタミン酸、乳酸などエネルギー源となる低分子メタボライトの量について Promega 代謝アッセイキットを用いて測定した。その結果、臍帯血に比して末梢血では低分子メタボライトはやや低下の傾向が認められた (図 3)。この差が純度に由来するのか、細胞の差に由来するのかは不明である。しかし、他の細胞と比して造血幹細胞としては十分な量が含まれていると判断したことから、細胞表面マーカーについて詳細な検証を行った。

ii) 細胞の性状比較

成人の末梢血由来の CD34 陽性細胞 6 検体、臍帯血由来の CD34 陽性細胞 12 検体を用い、フローサイトメーターを用いて細胞の性状比較を行った。その結果、CD133 陽性細胞は臍帯血由来の CD34 陽性細胞に多く含まれていることが判明した。また、造血幹細胞の治療メカニズムに関連する細胞表面マーカーを比較したところ、両者で発現量大きな差が無いことが判明した。

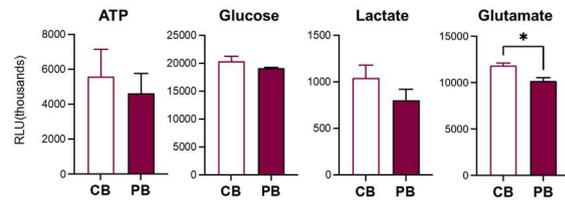


図 3 成人の末梢血中と臍帯血中の CD34 陽性細胞における低分子メタボライトの比較 (n=3) 細胞数: 1×10^5 個
CB: 臍帯血由来 CD34 陽性細胞
PB: 成人末梢血由来 CD34 陽性細胞

iii) 成人末梢血中の CD34 陽性細胞の脳梗塞モデルマウスに対する治療効果

成人の末梢血由来 CD34 陽性細胞を脳梗塞モデルマウスに投与した。梗塞作製 48 時間後に成人末梢血由来の造血幹細胞 0.88×10^5 個 (純度 70%、凍結融解) を頸動脈内投与したところ、顕著な治療効果が確認出来た (図 4A)。また、投与後の梗塞巣における血流量も無処置群と比較して顕著に高い値が認められた。すなわち、末梢血中の造血幹細胞は造血能を持たないものの、障害を受けた組織修復・再生能を示すことが明らかになった。

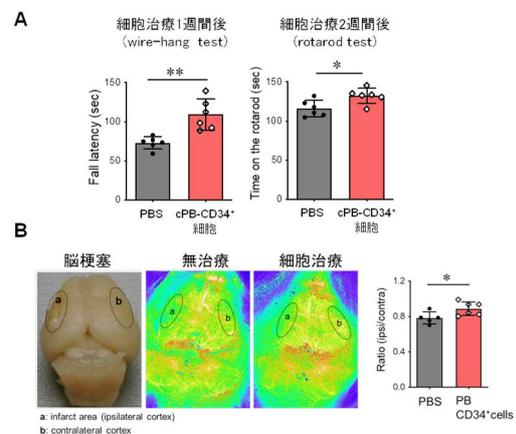


図 4 成人末梢血由来 CD34 陽性細胞の脳梗塞モデルマウスに対する治療効果

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

末梢血由来 CD34 陽性細胞: cPB-CD34⁺細胞数: 0.6×10^5 個/70 μ L/マウス (ia 投与)

5. まとめ

我々は血管再生医療を行うための細胞ソースとして、末梢血由来の白血球を用いることが出来ないかと考えて本研究の実施に取り組んで来た。しかし、本研究期間に実施した様々な検証結果から、マウスおよびヒトのいずれにおいても末梢血中の血球細胞は個体差が大きく、一律の反応結果を得るための条件を見つけることが出来なかった。そこで、循環末梢血中の血球細胞全体を用いるのではなく、末梢血を循環する CD34 陽性細胞に着目したところ、末梢血中の造血幹細胞は造血能を殆ど持たないにも関わらず、血管再生、修復能を示すことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogawa Y, Akamatsu R, Fuchizaki A, Kazuta Y, Orié S, Tanaka M, Kikuchi-Taura A, Kimura T, Taguchi A	4. 巻 31
2. 論文標題 Gap junction-mediated transport of metabolites between stem cells and vascular endothelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/09636897221136151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川 優子
2. 発表標題 他家移植可能な造血幹細胞製剤の 脳梗塞治療メカニズム
3. 学会等名 再生医療学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川 優子
2. 発表標題 他家移植可能な造血幹細胞の治療効果：投与後の脳の代謝変化
3. 学会等名 脳循環代謝学会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------