

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791509

研究課題名(和文) 血管内皮前駆細胞の機能強化と磁気誘導による次世代型血管新生療法の開発

研究課題名(英文) FOXO4-knockdown suppresses oxidative stress-induced apoptosis of early pro-angiogenic cells and augments their neovascularization capacities in ischemic limbs

研究代表者

仲吉 孝晴 (NAKAYOSHI, TAKAHARU)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：90511824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：重度の虚血状態にある下肢を救済する治療法の一つに、血管新生細胞を虚血下肢に筋注投与する血管新生療法があります。ところが、その投与された細胞の多くは虚血組織内に存在する酸化ストレスによって死に至るため、その血管新生能力を十分に発揮できていないことが予想されていました。我々はFOXO4転写因子の発現を体外で人工的に減弱させ、酸化ストレスに対して強い抵抗性を持つ改良型血管新生細胞を作製することに成功しました。実際にその細胞を動物モデルの虚血下肢に筋注投与したところ、より多くの血管新生細胞が虚血組織内で生存し、血管新生能力が向上することを確認いたしました。

研究成果の概要(英文)：We assessed whether FOXO4-knockdown EPCs (FOXO4KD-EPCs) could suppress the oxidative stress-induced apoptosis and augment the neovascularization capacity in ischemic limbs. We transfected small interfering RNA (siRNA) targeted against FOXO4 to EPCs cultured from human peripheral mononuclear cells. In western blotting analyses, FOXO4 siRNA-transfected EPCs (FOXO4 KD -EPCs) showed 45% knockdown of FOXO4 and decreased expressions of pro-apoptotic proteins such as Bim and cleaved caspase-3. The FOXO4 knockdown significantly reduced the percentage of TUNEL-positive apoptotic EPCs induced by H2O2 in the flow cytometry analysis. Intramuscular injection of FOXO4 KD -EPCs to hind-limb ischemia rats significantly increased ischemic/non-ischemic hind-limb blood flow ratio and capillary density of the ischemic adductor muscle after 4 days compared to the injection of Nega-EPCs. FOXO4 KD -EPCs showed anti-apoptosis capacity, which may have contributed to neovascularization in ischemic tissues.

研究分野：循環器内科学

科研費の分科・細目：分子血管病態学

キーワード：前血管新生細胞 アポトーシス 酸化ストレス FOXO

様式 C - 19、F - 19、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は重症虚血下肢を救済すべく、前血管新生細胞(early pro-angiogenic cells:EPCs)の筋肉内投与による血管新生療法を実施しているが、十分な効果が得られない例も経験する。その理由の一つとして虚血筋組織内の酸化ストレスによる EPCs の生存能低下が考えられる。最近酸化ストレスによる EPCs のアポトーシス制御に FOXO4 (Forkhead transcription factor 4)が関与していることが報告された。

2. 研究の目的

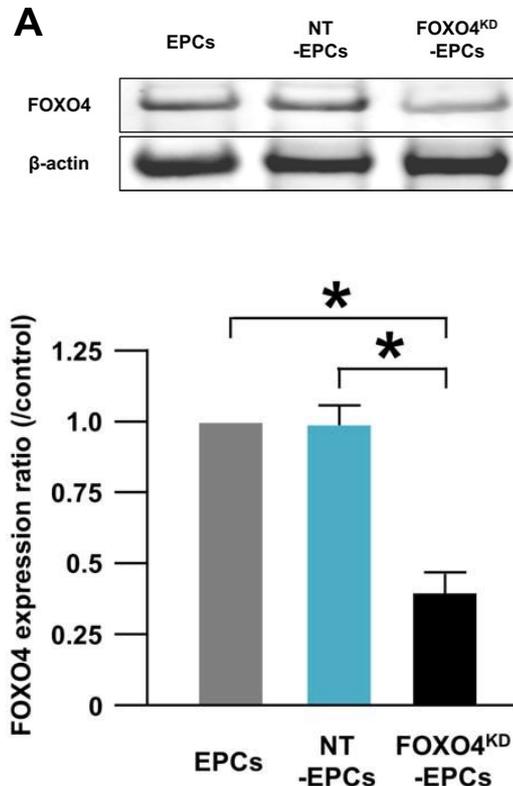
我々は EPCs の FOXO4 発現を予めノックダウンすることで、虚血肢に投与された EPCs の抗アポトーシス能および血管新生能が増強できるかを検証した。

3. 研究の方法

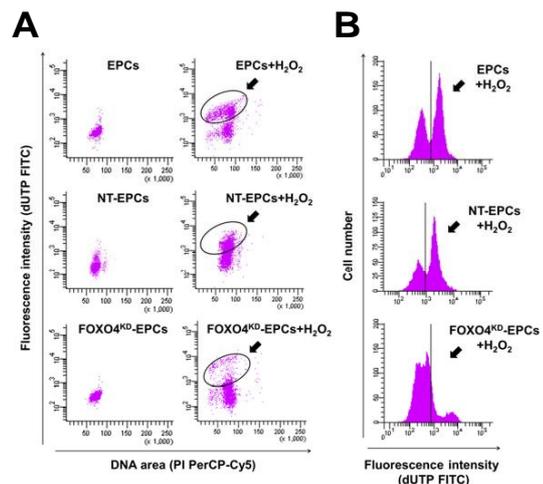
ヒト末梢血中の単核球細胞から EPCs を分離培養し、magnetofection 法で FOXO4 siRNA を導入し FOXO4 ノックダウン EPCs を作製した。同 EPCs のアポトーシス耐性能をフローサイトメトリー法にて評価し、ウェスタンブロット法にて EPCs 内のアポトーシス促進蛋白の発現を評価した。続いて同 EPCs を下肢虚血モデルに筋肉内投与し、in vivo における血流改善能および抗アポトーシス能を検討評価した。

4. 研究成果

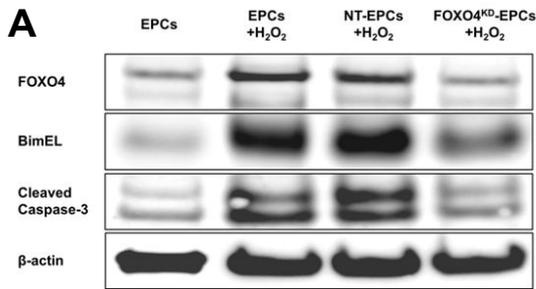
ヒト末梢血中の単核球細胞から EPCs を分離培養し、magnetofection 法で FOXO4 siRNA を導入し FOXO4 の発現抑制を下記のごとくウェスタンブロット法にて確認した。この手法にて FOXO4 ノックダウン EPCs を作製した。



FOXO4 ノックダウン EPCs は in vitro において酸化ストレスに対するアポトーシスが抑制されることをフローサイトメトリー法にて確認した。

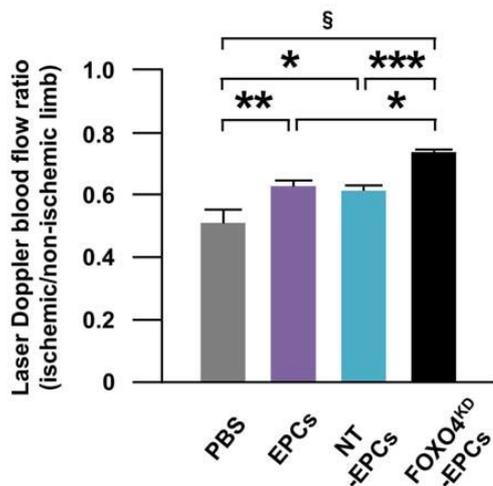


EPCs 内のアポトーシス促進蛋白である BimEL や cleaved caspase-3 の発現も減少していることがウェスタンブロット法にて確認できた。

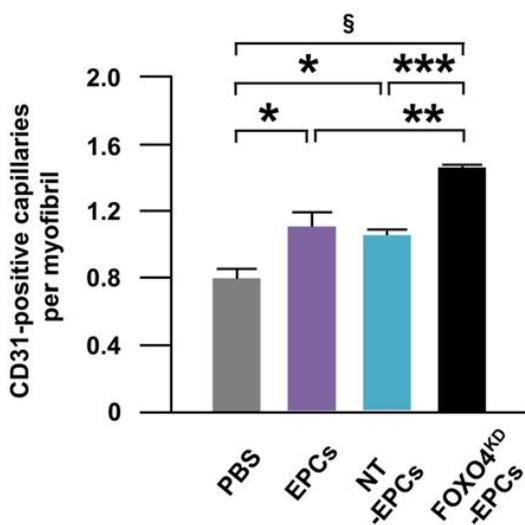


FOXO4 ノックダウン EPCs をラット虚血肢に筋注投与したところ、EPCs 単独投与群と比較し、虚血肢の血流改善効果および毛細血管密度の増加を認めた。

(血流評価)



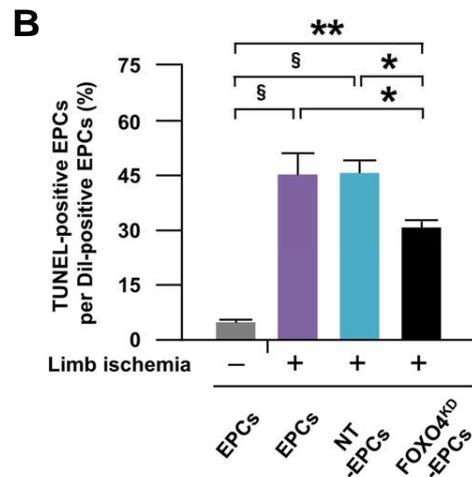
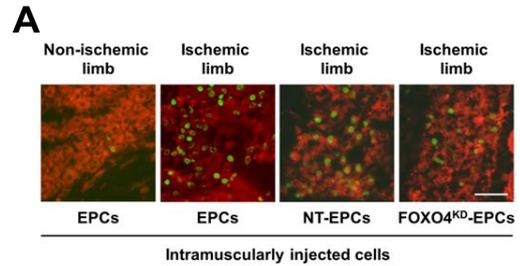
(毛細血管密度評価)



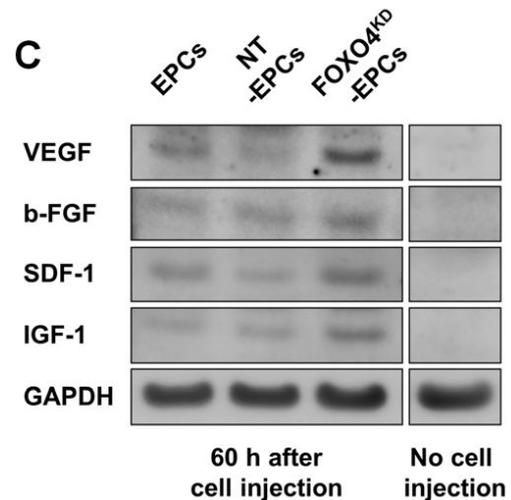
FOXO4 ノックダウン EPCs は下肢虚血筋肉内においてアポトーシスが抑制されることが TUNEL 染色で確認できた。これより生存能が

増強した結果、血管新生効果が増強されることが確認できた。

(生存能評価)



虚血肢において、FOXO4 ノックダウン EPCs 筋肉内投与群は筋組織内において VEGF、b-FGF、SDF-1、IGF-1 の発現が亢進していることが確認された。



結語

FOXO4 をノックダウンすることで EPCs の酸化ストレスに対する抗アポトーシス能力を高めることができ、既存の血管新生療法の効果

を増強させる新たな手段となり得る可能性がある。

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1件)

1. Nakayoshi T, Sasaki K, Kajimoto H, Koiwaya H, Ohtsuka M, Ueno T, Chibana H, Itaya N, Sasaki M, Yokoyama S, Fukumoto Y, Imaizumi T: FOXO4-Knockdown Suppresses Oxidative Stress-Induced Apoptosis of Early Pro-Angiogenic Cells and Augments Their Neovascularization capacities in ischemic limbs.

PLoS One 24; 9 (3), e92626, 2014
DOI 10.1371 査読あり

[学会発表](計5件)

1. The 18th Vascular Biology Meeting, Kyoto, Japan, April 14-17, 2014

Takaharu Nakayoshi¹, Ken-ichiro Sasaki¹, Tsutomu Imaizumi², Takafumi Ueno¹, Hidemi Kajimoto³, Hiroki Aoki³, Shinji Yokoyama¹, Yasuyuki Toyama¹, Hiroshi Koiwaya¹, Masanori Ohtsuka¹, Yoshiaki Mitsutake¹, Naoki Itaya¹, Hidetoshi Chibana¹, and Yoshihiro Fukumoto¹

FOXO4-knockdown augmented anti-apoptosis and neovascularization capacities of human early pro-angiogenic cells in rat ischemic limbs

2. 第78回日本循環器学会学術集会(2014年3月21日~23日:東京)

仲吉孝晴、佐々木健一郎、上野高史、梶本英美、横山晋二、大塚昌紀、小岩屋宏、板家直樹、知花英俊、佐々木 雅浩、今泉勉、福本義弘:

Augmented Neovascularization Capacities of Endothelial Progenitors Cells via Anti-Apoptotic Effect by FOXO4 siRNA Transfection in Rats.

3. 第77回日本循環器学会学術集会(2013年3月15日~17日:横浜)

仲吉孝晴、佐々木健一郎、上野高史、梶本英美、横山晋二、大塚昌紀、小岩屋宏、板家直樹、知花英俊、今泉勉:

FOXO4-knockdown Augments Anti-apoptosis and Neovascularization Capacities of Human Early Endothelial Progenitors Cells.

4. The 19th Asian Pacific Society of Cardiology 2013 Congress, Pattaya, Thailand, February 21-24, 2013

Nakayoshi T, Sasaki K, Ueno T, Kajimoto H, Yokoyama S, Ohtsuka M, Koiwaya H, Itaya N, Tibana H, Imaizumi T:

FOXO4-knockdown Augmented Anti-apoptosis and Neovascularization Capacities of Atherosclerotic Patient-derived Circulating Angiogenic Cells.

5. 第49回日本臨床分子医学会学術集会(2012年4月14日:京都)

仲吉孝晴、佐々木健一郎、上野高史、梶本英美、青木浩樹、横山晋二、外山康之、小岩屋宏、大塚昌紀、光武良亮、板家直樹、知花英俊、今泉勉:

Augmented neovascularization capacities of circulating angiogenic cells via anti-apoptotic effect by FOXO4 siRNA transfection in rats

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲吉 孝晴 (NAKAYOSHI TAKAHARU)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号 90511824

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

()