

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462109

研究課題名(和文) 骨髄細胞シートの難治性下肢虚血潰瘍治療への応用

研究課題名(英文) Application of cell sheets for therapy of refractory ulcers in ischemic hindlimbs

研究代表者

村上 雅憲 (MURAKAMI, Masanori)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：30448295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト細胞混合シート(ヒト末梢血単核球とヒト線維芽細胞から構成)の機能解析を行った。ヒト細胞混合シートから分泌されるVEGF量は、ヒト線維芽細胞から分泌されるVEGF量と比較して約2倍に増加していた。さらに、低酸素(2%酸素)環境下で培養したヒト細胞混合シートから分泌されるVEGF量は、通常酸素(20%酸素)環境下で培養したヒト細胞混合シートから分泌されるVEGF量と比較して約2倍に増加していた。これらの結果から、ヒト末梢血単核球とヒト線維芽細胞との細胞混合および低酸素環境下での培養は、VEGF産生能を亢進させることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We performed functional analyses of mixed human cell sheets consisting of human peripheral blood mononuclear cells and human fibroblasts. The amount of vascular endothelial growth factor (VEGF) secreted from mixed human cell sheets was 2-fold higher than that from human fibroblasts. Furthermore, the amount of vascular endothelial growth factor (VEGF) secreted from mixed human cell sheets cultured under hypoxia (2% oxygen) was 2-fold higher than that from mixed human cell sheets cultured under normoxia (20% oxygen). These results revealed that mixture of human peripheral blood mononuclear cells with human fibroblasts and cell culture of mixed human cell sheets under hypoxia lead to enhanced secretion of VEGF.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：ヒト細胞混合シート ヒト末梢血単核球 ヒト線維芽細胞 VEGF

1. 研究開始当初の背景

虚血部位に筋肉注射にて骨髓単核球細胞を移植する血管新生(血管再生)療法には一定の治療効果が認められているが、十分な治療効果が得られなかった症例も多く存在し、より効果的な治療法の開発が望まれている。そこで、我々は骨髓細胞による治療効果を最大限に引き出すため、骨髓細胞由来細胞シートを用いた虚血性足潰瘍病変部における血管新生促進治療法を考案した。

2. 研究の目的

本研究では、虚血性足潰瘍における骨髓細胞由来細胞シートによる血管新生を評価し、その有用性を検討する。

3. 研究の方法

骨髓細胞由来細胞シートの作製と虚血性足潰瘍モデルマウスの作製は以下の通りである。

- (1) 骨髓細胞由来細胞シートの作製：温度応答性細胞培養器材を用いて、マウスの骨髓細胞から細胞シートを作製する。得られた細胞シートの一部を用いて、血管内皮細胞のマーカーである Tie-1, Tie-2, CD31, CD34、造血幹細胞のマーカーである Sca-1, Notch1, CD34, CD90, CD133 が陽性である細胞の割合を免疫染色、FACS 解析により調べる。
- (2) 虚血性足潰瘍モデルマウスの作製：マウスの左総大腿動静脈から左伏在動静脈までを結紮切除して、下肢虚血マウスとし、引き続いて、径 4 mm のパンチャーを用いて下腿に皮膚欠損を作製する。

虚血性足潰瘍モデルマウスの病変部分に骨髓細胞由来細胞シートを貼り付け、手術後 3, 5, 7, 14, 28 日目にレーザードップラーを用いて潰瘍部分および虚血下肢部分の血流の回復を評価する。さらに、潰瘍部分および虚血下肢部分の微小血管レベルでの血管新生の度合いを評価するため、組織標本作製し、CD31 (PECAM-1)陽性細胞を免疫染色により調べる。

4. 研究成果

C57BL/6 にストレプトゾトシンを投与して高血糖となった糖尿病マウスを用いて、虚血性足潰瘍を作製した。また、温度応答性細胞培養器材を用いて、マウスの骨髓細胞から細胞シートを作製し、FACS 解析により血管内皮細胞のマーカーである CD31, CD34、造血幹細胞のマーカーである Sca-1, CD90, CD133 の陽性率の検討を試みたが、うまく解析が行えなかった。これは、細胞シートが十分にシングルな細胞に分離されていなかったためと考えられる。

骨髓細胞由来細胞シートの性状が解析できなかったため、当初の予定を変更し、我々の別の研究課題で解析が進行中で、難治性皮膚潰瘍に対する有効性が確認されているマウス細胞混合シート(マウス末梢血単核球とマウス線維芽細胞から構成)を参考として、ヒト細胞混合シート(ヒト末梢血単核球とヒト線維芽細胞から構成)の機能解析を行った。ELISAにて、VEGF 分泌量を測定したところ、ヒト末梢血単核球からは、VEGF は分泌されておらず、ヒト細胞混合シートから分泌される VEGF 量は、ヒト線維芽細胞から分泌される VEGF 量と比較して約 2 倍に増加していることが明らかになった(図 1)。さらに、2%酸素環境下で培養したヒト細胞混合シートから分泌される VEGF 量は、20%酸素環境下で培養したヒト細胞混合シートから分泌される VEGF 量と比較して約 2 倍に増加していることが明らかになった(図 1, 図 2)。これらの結果から、ヒト末梢血単核球とヒト線維芽細胞との細胞混合および低酸素環境下での培養は、VEGF 産生能を亢進させることが明らかになった。

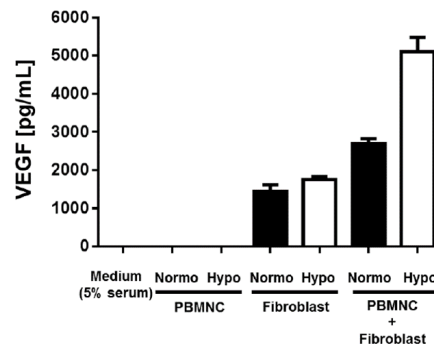


図 1. 通常酸素環境下および低酸素環境下におけるヒト末梢血単核球、ヒト線維芽細胞、ヒト細胞混合シートから分泌された VEGF 量

Normo; 通常酸素環境下、Hypo; 低酸素環境下、PBMNC; ヒト末梢血単核球、Fibroblast; ヒト線維芽細胞、PBMNC+Fibroblast; ヒト細胞混合シート

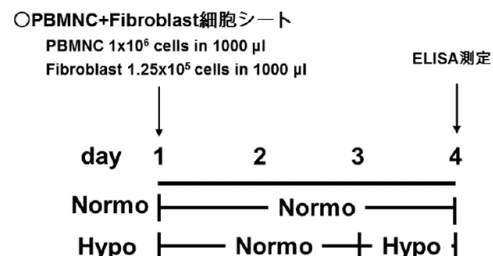


図 2. 低酸素環境下での細胞培養プロトコール

さらに、ヒト細胞混合シートから分泌される VEGF 量が、ヒト線維芽細胞から分泌される VEGF 量と比較して約 2 倍に増加している機序を解明するため、ヒト末梢血単核球のみから分泌されているサイトカイン 12 種をヒト線維芽細胞に添加し、VEGF 分泌量を ELISA にて測定した。その結果、TGF- $\beta$ 1, PDGF-BB を添加したヒト線維芽細胞では、無添加のヒト線維芽細胞に比べて、VEGF 分泌量が増加し(図 3) PDGF-AA, HB-EGF, CXCL16, CXCL1, CCL2, IL-1ra, CCL4, LIX, IP-10, CCL3 を添加したヒト線維芽細胞では、無添加のヒト線維芽細胞に比べて、VEGF 分泌量が同程度あるいはやや増加していることが明らかになった(図 3)。

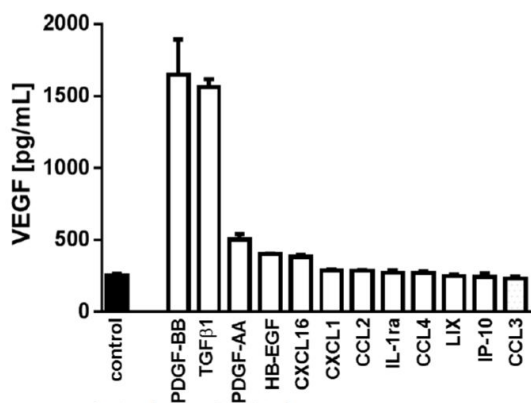


図 3. PDGF-BB, TGF- $\beta$ 1, PDGF-AA, HB-EGF, CXCL16, CXCL1, CCL2, IL-1ra, CCL4, LIX, IP-10, CCL3 を添加されたヒト線維芽細胞の VEGF 分泌量

各種サイトカインのヒト線維芽細胞への添加濃度

- PDGF-BB (100 ng/mL)
- TGF $\beta$ 1 (10 ng/mL)
- PDGF-AA (100 ng/mL)
- HB-EGF (100 ng/mL)
- CXCL16 (100 ng/mL)
- CXCL1 (300 ng/mL)
- CCL2 (100 ng/mL)
- IL-1ra (40 ng/mL)
- CCL4 (10 ng/mL)
- LIX (100 ng/mL)
- IP-10 (50 ng/mL)
- CCL3 (10 ng/mL)

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 1 件)

竹内由利子、上野耕司、溝口高弘、佐村誠、原田剛佑、山下修、西本新、細山徹、末廣晃太郎、森景則保、濱野公一  
「末梢血単核球と線維芽細胞からなるヒト細胞混合シートの難治性皮膚潰瘍治療に向けて」第 47 回日本心臓血管外科学会学術総会 2017 年 2 月 27 日~3 月 1 日 グランドニッコー東京台場(東京都港区)

[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]  
ホームページ等  
<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~surg-1>

6. 研究組織

(1)研究代表者  
村上 雅憲 (MURAKAMI, Masanori)  
山口大学・医学部・特別医学研究員  
研究者番号：30448295

(2)研究分担者  
濱野 公一 (HAMANO, Kimikazu)  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：60263787

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし