

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10244

研究課題名(和文)血管成熟化に着目した重度末梢血管障害に対する新規細胞移植療法の開発

研究課題名(英文) Novel cell-based therapeutic strategies focusing on vessel maturation for severe peripheral vascular diseases

研究代表者

細山 徹 (HOSOYAMA, Tohru)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20638803

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)：重症末梢血管障害に対する細胞移植療法は有効な治療法と考えられるが、より高い治療効果を得るためには更なる改良が必要である。本研究では、低酸素プレコンディショニング法により機能賦活化した末梢血単核球移植による新生血管誘導に加えて血管成熟化因子を併用する新たな治療法の有用性の検証と、その作用機序の解明を目指した。結果、アペリンによる血管平滑筋細胞の増殖および浸潤の促進により虚血下肢に誘導された新生血管が成熟化することが明らかとなった。本併用療法は、作用機序が明らかな安全性の高い新たな治療法として重症下肢虚血治療に有用である。

研究成果の概要(英文)：Although cell-based therapy for severe peripheral vascular diseases is promising, it is needed to be improved to obtain higher therapeutic outcomes for clinical application. In this study, we investigated if combination therapy of cell-based therapeutic angiogenesis with vessel maturing drug was useful for severe hindlimb ischemia, and we also investigated to clarify the mechanism of its action. As a result, this hybrid therapeutic strategy resulted in effective maturation of new vessels by cell-based therapy. This strategy will be expected to become novel and low invasive therapeutic approach for severe hindlimb ischemia.

研究分野：心臓・血管外科

キーワード：細胞移植治療 下肢虚血 低酸素プレコンディショニング アペリン

## 1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループは、自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法を確立し、世界に先駆けて実施した重症下肢虚血患者に対する臨床試験においてその有効性と安全性を証明してきた (Hamano et al., *Jpn Circ J.* 2001; Esato et al., *Cell Transplant.* 2002)。現在までに、骨髄幹細胞を含む様々な体性幹細胞種による細胞移植治療が世界中で実施され、虚血組織の血流増加や臨床症状の改善などその有効性の裏付けがなされており (Tateishi-Yuyama et al., *Lancet.* 2002; Perin et al., *Circulation.* 2003) 本法の有用性に疑いの余地はない。しかしながら、細胞移植療法において外科手術に匹敵するほどの高い治療効果は得られていないのが現状であり、実臨床で更なる効果を得る為には、「移植細胞の生着性を向上させ、かつ新生血管を成熟させる」、より強力な治療法の開発が必要である。

### 低酸素プレコンディショニングによる生着率の向上

我々は、虚血組織における細胞生着率を向上させる方策として、細胞を低酸素条件に短時間暴露し細胞機能の賦活化を誘導する低酸素プレコンディショニング (HPC) を考案した。本法により、血管成長因子 VEGF の産生亢進・酸化ストレス抵抗性の獲得・細胞接着分子発現の増加が誘導され、虚血組織における細胞生着率の向上と血管新生の亢進が生じる (Kudo, Hosoyama et al., *Am J Transl Res.* 2014)。また最近、中型動物モデルを用いた前臨床試験において、HPC により機能賦活化した自己細胞の移植により、虚血下肢におけるより効果的な血流改善が誘導されることを証明した (Kudo, Hosoyama, et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 2014)。

### 血管成熟化因子アペリン

アペリンは近年同定された血管成熟化制御因子であり、受容体 APJ を介して作用する (Kidoya et al., *Blood.* 2010)。通常、APJ は血管内皮細胞 (EPC) において VEGF の制御下で発現し、その増殖や分化を制御しながら血管成熟化を促す (Takakura et al., *Thromb Haemost.* 2009)。

## 2. 研究の目的

我々は、「低酸素刺激により機能賦活化した末梢血単核球の移植」と「血管成熟化因子アペリンの投与」を併用した新たな血管再生療法を考案し、末梢血管障害に対する細胞移植療法における課題—「細胞生着率の低さ」と「未熟な新生血管形成による血流回復不全」—を解決し得るか否かを検証してきた。しかし、本併用療法における詳細な作用機序は明らかではなく、今後、実臨床で用いる際

に重度の副作用などの危険が伴う可能性も否定はできない。

本研究では、「アペリンの標的細胞」や「アペリン投与と末梢血単核球細胞移植の併用療法の作用機序」を明らかにし、本併用療法の作用機序を理解した上で本法の臨床応用の可能性を明らかにすることとした。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス下肢虚血モデルの作製

本研究には 8-9 週齢の雄 C57BL/6 マウスを用いた。下肢虚血モデルは、左肢大腿動脈の結紮および全ての側副枝の切離により作製した。全ての動物試験は、山口大学動物使用委員会の承認を受けて実施した。

### (2) 定量的 RT-PCR

マウス下肢虚血モデルより虚血動脈を採取し、RNeasy Plus Mini kit を用いてトータル RNA を抽出、さらに PrimeScript RT Master Mix を用いて逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型としたマウス APJ に対する定量的 RT-PCR は以下のプライマーセット：5'-CCA CTG TGG GCC ACT TAT ACC -3'; 5'-CAG CCT TAG CCG AGC ATT G -3'、および QuantiTect SYBR Green PCR Kit を用いて行った。

### (3) 細胞増殖アッセイおよび細胞浸潤アッセイ

アペリンの血管平滑筋細胞の増殖能に対する効果について明らかにするために、WST-8 アッセイ (ナカライテスク社) を行った。1 x 10<sup>4</sup> 個の血管平滑筋細胞を 96 穴プレートに播種し、アペリン (1 μM) を含むもしくは含まない条件で 48 時間培養した。

アペリンの細胞浸潤能に対する効果を明らかにするために、8.0-μm 径のトランスウェルを用い、ヒト血管平滑筋初代培養細胞をアペリン (1 μM) で 24 時間処理したのちにトランスウェル上に播種した (1 ウェル当たり 5 x 10<sup>4</sup> 個の細胞)。播種 12 時間後に細胞を固定しクリスタルバイオレットにより染色、トランスウェルを通過した細胞数を測定した。

### (4) マウス下肢虚血モデルへの末梢血単核球とアペリンの同時投与

マウス末梢血より単離した末梢血単核球を 2%酸素の条件で 24 時間培養した (低酸素プレコンディショニング)。下肢虚血を施した 40 匹のマウスに対して、末梢血単核球 (筋注) とアペリン (腹腔内) の投与を施した (いずれも下肢虚血処理直後から投与)。末梢血単核球は、5 x 10<sup>4</sup> 個の細胞を 4 日間連続で移植し、アペリンは 7 日間連続投与した。投与後の下肢血流変化をレーザー Doppler 血流計により、移植 0、3、7、14、21、28 日後に測定し、虚血を施していない右足の血流

で標準化した値を群間で比較した。

#### (5) 血管反応性の評価

新生血管の機能性(拡張性)評価をするために、アセチルコリンを投与しレーザードップラー血流計で測定した。この際、阻害剤としてNO阻害剤(L-NAME)も用いその特異性について判断した。

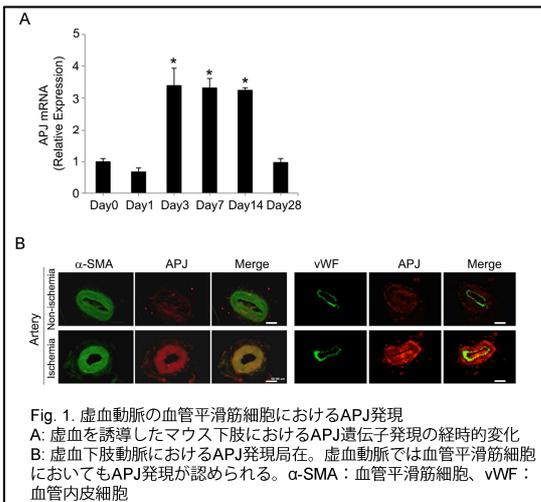
#### (6) 統計処理

多群間比較には one-way ANOVA、2群間比較には student's t-test を用い、 $p < 0.05$  もしくは  $p < 0.01$  を統計的に有意な差と判断した。すべての統計解析には、STATA software (StataCorp 社) を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) マウス虚血下肢におけるアペリン受容体の発現

アペリンは、7回膜貫通型受容体であるAPJに結合し、その生理学的作用を発揮する。これまでの報告では、血管でのAPJ発現は血管内皮細胞に限局するとされてきたが、虚血下肢内血管においても同じことが言えるかは明らかではない。そこでまず、虚血下肢における経時的APJ発現変化およびその局在について検証した。大腿動脈結紮および副側枝の切離により作製したマウス下肢虚血モ

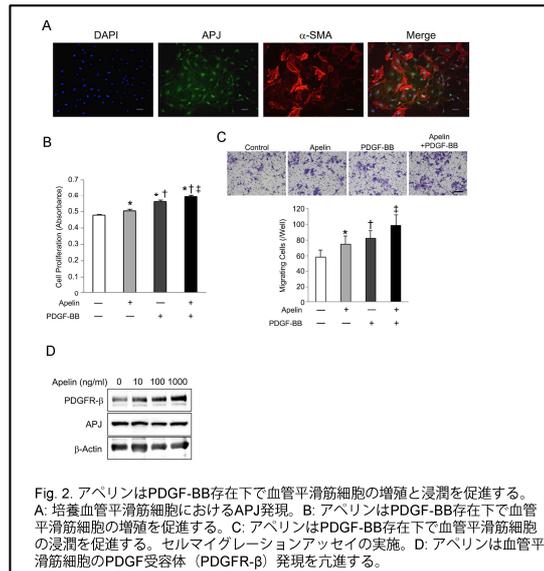


デルにおいては、虚血開始3日目から14日にかけてAPJ mRNA発現が増加し、副側血行路が形成され血流が自然回復する28日目には発現が定常状態まで回復した(Fig. 1A)。続いて、虚血下肢血管におけるAPJ発現細胞の同定を試みた。虚血開始14日後の下肢筋切片を作製し、虚血部と非虚血部における動脈におけるAPJ発現について、血管平滑筋マーカー(α-SMA)、血管内皮マーカー(vWF)、APJに対する免疫蛍光染色を用いて検討したところ、非虚血部動脈においてはAPJ発現が血管内皮に限局していたのに対して、虚血部においては血管内皮のみならず血管平滑筋においてもAPJ発現が認められた(Fig. 1B)。このことは、虚血下肢血管に

おいてアペリンに反応性を示す細胞が2種類存在することを示しており、アペリン/APJの新たな作用機序が示唆される。

#### (2) アペリンは血管平滑筋のPDGF受容体発現増加を促し、増殖および浸潤を促進する

先の実験において、アペリン受容体APJが血管平滑筋にも局在が認められたことから、アペリンの血管平滑筋細胞に対する作用を検討した。マウス血管平滑筋細胞を用いて、APJ発現を確認したところ、組織の結果と同

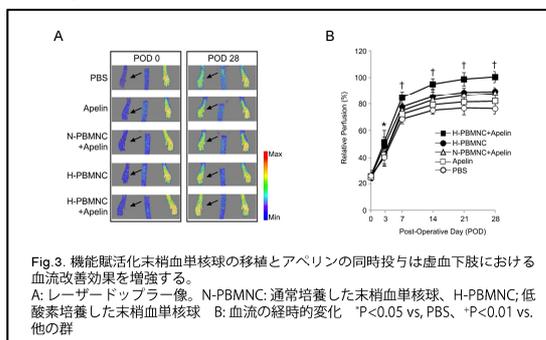


様に培養平滑筋細胞においてもAPJ発現を認めた(Fig. 2A)。続いて、血管平滑筋の増殖を促すことが知られているPDGF-BB存在下でのアペリンの作用について検討したところ、アペリンはPDGF-BBと協動的に働き血管平滑筋細胞の増殖および浸潤を促進することが明らかとなった(Fig. 2B, C)。血管平滑筋細胞におけるPDGF受容体発現がアペリン添加により亢進することから(Fig. 2D)アペリンによりPDGFに対する感受性が増した平滑筋細胞が結果的に増殖・浸潤性を増したという作用機序が想定される。

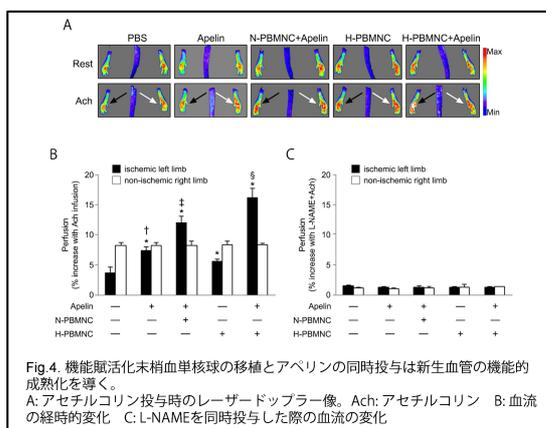
#### (3) 機能賦活化した末梢血単核球とアペリンの同時投与による下肢虚血改善効果

我々はこれまでに、末梢血単核球細胞に低酸素刺激を施すと新生血管誘導効果が亢進することを明らかにしており、本研究で明らかとなったアペリンの虚血平滑筋細胞への作用と組み合わせることに、より高い治療効果が得られると仮定した。そこで、低酸素刺激した末梢血単核球とアペリンをマウス下肢虚血モデルへ同時投与し、その後の血流回復について検証した。その結果、機能賦活化した末梢血単核球とアペリンの同時投与により、単独投与群よりもより高い血流改善効果が得られることが明らかとなった(Fig. 3A, B)。このことは、機能賦活化した末梢血単核球の移植により誘導された新生血管がアペリンの同時投与により成熟化したと推察さ

れる。



さらに本研究では、アペリン同時投与により成熟化した新生血管が機能的にも成熟化しているか否かを明らかにする目的で、末梢血単核球およびアペリンを同時投与した虚血肢マウスに血管拡張作用を有するアセチルコリンを投与し、血流変化をレーザードップラー血流計により測定した。その結果、予想通り同時投与群においてアセチルコリン投与によりより高い血流量を認めた。この効果は、NO 阻害剤である L-NAME 投与によりキャンセルされたことから、同時投与により新生した血管は、形態学的にも機能的にも成熟していることが証明された ( Fig.4 )。



#### (4) まとめ

本研究では、我々がこれまでに進めてきた「下肢虚血に対する末梢血単核球移植療法」を実臨床で効果的・普遍的に使用できる新たな方法を開発することを目的とし、「機能賦活化した末梢血単核球と血管成熟化因子アペリンとの同時投与」の有効性について検証した。特に、アペリンの作用点がある虚血肢のどこにあるのかという点に注目して研究を進め、虚血組織での血管平滑筋細胞がアペリンに対して感受性を示すことを明らかにした。アペリンは製剤化の動きもあり臨床での使用も期待できることから、今後は、低酸素刺激による末梢血単核球の機能賦活化とアペリンを併用した本法の有効性について、大型動物での非臨床試験を経て早期の臨床試験を進めていく。

#### 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 2 件)

1. Samura M, Hosoyama T, Takeuchi Y, Ueno K, Morikage N, Hamano K. Therapeutic strategies for cell-based neovascularization in critical limb ischemia. J Transl Med. 2017. 15(1): 49. DOI: 10.1186/s12967-017-1153-4. 査読あり

2. Samura M, Morikage N, Suehiro K, Tanaka Y, Nakamura T, Nishimoto A, Ueno K, Hosoyama T, Hamano K. Combinatorial Treatment with Apelin-13 Enhances the Therapeutic Efficacy of a Preconditioned Cell-Based Therapy for Peripheral Ischemia. Sci Rep. 2016. 6: 19379. DOI: 10.1038/srep19379. 査読あり

{ 学会発表 } (計 1 件)

1. 佐村 誠、細山 徹、田中裕也、中村玉美、工藤智明、釘宮成二、上野耕司、西本 新、森景則保、美甘章仁、濱野公二 「マウス下肢虚血モデルにおける末梢血単核球移植と Apelin 同時投与による治療効果の検証」 第 115 回日本外科学会定期学術集会 2015 年 4 月 16 日-18 日 名古屋国際会議場 (名古屋市)

{ 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細山 徹 (HOSOYAMA, Tohru)  
山口大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：20638803

(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

森景 則保 (MORIKAGE, Noriyasu)  
山口大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：50335741

(3) 研究協力者

なし