

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19923

研究課題名(和文)末梢血管障害に対する低酸素プレコンディショニング細胞移植療法のプレ臨床的検証

研究課題名(英文)Pre-clinical validation of hypoxic preconditioning peripheral blood-derived cells transplantation therapy for peripheral vascular injury

研究代表者

工藤 智明(Kudo, Tomoaki)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：30750640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、臨床応用を目指しヒト末梢血単核球を用いて低酸素プレコンディショニング(HPC)至適条件の検討及びHPC後のヒト末梢血単核球をマウス下肢虚血モデルに移植することで血管再生治療効果を評価した。

ヒト末梢血単核球におけるHPC至適条件は、2% O<sub>2</sub>の条件下で24時間培養を行うことが、血管再生能における細胞機能等が増強されることが示された。マウス下肢虚血モデルに2% O<sub>2</sub>の条件下で24時間培養を行った末梢血単核球を移植した群で有意に血流改善効果を認めた。以上より、2% O<sub>2</sub>の条件下で24時間HPCを行ったヒト末梢血単核球を用いることでマウス下肢虚血モデルに血流改善効果があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to examine the optimum condition of hypoxic preconditioning (HPC) using human peripheral blood mononuclear cells (HPBMCs) and examine whether improve mouse limb ischemia by transplanting HPBMCs before clinical application.

The optimum condition of HPC in HPBMCs was shown that culturing for 24 hours under the condition of 2% O<sub>2</sub> enhanced the cell function in cell adhesion ability, cell survival, and revascularization. The blood flow improving effect was showed significantly in the group in which HPBMCs (culturing for 24 hours under the condition of 2% O<sub>2</sub>) were transplanted into the mouse limb ischemia model. It was suggested that HPBMCs (culturing for 24 hours under the condition of 2% O<sub>2</sub>) had the most blood flow improving effect in the mouse limb ischemia model.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：低酸素プレコンディショニング 末梢血単核球

## 1. 研究開始当初の背景

自己骨髄由来細胞を用いた血管再生治療は重症虚血患者に対する治療法で多くの施設で臨床応用され有効性が報告されている。しかし、虚血組織内(酸化ストレス亢進状態)での移植細胞の生着率および生存率が低く、必ずしも十分な治療効果が得られているとはいえない。従って、移植後の虚血組織内での細胞生着率および生存率を上昇させることが治療効果の向上につながると考えられた。その解決策として移植細胞への遺伝子導入や *ex vivo* での増幅といった方法が考案され、その有用性が報告されているが、操作の複雑さ、要する時間の長さ、安全性等の課題が残っている。

これまでに、中型動物(ラビット)および小型動物(マウス)の末梢血単核球細胞を用いた移植細胞機能を増強させる方法として、移植前に細胞を *ex vivo* で低酸素培養(低酸素プレコンディショニング)することにより、短時間かつ簡便に移植細胞機能が増強されることを報告し、その有用性を証明してきた。

しかし、中型動物(ラビット)および小動物(マウス)で証明された末梢血単核球の細胞機能増強効果が、同様の低酸素プレコンディショニングの条件( $O_2$ :2%、 $CO_2$ :5%、33℃、24時間培養)がヒト末梢血単核球で当てはまるとは限らない。そこで、ヒト末梢血単核球に対する低酸素プレコンディショニングの至適条件の検討と、至適条件で培養したヒト末梢血単核球の効果をマウス下肢虚血モデルを用いて検証する必要があると考えられた。

## 2. 研究の目的

ヒト末梢血単核球に対する低酸素プレコンディショニングの至適条件の検討と増強した細胞機能の評価を小動物を用いて検証することである。

## 3. 研究の方法

### (1) *in vitro*での解析

健常者から血液を採集し、比重遠心法にて末梢血単核球を単離した。処理血液量は循環血液(体重の約8%)の2倍で、約3時間かけて単核球細胞( $5-10 \times 10^9$ 個)を採取した。採取した末梢血単核球を10%自己血清添加リンパ球培養用培地(GT-T503<sup>®</sup>; タカラバイオ社)を用いて $5 \times 10^6$  cells/mlに希釈し浮遊させた。末梢血単核球をインキュベーター内で培養した。培養を様々な条件( $O_2$ 濃度、 $CO_2$ 濃度、温度、時間など)で行い、ヒト末梢血単核球における低酸素プレコンディショニングの至適条件の検討、およびヒト末梢血単核球の細胞接着能、細胞生存、血管再生能を評価した。

**細胞接着:** フィブリネクチンコーティングした培養皿に細胞を接着させ、通常培養を1日した後、PBS洗浄後に接着細胞数を評価する。また、通常培養を1日した後、RT-PCRで *CXCR4* の発現量を評価する。

**細胞生存:** 酸化ストレス抵抗性に基づいた細胞生存について評価する。酸化ストレス負荷( $H_2O_2$ 添加)および負荷なし環境下で3日間培養し、蛍光プローブDCFを用いた細胞内の活性酸素量、PIおよびannexinによる細胞生存率およびアポトーシスについて評価を行う。

**血管再生能:** 血管再生因子の産生能を評価するために、通常培養3日後の上清中の血管再生因子産生量をELISA法で測定する。

### (2) *in vivo*での解析

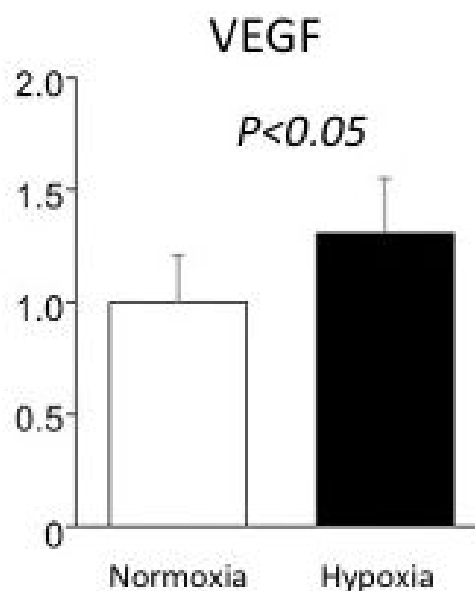
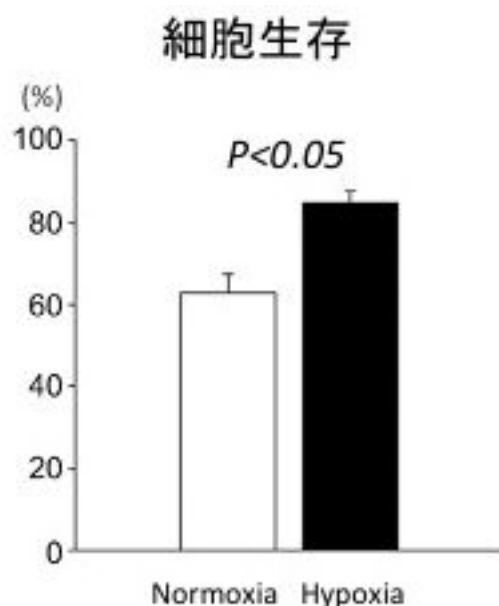
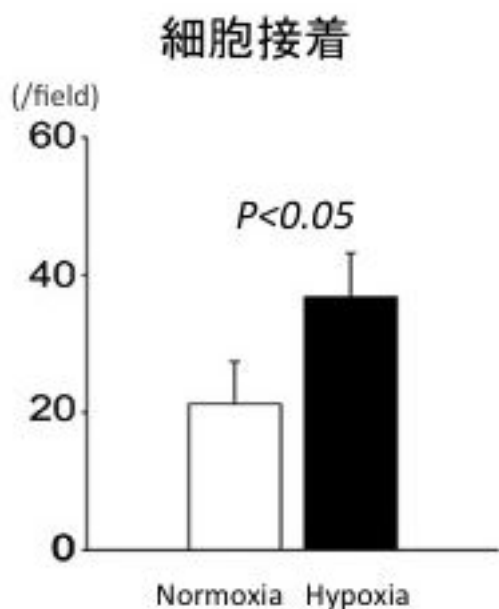
小動物(マウス)の総大腿動脈とその分枝を結紮し、下肢虚血モデルを作成した(Day0)。下肢虚血モデル作成7日後に、ヒト末梢血単核球を用い、末梢血単核球低酸素プレコンディショニング処理後(Hypoxia)、末梢血単核球正常酸素培養後(Normoxia)、末梢血単核球単離直後(Fresh)、PBSのみ(PBS)

をそれぞれ虚血下肢筋肉内に4ヵ所注入し、血管再生治療効果への影響を評価する。

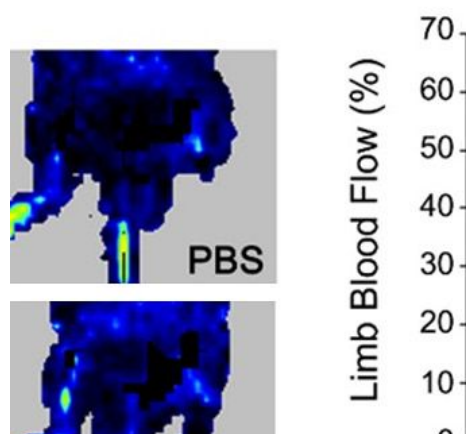
#### 4. 研究成果

##### (1) *in vitro*での解析

ヒト末梢血単核球における低酸素プレコンディショニング(Hypoxia)の至適条件は、33℃、2% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養を行うことが、細胞接着能、細胞生存、血管再生能における細胞機能が增强されることが示された。また、通常条件(33℃、20% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、24時間、Normoxia)で培養したヒト末梢血単核球と比較し、低酸素プレコンディショニングで培養した細胞が有意に細胞接着能、細胞生存、血管再生能が高く、細胞機能が增强されていた。



### 血流改善



##### (2) *in vivo*での解析

末梢血単核球低酸素プレコンディショニング処理後(Hypoxia)

末梢血単核球正常酸素培養後(Normoxia)

末梢血単核球単離直後(Fresh)

PBSのみ(PBS)

において血流改善効果評価し、末梢血末梢血単核球低酸素プレコンディショニング処理後(Hypoxia)で有意に血流改善効果を認めた。

#### 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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕 なし

〔その他〕

ホームページ等：特になし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

工藤 智明 (KUDO, Tomoaki)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：30750640