

令和 4 年 10 月 24 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10731

研究課題名（和文）重症虚血肢患者の背景疾患に着目した幹細胞プレコンディショニング法の開発

研究課題名（英文）Development of cell transplantation focused on the disease background

研究代表者

桂 春作（KATSURA, Syunsaku）

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40457304

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：新規治療の開発には、患者の背景疾患を反映した動物モデルが必要である。動脈硬化など様々な疾患が原因となり、重症下肢虚血が引き起こされる。重症下肢虚血に対しては、細胞移植治療が研究されている。しかし、背景疾患を反映した動物モデルを重症下肢虚血の細胞移植治療に使用している研究は、ほとんど報告されていない。動脈硬化モデルの心臓や大動脈を観察した報告はあるが、下肢を観察した研究は報告されていない。本研究では、動脈硬化モデルの下肢の血管を観察することにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な背景疾患により引き起こされる重症下肢虚血に対しては、細胞移植治療が研究開発され、臨床研究も行われているが、治療効果は限定的である。その理由の一つは、患者の背景疾患を反映した動物モデルが存在しないためである。そのため、動物モデルでは治療効果が観察されるが、実臨床では治療効果が限定的となると考えられる。本研究は、これまでよりも、患者の背景疾患を反映した動物モデルの作製を目指した研究であり、この動物モデルを利用することで、これまでよりも治療効果の高い治療法の開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Development of new treatment needs animal models with the disease background. Various diseases such as arteriosclerosis cause severe lower limb ischemia. Cell therapy has been researched for severe lower limb ischemia. Little has been reported on cell therapy for animal models with the disease background. Although it has been reported on heart and aorta for arteriosclerosis models, little has been reported on lower limbs. In this study, blood vessels in the lower limbs were analyzed for arteriosclerosis models.

研究分野：再生医療

キーワード：動物モデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者が所属する研究室で開発された「自己骨髄由来細胞を用いた血管再生療法」(Cell Transplant. 2002;11(8):747-52.)は、重症虚血肢患者に対する有効な治療法として広く認知されている。しかし、虚血組織内では移植細胞の生着率および生存率が低く十分な治療効果が得られていないと言われている。

そのため、当研究室では、虚血組織における細胞生着率向上策として、細胞を低酸素条件に短時間暴露することにより効率良く細胞機能を賦活化する“低酸素プレコンディショニング(HPC)法”を考案した。本法により、骨髄由来細胞や末梢血単核球細胞(PBMNC)での、1)血管成長因子の産生亢進、2)酸化ストレス抵抗性の獲得、3)細胞接着分子発現の増加、が誘導され、動物実験では“虚血下肢における血管新生の亢進と高い血流改善効果”が得られた(Biochem Biophys Res Commun. 2014 Feb 14;444(3):370-5)。またHPC法は、ヒト末梢血単核球においても同様の機能賦活化効果をもたらすことから(Am J Transl Res. 2014 Oct 11;6(5):570-9)、実臨床においても従来の細胞移植治療以上の治療効果が期待できる。

一方、重症虚血肢患者の大多数は高齢者であり、様々な全身疾患を併発している。背景疾患を有する患者では、移植細胞自体の機能が低下し移植後に十分な治療効果が得られないとされ、事実、当研究室で行った機能障害を伴った老齢マウスの解析では、老齢マウス由来骨髄細胞において血管成長因子の産生低下、酸化ストレスへの感受性の亢進、細胞接着因子の発現低下が見られ、結果として細胞移植治療の効果が減弱することを認めている。機能低下した老齢マウス由来細胞に対してHPC法を施すことにより、細胞機能の低下が著しく改善され、低酸素処理した老齢マウス由来細胞を虚血下肢へ移植することで血流改善効果が得られるという興味深い結果も得ている(Circ J. 2012;76(4):986-94.)。

しかし、これまでのマウス重症下肢虚血モデルは、加齢以外の背景疾患を持たない大腿動脈を結紮したモデルであり、患者の背景疾患を十分に反映したモデルであるとは言い難く、背景疾患を反映したモデルの開発が望まれており、そのようなモデルを使用した研究は、実臨床において有用な治療法を開発する一助となることが想定される。

### 2. 本研究の目的

本研究の目的は、高脂血症マウスが重症下肢虚血モデルとなりえるか否か検討することである。高脂血症マウスは動脈硬化モデルとして研究されており、これまでの研究では高脂血症マウスの心臓の冠動脈や大動脈を指標とした研究は報告されている。そのような報告では、高脂血症マウスと糖尿病マウスを掛け合わせたマウスに、数週間ほど高脂肪食を与えたマウスを動脈硬化モデルとして研究が行われているが、マウスの加齢については考慮されていない。また、これまでの動脈硬化モデルに対する研究において、マウスの下肢について着目した研究は、報告されていない。

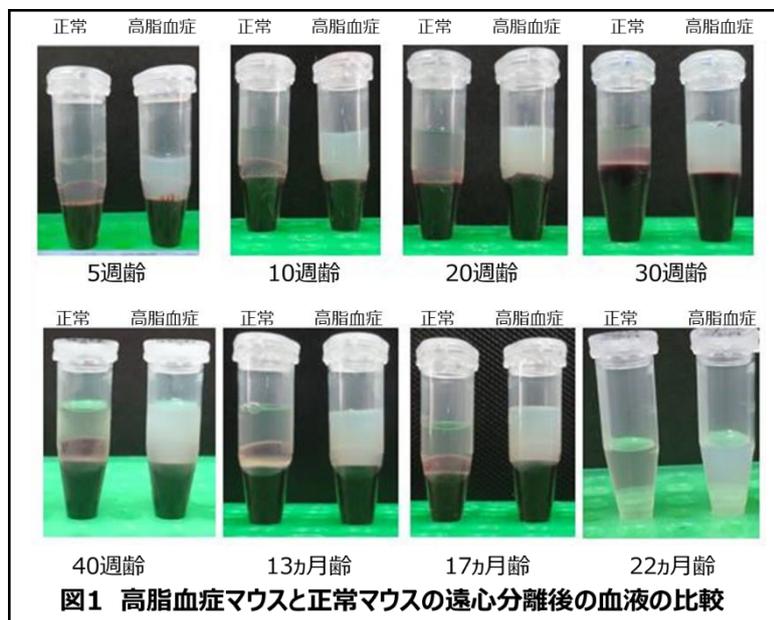
そのため、本研究では、加齢に対する高脂血症マウスの下肢の血管について観察することで、高脂血症マウスが、背景疾患を反映した重症下肢虚血モデルになりえるか検討することとした。

### 3. 研究の方法

高脂血症マウスおよび高脂血症マウスと同じバックグラウンドである正常なマウスの下肢の血管の状態を病理学的に比較解析する。下肢の観察は、1匹のマウスの左下肢の大腿部3か所、下腿1か所を観察した。

### 4. 研究成果

我々は、高脂血症マウスの背景疾患モデルマウスとしての可能性を探るために、高脂血症マウスと同じバックグラウンドである正常なマウスと同じ週齢において、血液採取や組織採取を実施した。図1は、採血して遠心後のものであり、高脂血症マウスは5週齢で、高脂血症であることが観察され、月齢約22カ月でも、この状態は続いていることを確認した。本研究では、月齢約22カ月までの高脂血症マウス、および、正常マウスの観察を行ったが、その理由は、月齢約21カ月あたりから、自然死するマウスが観察されたためである。



我々は、高脂血症マウスと正常マウスの観察から、17 ヶ月齢の高脂血症マウスの大腿動静脈に白色の沈着を観察したため（図 2）、高脂血症マウスと正常マウスの下肢について病理学的に比較することにした。

図 3 は、13 ヶ月齢の高脂血症マウスと正常マウスの下肢の代表的な病理写真である。同一マウスの下肢に対して、①～③は大腿部の 3 箇所、④は下腿の 1 箇所であり、①は鼠径部側の組織である。病理図は、HE 染色と MT 染色を行った。

高脂血症マウスでは、図 3 に示すように、血管の肥大等の異常状態が観察されたのは、13 ヶ月齢、17 ヶ月齢の高脂血症マウスの 80%であり、22 ヶ月齢の高脂血症マウスでは、全てのマウスで、血管の異常状態が観察された。正常マウスでは、13 ヶ月齢、17 ヶ月齢、22 ヶ月齢であっても、高脂血症マウスで観察された異常な血管は観察されなかった。

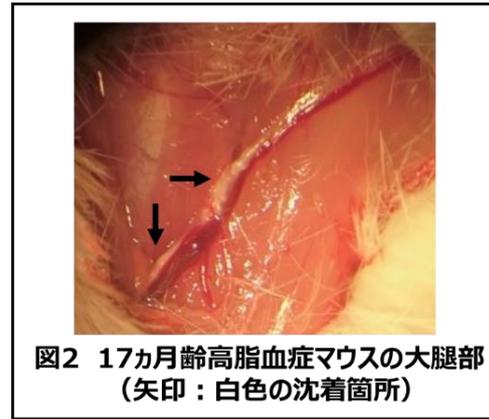


図2 17ヶ月齢高脂血症マウスの大腿部  
(矢印：白色の沈着箇所)

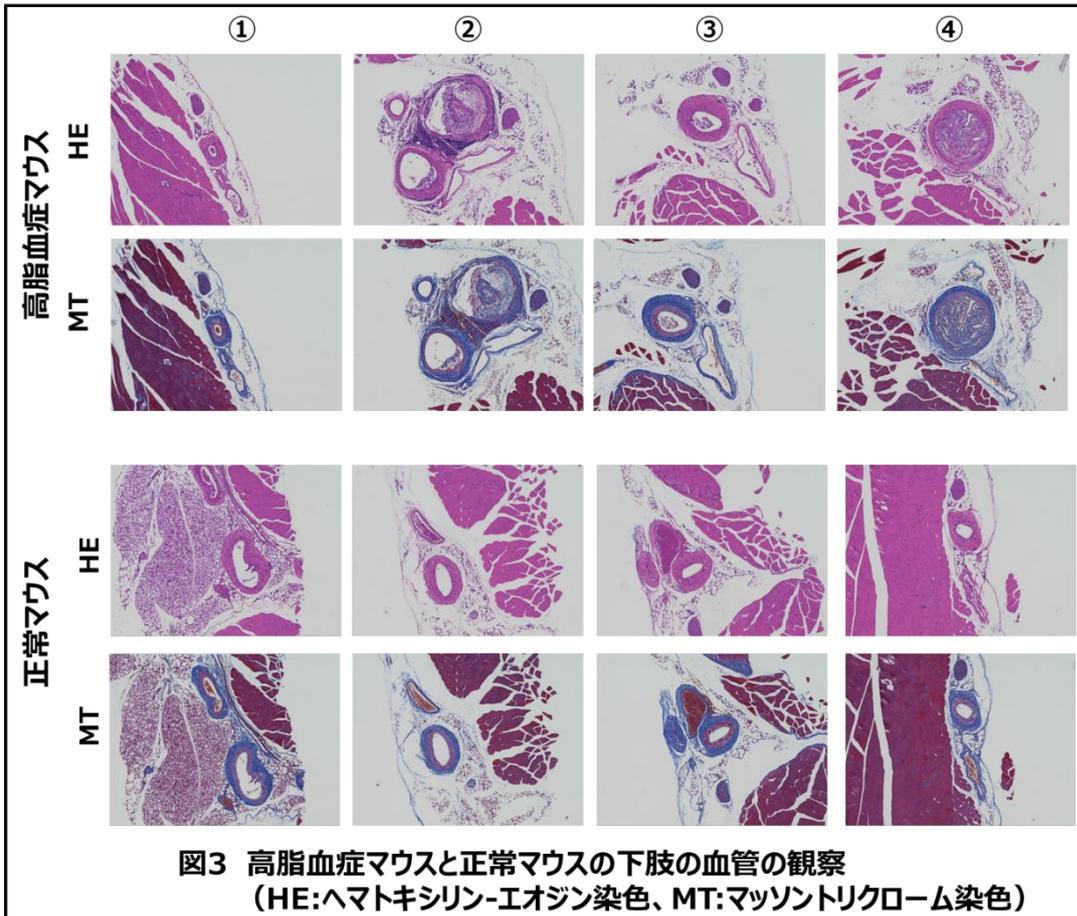


図3 高脂血症マウスと正常マウスの下肢の血管の観察  
(HE:ヘマトキシリン-エオジン染色、MT:マツソントリクローム染色)

図 4 は、13 ヶ月齢の高脂血症マウスと正常マウスの心臓の代表的な病理写真である。病理図は、HE 染色と MT 染色を行った。高脂血症マウスの心臓は、正常マウスの心臓と比較すると、肥大化している傾向があることが観察された。

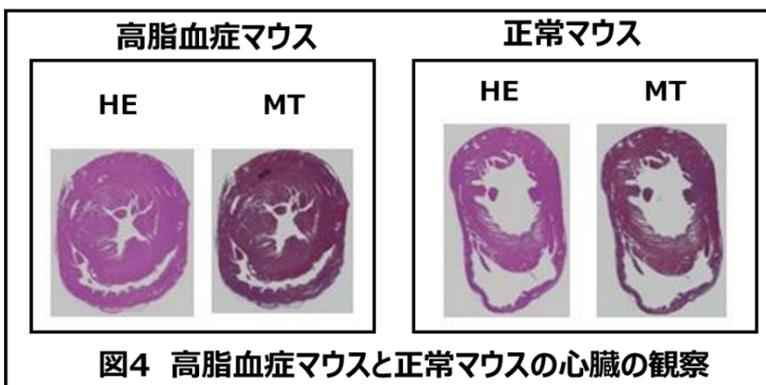


図4 高脂血症マウスと正常マウスの心臓の観察

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	濱野 公一  (HAMANO Kimikazu)  (60263787)	山口大学・大学院医学系研究科・教授    (15501)	
研究分担者	佐村 誠  (SAMURA Makoto)  (30773402)	山口大学・医学部附属病院・診療助教(4日/週)    (15501)	

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