

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591649

研究課題名（和文） 骨髄単核球細胞移植による肺血管新生機序解明に関する研究

研究課題名（英文） The effects and possible mechanism of syngeneic bone marrow mononuclear cell transplantation on pulmonary arterial hypertension

研究代表者：北市 隆（KITAICHI TAKASHI）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：20335813

研究成果の概要（和文）：骨髄単核球細胞(BM-MNCs)移植の肺高血圧症に対する治療効果と血管内皮増殖因子とその受容体(VEGF-VEGF receptor)を介する肺動脈再構築の機序を解明した。monocrotaline誘発肺高血圧モデルにおいて経静脈的BM-MNCs移植は、肺小動脈のリモデリングにより肺高血圧症を改善した。その機序として、細胞移植に伴う肺組織でのパラクライン効果によるVEGFの増大とそれによるVEGF-VEGF receptorシステムの活性化が肺小動脈のリモデリングを引きおこし、肺高血圧症を改善すると考えられた。

研究成果の概要（英文）： We investigated the effects and possible mechanism of syngeneic bone marrow mononuclear cell (BM-MNC) transplantation on pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline. Monocrotaline-injected mice improved significantly after BM-MNC transplantation compared with those of mice after monocrotaline injection. However, BM-MNCs were not incorporated into the lung at 1 week after transplantation, and significant vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulation and without receptor expression was observed in lung tissue after transplantation. Improvement of pulmonary arterial hypertension was inhibited by simultaneous administration of VEGF receptor-2 inhibitor with BM-MNC transplantation. These results indicate that syngeneic BMMNC transplantation improves monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by favorable pulmonary artery remodeling through VEGF upregulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：骨髄単核球細胞移植，肺高血圧治療，肺動脈再構築，VEGF-VEGF receptor，肺小動脈リモデリング

### 1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患の外科的修復術の成否は心臓の形態、機能的因子のみならず、良好な肺血管床があることが必須である。実際の臨床の場において、特に次のような病的肺血管床を持つ先天性心疾患に外科治療を施すにあたり問題となる。1) 肺動脈閉塞性病変を有する肺高血圧症例、2) 多数かつ細小の主要体肺側副動脈を有し、それらの統合が困難な症例、3) 先天的に左右の肺動脈が分断され、どちらか一方の肺動脈が未発達発症な症例。このような症例では、時に心肺同時移植以外に救命の手段が閉ざされる場合があるが、これらの病的な肺血管を再生、もしくは新生することができれば、自己の心臓による修復が可能になることが期待できる。

### 2. 研究の目的

血管内皮原細胞を多く有する骨髄単核球細胞(BM-MNCs)の移植が、未熟な肺血管床を成長させ、あるいは肺動脈閉塞性病変を改善させることができるかどうか、また骨髄単核球細胞移植前後の血液および肺組織を標本としてサイトカイン、VEGFなどの血管新生にかかわる因子を測定し、血管内皮増殖因子とその受容体(VEGF-VEGF receptor)を介する肺動脈再構築の機序を総合的に明らかにする。

### 3. 研究の方法

8週齢の雌性C57BL/6マウスに対して monocrotaline 80 mg/kg を腹腔内単回投与し、肺高血圧モデルを作成した。4週後に同種同性のマウス(8週齢)の長管骨より採取した BM-MNCs を1匹あたり  $1 \times 10^7$  個(0.25ml) 経静脈投与した(BMT群, n=10)。BM-MNCs 投与4週後のBMT群と、BM-MNCs 非投与の対照群(nBMT群, n=10)の間で、右室・左室心筋重量比、肺小細動脈中膜肥厚の程度(%medial thickness)および100  $\mu$ m 径以下の肺小動脈数を測定し、肺高血圧症の改善効果を比較検討した。

その機序を解明するために、まず、BMT群の肺組織、とくに血管壁において移植した BM-MNCs がとりこまれているかどうかを、移植細胞をあらかじめ蛍光染色し、移植後3時間、24時間および1週間後に検索した。また、肺高血圧モデルと BM-MNCs 移植1週後の肺組織における VEGF および VEGF receptor-2 の発現度を測定した。さらに、BM-MNCs 移植とともに VEGF receptor-2 拮抗薬を投与し肺高血圧症の改善効果を評価した。肺高血圧モデルマウスを用いる。同種マウス骨髄から骨髄単核球を分離、経静脈投与方法にて、肺血管の新生、再生を図る。そのときの移植前後の血液および肺標本から血管内皮前駆細胞が肺局所で血管新生に関与しているかどうか、またサイトカイン、VEGFなどの血管新生にかかわる因子を測定し、総合的に肺血管新生の機

序を明らかにする。

### 4. 研究成果

1) monocrotaline 投与4週後には monocrotaline 投与前のコントロール群と比較して右室・左室心筋重量比は  $0.203 \pm 0.02$  から  $0.296 \pm 0.04$  へ ( $p < 0.01$ )、%medial thickness は  $7.5 \pm 2.2\%$  から  $21.5 \pm 5.2\%$  へ上昇し ( $p < 0.01$ )、1視野あたりの肺小動脈数は  $20.9 \pm 4.8$  から  $5.1 \pm 1.7$  に減少し ( $p < 0.01$ )、マウス肺高血圧モデルが完成した。(図1, 2, 3)

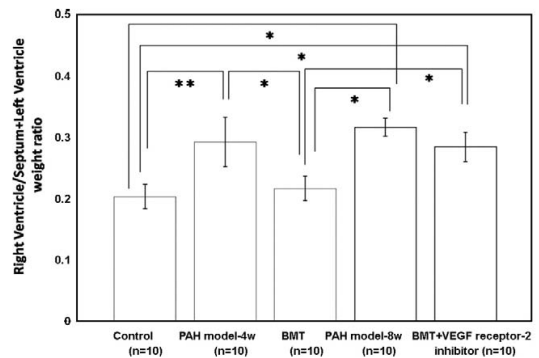
2) BM-MNCs 移植4週後(BMT群)には右室・左室心筋重量比は  $0.218 \pm 0.01$  へ ( $p < 0.05$ )、%medial thickness は  $7.7 \pm 2.2\%$  へ改善し ( $p < 0.01$ )、1視野あたりの肺小動脈数は  $17.1 \pm 2.6$  に増加し ( $p < 0.01$ )、肺高血圧症が改善した。monocrotaline 投与8週後の nBMT 群では、さらに肺高血圧の増悪を認めた。(図1, 2, 3)

3) BMT 群において移植 BM-MNCs は移植3時間後、24時間後および1週間後の肺組織内へのとりこみは認めなかった。

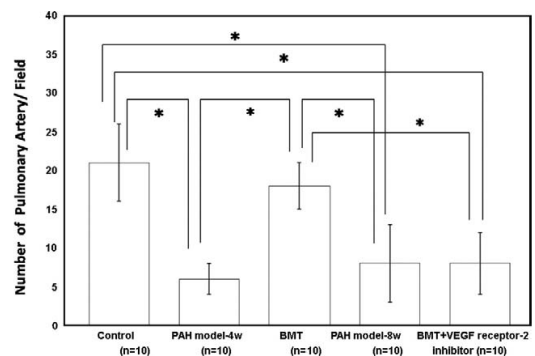
4) 肺における VEGF の発現は、BM-MNCs 移植1週後に著明に上昇したが VEGF receptor-2 の発現には影響はなかった。

5) BM-MNCs 移植と同時に VEGF receptor-2 拮抗薬投与を行うとその4週後に肺高血圧改善効果は抑制された。(図1, 2, 3)

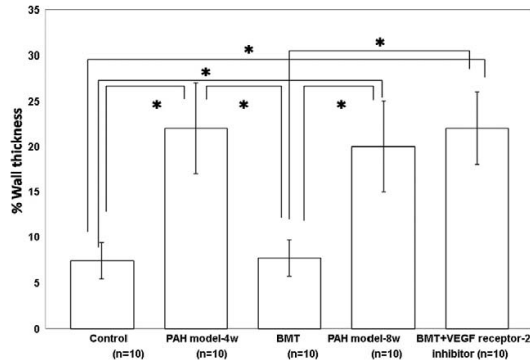
(図1)



(図2)



(図 3)



これらの結果から、monocrotaline 誘発肺高血圧モデルにおいて経静脈的 BM-MNCs 移植は、肺小動脈のリモデリングにより肺高血圧症を改善することが明らかとなった。その機序として、細胞移植に伴う肺組織でのパラクライン効果による VEGF の増大と、それによる VEGF-VEGF receptor システムの活性化が最終的に肺小動脈のリモデリングを引きおこし、肺高血圧症を改善すると考えられる。

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. Yoshida H, Kitaichi T, Urata M, Kurobe H, Kanbara T, Motoki T, Kitagawa T  
Syngeneic Bone Marrow Mononuclear Cells Improve Pulmonary Arterial Hypertension Through Vascular Endothelial Growth Factor Upregulation  
Annals of Thoracic Surgery 88(2):418-24.

[学会発表] (計 5 件)

1. 吉田 誉

同種骨髄単核球細胞移植は VEGF の発現増強

を介して肺高血圧症を改善する

第 62 回日本胸部外科学会総会

2009年10月14日 パンフィコ横浜

2. Homare Yoshida

Intravenous transplantation of syngenic bone marrow mononuclear cells improves monocrotaline induced pulmonary artery hypertension in mice: therapeutic angiogenesis through VEGF-VEGF receptor system

The 17th Annual Meeting of Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery (第 17 回アジア心臓血管外科学会)

2009年3月6日 Taipei

3. 吉田 誉

経静脈的骨髄単核球細胞移植は VEGF-VEGFR 系を介する血管新生により肺高血圧症を改善する

第 61 回日本胸部外科学会定期学術集会

2008年10月15日 福岡

4. 吉田 誉

経静脈的同種骨髄単核球細胞移植の

monocrotaline 誘発肺高血圧に対する改善果

第 12 回日本心筋血管再生療法研究会

2008年7月15日 東京

5. 吉田 誉

経静脈的な同種骨髄単核球細胞移植の monocrotaline 誘発肺高血圧に対する肺血管床改善効果

第 44 回日本小児循環器学会総会

2008年7月2日 郡山

[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://www.toku-cvs.umin.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北市 隆 (KITAICHI TAKASHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授)

研究者番号：20335813

(H20、H21 研究分担者→H22 研究代表者)

吉田 誉 (YOSHIDA HOMARE)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：50448338

(H20、H21)

(2) 研究分担者

北川 哲也 (KITAGAWA TETSUYA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：80240886

黒部 裕嗣 (KUROBE HIROTSUGU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：30380083

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：