

平成22年5月20日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間： 2008 ～ 2009 （年度）
 課題番号： 20790554
 研究課題名（和文） 骨髄間葉系幹細胞を用いた動脈硬化性血管病変の細胞療法
 研究課題名（英文） Bone-marrow mesenchymal stem cell therapy for vascular repair
 研究代表者
 磯 良崇 （Yoshitaka Iso）
 昭和大学・医学部・助教
 研究者番号： 60384244

研究成果の概要（和文）： 当該研究の目的は、骨髄間葉系幹細胞（以下MSC）による動脈硬化性病変治療の開発である。内皮前駆細胞と同様に、MSCは培養実験系において血管構成細胞様細胞に分化し、動脈硬化性疾患である急性心筋梗塞においてMSCが末梢血に動員されることを明らかにした。また、げっ歯類血管傷害モデルにMSCの局所投与を行ったところ、血管内腔狭小化の原因である新生内膜形成は抑制され、内皮再生が促進されていた。本研究より、MSCは動脈硬化性血管病変の治療に有用で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 develop bone-marrow mesenchymal stem cell (MSC) therapy for repair of atherosclerotic vascular diseases. Similar to endothelial progenitors, MSCs were mobilized into peripheral circulation in patients with acute myocardial infarction, and cultured MSCs differentiated into vascular lineage cells. In rodent vascular injury model, local administration of MSCs suppressed neointimal formation and promoted re-endothelialization. MSC-based vascular intervention appears to be a promising approach for treatment of atherosclerosis and restenosis after vascular injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：血管医学・再生医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：血管病・間葉系幹細胞・血管再生・動脈硬化・血管リモデリング

1. 研究開始当初の背景

(1) 長い間、循環器病学の臨床において、血管形成術後再狭窄の克服は重要な課題であった。その後、薬物溶出性ステントが→

→臨床に導入され、驚異的な再狭窄抑制効果を示した。しかし、この効果は、適正な創傷治癒によるものではなく、強制的な細胞増殖の抑制によるものであり、再内皮化は遅延し、

後期血栓症という重大な合併症を生じさせた。そのため、適正な治癒を促進する新規の治療法の開発が必要と考えられた。

(2) 骨髄幹・前駆細胞の血管細胞への分化および血管病変への関与：

浅原らによる骨髄由来血管内皮前駆細胞の発見 (Science, 1997) および佐田らによる血管平滑筋前駆細胞の報告 (Nat Med, 2002) は、骨髄由来幹・前駆細胞が積極的に血管病変や血管傷害後修復過程に寄与することを示し、その後相次いで追試され、実証されてきた。研究代表者の施設に於も、骨髄由来細胞が血管細胞に分化し血管傷害後リモデリング病変に関与することを、マウス (Cardio Pathol, 2004) およびブタ (Int J Cardiol, 2007) において明らかにした。骨髄中の非造血系幹細胞であるMSCは、胚葉を超えた分化能を有することが報告されている。予備実験において、MSCはアンギオテンシン II 受容体を発現し、本来血管作動性物質であるアンギオテンシン II がMSCの強力な走化因子であることを見出した。また、MSCは接着因子として $\beta 1$ インテグリンを発現していることが知られている。血管病変部においては、アンギオテンシン II が産生されているため、MSCは血管病変部に遊走し、インテグリンにより生着し、分化などにより血管病変を制御し得ることが想定された。

(3) MSCによる血管保護因子産生：

研究代表者は、急性心筋梗塞モデルにおいて、MSCが梗塞後の線維化を抑制し心機能を改善させることを報告した (Biochem Biophys Res Commun, 2007)。そのメカニズムにおいて、MSCが分泌する液性因子が重要であることを明らかにした。MSC由来液性因子のみ含有する馴化培地を添加することにより培養血管内皮細胞の低酸素曝露下での細胞死が抑制された。その液性因子の中にはVE

GF、HGFやアドレノメジュリンなど血管保護因子が含まれていることを報告した。さらにマトリックス修飾因子であるMMP-1やTIMPも液性因子に含まれており、マトリックスリモデリングを促進し得る。MSCは、その液性因子によって血管病変を制御し得る可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、細胞治療による動脈硬化病変の制御という新しい血管再生療法を創り出す試みである。

MSCは血管保護・修復に有用な特性を示している。適正な創傷治癒過程促進による血管修復・病変安定化を可能にすると考えられる。本研究では、動脈硬化性疾患患者におけるMSCの病態への関与を検討し、実験的にげっ歯類血管傷害モデルにMSCを投与し、MSCによって血管病変を治療し得るか検討する。メカニズム解明のため、培養実験を併用しMSCと血管細胞との相互作用を検討する。

MSCは比較的少量の骨髄液から採取可能であり、培養により増幅できる。培養条件を整備すれば、臨床応用可能であり、非常に有用な細胞源と考える。本研究は臨床に向けたMSC-based vascular intervention開発のための基盤研究となることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト末梢血におけるMSCの動態

対象：若年健常者 (6名)、心疾患を有さない高齢者 (28名)、安定狭心症患者 (7名)、急性心筋梗塞患者 (17名) より末梢血を採取し、フローサイトメーターにより解析を行った。急性心筋梗塞患者では入院時、3日目、7日目に採血を行った。

フローサイトメトリー：採血により得られた単核球を以下の表面抗原特異的抗体で標識

し、FACS Calibur (BD Biosciences) で解析を行ない、細胞数・比率を算出した。

抗体：抗ヒト CD45, CD34, CD271, CD133 抗体。

細胞分画：MSC—CD45^{low}/CD34⁺CD271⁺細胞；造血幹細胞—CD45^{low}/CD34⁺CD133⁺細胞と定義した。

(2) MSCの採取と培養

MSC：

ヒトMSC：骨髓液採取後、比重遠心法で単核細胞を分離。分離後、単核細胞をCD271抗体で標識し、磁気抗体細胞分離システムを用い、CD271陽性細胞を純化、採取。採取後、速やかに培養を行った。

ラットMSC：移植後追跡のため緑色蛍光蛋白 (GFP) 発現ラット由来MSCを使用した。大腿骨より骨髓液を採取し、ヒト細胞と同様に比重遠心法で単核球を分離する。プラスチック接着法で単核球からMSCを獲得し、培養を行った。

MSCの一部は、研究協力者より供与を受けた。

培養法：基本培地MEMと20%FBSで標準化されたプロトコールに沿って培養を行った (Iso Y, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2007)。Passage3-5を実験に用いた。

(3) ラット頸動脈バルーン傷害モデル

計画当初、マウス血管傷害モデルを検討したが、ラット頸動脈傷害モデルがより再現性高く作成できたため、本研究では同モデルにより検討を行った。

モデル作成：頸部正中切開を行い、右頸動脈を暴露。分枝より総頸動脈内に2Fフォガティカテーテルを挿入し、バルーン拡張後、動脈壁を擦過し傷害した。傷害後、血流を確認し閉創。

細胞移植：モデル作成2日後に、傷害血管を暴露し、血管周囲に培養GFPラットMSC

の局所投与を行った (n=10)。コントロール (n=10) では、同様の方法で培地の投与を行った。

病理組織学的・免疫細胞学的検討：MSC投与後3日および14日に頸動脈を採取し病理組織学的評価を行った。エラスチカファンギーソン染色切片で内膜および中膜の面積を計測し、新生内膜増生を評価。内皮細胞特異的抗原による免疫染色で再内皮化を評価。GFP抗体を用い、MSCの局在を検討した。

(4) MSCによる血管細胞への作用 (in vitro での検討)

細胞分化：MSCを50%コンフルエントに通常培養した後、血管内皮細胞培地により内皮様細胞へ、TGF- β 添加培地により血管平滑筋様細胞へ分化誘導を行った。

共培養：ヒト臍帯血管内皮細胞とMSCの共培養を行い、MSCによる内皮増殖効果を検討した。また、無血清培地で内皮細胞死の誘導を行い、その馴化培地をMSCに添加し、遺伝子発現の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト末梢血中MSCと造血幹細胞の動態
心血管疾患のない若年成人と高齢者において、末梢血造血幹細胞数は高齢者で有意に減少していたが ($p < 0.05$)、一方で末梢血中MSC数は差を認めなかった。

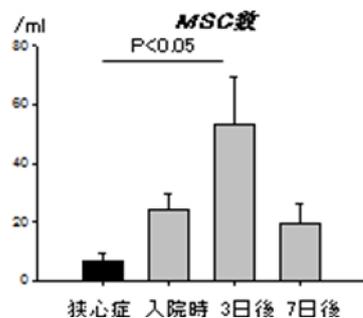
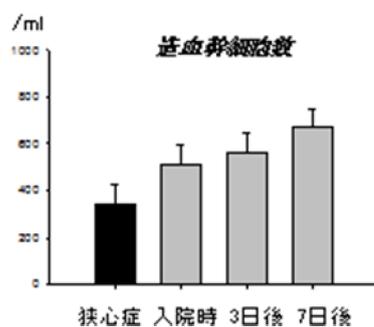
次に動脈硬化性疾患である狭心症症例と急性心筋梗塞症例における末梢血幹細胞の動態を検討した。急性心筋梗塞症例では狭心症症例よりも両幹細胞数とも増加を認めた。図1に示すように、造血幹細胞数は7日まで緩やかに増加したが、MSC数は梗塞後3日目に頂値となり、7日後には入院時と同程度にまで細胞数は減少した。また、梗塞後3日のMSC数は狭心症例より有意に増加し、梗塞の範囲・程度を示す最大CK値と正相関を示した

($r^2 = 0.38$, $p < 0.01$).

培養実験系で、ヒト MSC は血管内皮および平滑筋様細胞に分化した。

これらの結果より、MSC は造血幹細胞と異なり、高齢者においても恒常的に末梢血に供給され、急性心筋梗塞ではより急性期に動員されることが示された。また、血管細胞に分化可能なことより、MSC は動脈硬化性疾患における血管再生を含む内因性生体内修復機構に参与している可能性が考えられた。

図1: 急性心筋梗塞における末梢血幹細胞数



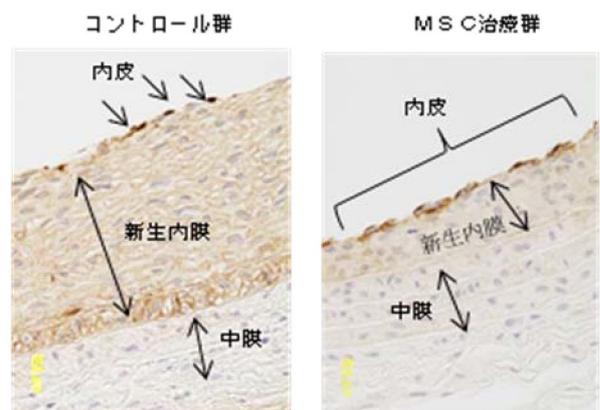
(2) ラット血管傷害モデルへのMSC移植

平滑筋細胞増殖を主体とする動脈硬化病変モデルであるバルーン血管傷害モデルを作成し、傷害2日目にGFPラット由来MSC投与を行った。MSCは血管周囲へ局所投与され、投与14日後に傷害頸動脈を摘出し、検討を行った。

組織学的検討において、コントロール群 ($n = 10$) と比較し、MSC局所投与群 ($n = 10$) では新生内膜増成は抑制され再内皮化が促進していた (図2)。新生内膜増殖の定量的指

標としての内膜/中膜比は、コントロール群 : 0.94 ± 0.31 対MSC局所投与群 : 0.58 ± 0.24 であり、治療群で有意に低下していた ($p < 0.01$)。この効果は、MSCの静脈投与では認められなかった。また免疫染色により細胞増殖の指標であるKi67の検討を行ったところ、MSC局所投与によりKi67陽性細胞比率は有意に少なかった ($p < 0.05$)。抗GFP抗体によりMSCの局在を検討した。前述の通り培養実験で、MSCの血管細胞への分化を認めたため、GFPと内皮細胞または平滑筋細胞マーカーとの二重染色を行ったが、分化を認めなかつただけでなく14日後までの長期生着も認められなかった。そのため、投与3日後に同様の検討を行ったところ、外膜に少数のMSCは局在していたが、血管細胞への分化は認められなかった。これらの結果より、MSC局所投与は血管形成術との組み合わせで新規の動脈硬化病変の治療法となり得る可能性が示唆された。しかし、そのメカニズムは当初予想していた血管細胞への分化ではなく他の機序であることが考えられ、以下の培養実験を行った。

図2: ラット血管傷害モデルへのMSC投与



(3) MSCと内皮細胞の相互作用

研究代表者は、MSCが血管内皮増殖因子や肝細胞増殖因子を豊富に分泌し得ることを以前報告した (Iso Y, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2007)。そのため、MSCと内

皮細胞の共培養を行ったところ、精製血管内皮増殖因子投与よりも有意に内皮細胞を増殖させ、管腔形成を促進した。また、動脈硬化病変では内皮は傷害されているため、無血清培地で内皮細胞傷害・細胞死を誘導し、これを馴化培地としMSCに添加したところ、コントロールと比べ数種類のケモカインとマトリックス分解酵素の遺伝子発現の増加を認めた。

これらの結果より、MSCと内皮細胞は液性因子を介して相互作用することが示唆され、MSCは内皮保護・増殖に働き、傷害内皮はMSCを活性化することにより、血管病変の修復を促進する可能性が示された。このことが、前述の動物モデルの検討におけるMSCによる新生内膜増殖抑制効果の機序の一部であると考えられた。

(4) まとめと今後の展望

本研究では、

1：ヒト生体内において末梢血中MSCを同定し、動脈硬化性疾患である心筋梗塞において内因性再生機構に関与している事を示した。

2：MSCの局所投与が、血管傷害後新生内膜増殖を抑制し得ることを示し、その機序として内皮細胞との相互作用が重要であることを明らかにした。

MSCによる再生医療研究は数多く報告があるが、動脈硬化性疾患の病態におけるMSCの関与やMSCによる血管制御の研究は十分になされておらず、本研究は血管再生研究の領域において意義深いものとする。本研究の成果は国内だけでなく国外でも評価を受け、国際学会で発表を行った。

冒頭で述べたように薬剤溶出ステントと異なり、MSCは血管修復の機序で再狭窄を抑制し得る。また現在、末梢動脈疾患のカテーテルインターベンションが数多く行われ

るようになってきたが、末梢動脈ではステントを留置できない部位があり、バルーン形成術後の再狭窄が問題となる。このような病変に超音波ガイドで体表から血管周囲にMSCを投与し再狭窄を抑制する戦略は、実臨床の観点から有用であると考えられる。今後、本研究で得られた知見をもとに、大型動物による前臨床試験を行い、臨床応用を目指したいと考える。

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7件)

(1) Iso Y, Soda T, Sato T, Sato R, Kusuyama T, Omori Y, Shoji M, Koba S, Katagiri T, Kobayashi Y, Suzuki H. Impact of implanted bone marrow progenitor cell composition on limb salvage after cell implantation in patients with critical limb ischemia. *Atherosclerosis*. 2010 ; 209 : 167-72. 査読有

(2) Xu G, Watanabe T, Iso Y, Koba S, Sakai T, Nagashima M, Arita S, Hongo S, Ota H, Kobayashi Y, Miyazaki A, Hirano T. Preventive effects of heregulin-beta1 on macrophage foam cell formation and atherosclerosis.

Circ Res. 2009;105:500-10. 査読有

(3) Ban Y, Watanabe T, Suguro T, Matsuyama TA, Iso Y, Sakai T, Sato R, Idei T, Nakano Y, Ota H, Miyazaki A, Kato N, Hirano T, Ban Y, Kobayashi Y. Increased plasma urotensin-II and carotid atherosclerosis are associated with vascular dementia. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16:179-87. 査読有

(4) Suzuki H, Toba K, Kato K, Ozawa T,

Tomosugi N, Higuchi M, Kusuyama T, Iso Y, Kobayashi N, Yokoyama S, Fukuda N, Saitoh H, Akazawa K, Aizawa Y. Serum hepcidin-20 is elevated during the acute phase of myocardial infarction. *Tohoku J Exp Med.* 2009;218:93-8. 査読有

(5) Shoji M, Iso Y, Kusuyama T, Omori Y, Soda T, Tsunoda F, Sato T, Koba S, Geshi E, Kobayashi Y, Katagiri T, Suzuki H. High-dose granulocyte-colony stimulating factor promotes neointimal hyperplasia in the early phase and inhibits neointimal hyperplasia in the late phase after vascular injury. *Circ J.* 2008;72:1885-93. 査読有

(6) Suzuki H, Kusuyama T, Sato R, Yokota Y, Tsunoda F, Sato T, Shoji M, Iso Y, Koba S, Katagiri T. Elevation of matrix metalloproteinases and interleukin-6 in the culprit coronary artery of myocardial infarction. *Eur J Clin Invest.* 2008;38:166-73. 査読有

(7) Sato T, Suzuki H, Kusuyama T, Omori Y, Soda T, Tsunoda F, Shoji M, Iso Y, Koba S, Geshi E, Katagiri T, Kawachi K, Wakabayashi K, Takeyama Y. G-CSF after myocardial infarction accelerates angiogenesis and reduces fibrosis in swine. *Int J Cardiol.* 2008;127:166-173. 査読有

[学会発表] (計7件)

(1) Yoshitaka Iso, et al. CD271 Identifies Human Bone Marrow Stem/Progenitor Cells with a Proangiogenic Potential and Circulating Progenitor Cells Mobilized after Acute Myocardial Infarction. American College of Cardiology 2010, Mar. 14-16 2010, Atlanta, U.S.A

(2) Yoshitaka Iso, et al. Impact of erythroblasts in bone marrow cells on limb salvage after cell implantation in patients with critical limb ischemia. European Society of Cardiology 2009, Aug. 29- Sep. 2, Barcelona, Spain

(3) Yoshitaka Iso, et al. Cellular Composition in Bone Marrow Cells may Influence Limb Salvage after Cell Implantation in Patients with Critical Limb Ischemia. 第41回日本動脈硬化学会シンポジウム4、2009年7月17-18日、下関

(4) Yoshitaka Iso, et al. Impact of Erythroid progenitors in bone marrow cells on limb salvage after cell implantation in patients with critical limb ischemia. 第8回日本再生医療学会 YIA受賞記念講演、2009年3月5-6日、東京

(5) Yoshitaka Iso, et al. Circulating progenitors, angiotensinII and renal function in the elderly. 第73回日本循環器学会、2009年3月20-22日、大阪

(6) Yoshitaka Iso, et al. Mobilization of Mesenchymal stem/progenitor cells after acute myocardial infarction. 第73回日本循環器学会、2009年3月20-22日、大阪
他1件。