

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592566

研究課題名（和文）血管内皮前駆細胞の組織再生への応用

研究課題名（英文）Application of EPC for tissue regeneration

研究代表者

小野 貢伸 (ONO MITSUNOBU)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：50281829

研究成果の概要（和文）：ヒト血管内皮前駆細胞（EPC）を末梢血から分離・培養を試みた。血管内皮マーカーならびに幹細胞マーカー陽性の前駆細胞を用いて血管新生能の観点からそれらの性質を正常血管内皮細胞と比較した。EPCは正常血管内皮細胞に比較し、血管新生因子の産生が高いこと、in vitroにおいて血管新生能が亢進していることが見出された。またこれらはin vivoでは虚血部位に動員されており、組織再生に貢献できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：EPC was isolated from peripheral blood using VEGFR2 and CD133 and they were cultured. Their angiogenic property was compared to normal endothelial cells (NEC). EPC showed higher levels of mRNA of growth factors and demonstrated activated angiogenic potential, ex, tube formation and cell migration in vitro. It was suggested that EPC may be contributed to tissue regeneration via their high angiogenic property.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：血管新生、血管内皮前駆細胞、組織再生

1. 研究開始当初の背景

血管新生は創傷の治癒、また組織の再生、再建時に重要な役割を担っている。血管新生は組織が虚血になると周囲の血管が進展して起こるものの他に、最近では、骨髓由来の幹細胞の一つ、血管内皮前駆細胞（Endothelial progenitor cell: EPC）が末梢循環に動員され、それらが実際に虚血部位で血管新生に貢

献しているという報告も見られるようになった。EPCが自ら様々な血管新生因子などを分泌していることもわかりはじめ、これらが間接的に血管新生の領域に間接的に貢献していることなども報告され始めている。我々はこれまで腫瘍組織からごくわずかな腫瘍血管内皮細胞の分離ならびに培養を行うことに成功しており、それらが正常血管内皮と比較して

多くの点で異なる性質を持つことなどを見いだした。さらに免疫染色、FACS などによって EPC が確かに血管新生の貢献していること、腫瘍血管内皮細胞の 1 部が stem cell の性質の一つである自己複製能を持つことを見いだしている。末梢血中にわずか 0.01% にもたらない EPC の分離培養は平易ではない。しかし我々は試行段階ではあるが、すでにマウス末梢血からの EPC 分離培養を行いはじめている。これまでの我々の経験と技術を応用することで、EPC の分離培養などは十分可能と思われる。今回の研究では組織の末梢循環を促進させることを目的として、末梢血から EPC を分離し *ex vivo* において細胞数を増やし、それらを創傷部位、組織再建部など虚血部位への細胞移植を行って組織再生への臨床応用を目指した基礎研究を行った。

2. 研究の目的

EPC の役割は大きく 2 つに分けられる。1 つは虚血巣に動員され、新たな血管が作られるときに直接参加し、血管内皮細胞に分化し血管壁を構築するという貢献と、2 つめは最近明らかになってきたことで血管の周囲に集積し、VEGF, PEDF, IGF, SDF-1, HGF などの血管新生を促進させる細胞増殖因子を分泌して、間接的に既存の血管にパラクライン的に働きかけるというものである。このような EPC の特性を生かして現在国内外でこの EPC を用いた移植治療が虚血性心疾患、下肢動脈硬化症など患者に行われている。我々はこれまで腫瘍組織から微量の血管内皮細胞を分離し、それらを *ex vivo* で培養し、それらの形質の維持に成功している。さらに、腫瘍血管新生にも EPC の貢献が示唆されていることから、腫瘍血管の biology を解析する目的で、末梢血から EPC を分離培養し、それらを血管新生研究の *ex vivo* における解析に用いてきた。

一方、歯科口腔外科領域では、悪性腫瘍などの疾患によって歯牙の欠損から顎骨、舌などの軟組織の欠損などに至るまで、機能的、審美的な面における患者の QOL の低下は否めない。従って外科的に行う歯牙の再植、組織の再建などの成否は患者の QOL を大きく左右する。現在、筋肉皮弁の再建などには *microsurgery* による血管吻合術が広く行われているが、これは直径 2~3mm の血管が対象で毛細血管のレベルでは組織内に血管新生が

起こるのを待つしかないのが現状である。また、3~10% ほどの確率で血栓が形成され、それによる皮弁の壊死などの問題もある。そこで本研究は、より確実に、またより早く末梢循環の再開をはかるために、EPC を移植することで組織の再建、再生の成功率を向上させること、さらにその研究成果を臨床へ応用することを目指すものである。

マウス末梢血から EPC を分離、それらを *ex vivo* で細胞数を大幅に増やし、同一個体に戻すこと、さらに動物モデルでの創傷や皮膚移植などのモデルで EPC の移植を試み、組織再建後の経過に対してどのような効果があるのかを検討する。さらにヒトからも EPC の分離培養を試み臨床への応用を探る。

3. 研究の方法

(1) マウスやヒトからの EPC の分離と *ex vivo* における大量培養

マウスやヒトの末梢血からの EPC の分離末梢血を分離してシヨ糖勾配法にて単核球を分離する。それらを EPC マーカーの一つである CD34 抗体でインキュベートし、その抗体を認識する磁気ビーズにより末梢血から CD34(+) 細胞のみ分離してくる。*ex vivo* において、ボトルカルチャーを行い(浮遊状態で)これらの培養を行う。この際、至適培養条件などを検討する。その後、EPC の形質がこれらの分離培養の後にも維持されているかどうかを FACS, 免疫染色などで *characterization* を行う。

(2) 血管新生の評価

in vitro 3 次元管腔形成法などにより EPC 単独で、または正常皮膚血管内皮細胞 (HMVEC) などで管腔形成させたあとに EPC を共培養させることによって 1 次評価する。またマウスにおける *in vivo* マトリゲルを用いた *angiogenesis assay* において、EPC を尾静脈から移植した場合と局所へ移植した場合とで血管新生の程度に違いがあるかどうかについても比較検討を行う。

(3) 動物モデル皮膚移植創への EPC 移植

マウスを用いて、島状皮弁を用いた創傷治療モデルなどのモデルを作製し、その際に *ex vivo* で培養されて数を増やした EPC を移植する。移植は尾静脈注射や局所への移植など、その移植法についても検討を行う。

(4) 硬組織再建モデルにおける EPC 移植実験

ラットやウサギにおける顎骨離断、再建モデル、さらには骨移植のモデルなどにおいてもEPCの移植が及ぼす影響を検討する。このときは、同一個体からEPCを分離、それをex vivoで増やしてから組織再建モデルを作製し、細胞移植を行うことなどを検討する。

血管新生によっておこる血流の再開を経時的にレーザードップラーなどで検討を行う。さらに、組織切片を用いて血管新生のレベルを組織学的にも検討を行う。

(5)EPCが組織再生に貢献しているかどうかについての証明

EPCをex vivoでGFPRラベルし、それらを上述のモデルにおいて移植する。それらが組織再建部において動員、ホーミングされているかどうかについても検討する。確かにEPCが組織再生を促すことがわかれば、ヒトへの臨床応用への準備を進める予定としていた。

4. 研究成果

ヒト末梢血からの前駆細胞が正常血管内皮細胞に比較して血管新生能が高いことを確認した。さらに今年度は前駆細胞が低酸素環境や低血清環境において他の正常血管内皮細胞と比較して生存能が高いのかどうかについても解析した。CD90陽性でかつ血管内皮マーカーポジティブな前駆細胞は低血清・低酸素環境下においてもアポトーシスをおこしづらく、生存能が高いことが示された。このことより虚血に陥った組織においてこれら前駆細胞が血管新生に有利に働く可能性が示唆された。

また、スフェロイドプレートによるスフェロイド形成能も高いことから血管新生能が高ことがわかった。さらにこれらの細胞はVEGFR2の発現が高く、VEGF刺激によるAktの活性化も正常血管内皮細胞よりも著しく、VEGFによって動員されやすいことが示された。次に初代培養である前駆細胞をin vivo移植して組織への動員の程度を解析するために細胞のラベリング法を検討した。

ウイルス発現ベクターによる蛍光タンパクの発現をせずにこれら細胞を蛍光標識して生体内でトレースするためにPKH26dyeやPKH67dye, さらにPolalicなどにより細胞を蛍光標識して生体内で観察可能期間や蛍光強度、また検出する手法についても検討を行っている。1週間くらいの期間であれば標

識された細胞の検出が可能であることが示された。

マトリゲルでこれらの細胞を懸濁しマウスの皮下に移植してin vivo血管新生能を検討したところ、正常血管内皮懸濁マトリゲルよりもより多くの血管新生が見られた。これら前駆細胞において、COX-2, VEGFのほか、幹細胞マーカーの他に腫瘍血管内皮細胞において発現が亢進していた分子のいくつかの分子の発現亢進も見られ、その高い血管新生能のメカニズムの一つと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① Ohga N., Hida Y. (5 番目/15), Shindoh M. (14 番目/15), Hida K. (15 番目/15) : Heterogeneity of Tumor Endothelial Cells: Comparison between Tumor Endothelial Cells Isolated from Highly Metastatic and Low Metastatic Tumors, *Am J Pathol*, 180(3), 1294-1307, 2012, 査読有
- ② Akiyama K., Hida Y. (3 番目/13), Shindoh M. (12 番目/13), Hida K. (13 番目/13) : Tumor endothelial cells acquire drug resistance by MDRI upregulation via VEGF signaling in tumor microenvironment, *Am J Pathol*, 180(3), 1283-1293, 2012, 査読有
- ③ Muraki C., Hida Y. (3 番目/10), Totsuka Y. (8 番目/10), Shindoh M. (9 番目/10), Hida K. (10 番目/10) : Cyclooxygenase-2 inhibition causes antiangiogenic effects on tumor endothelial and vascular progenitor cells, *Int J Cancer*, 130, 59-72, 2011, 査読有
- ④ Kurosu T., Hida Y. (3 番目/13), Totsuka Y. (10 番目/13), Shindoh M. (11 番目/13), Higashino F. (12 番目/13), Hida K. (13 番目/13) : HuR keeps an angiogenic switch on by stabilizing mRNA of VEGF and COX-2 in tumor endothelium, *Br J Cancer*, 104(5), 819-829, 2011, 査読有
- ⑤ Matsuda K., Hida Y. (3 番目/12), Totsuka Y. (9 番目/12), Shindoh M. (11 番目/12), Hida K. (12 番目/12) : Isolated tumor endothelial cells maintain specific character during long-term culture, *Biochem Biophys Res Commun*, 394, 947-954, 2010, 査読有

[学会発表] (計 36 件)

- ①樋田京子：第30回日本口腔腫瘍学会学術大会シンポジウム「口腔癌の浸潤ーマクロ・ミクロ・モレキュラー」、 “がんの浸潤転移と血管新生”、2012. 1. 26、大宮ソニックシティ（大宮）
- ②樋田京子：第63回日本細胞生物学会大会、「血管の多様性～組織発生から疾患におけるダイナミクス」、 “Heterogeneity of Tumor Endothelium and Drug Resistance” 2011. 6. 29、北海道大学（札幌）
- ③樋田京子：第27回日本DDS学会学術集会、“腫瘍血管内皮細胞の多様な生物像”、2011. 6. 9、東京大学（東京）
- ④樋田京子：第56回日本病理学会秋期特別総会、“Crosstalk between tumor endothelial cells and microenvironment”、2010. 11. 26、西日本総合展示場（北九州）
- ⑤樋田京子：第64回日本口腔科学会学術集会、“腫瘍血管内皮細胞の異常と新たな治療法の開発”、2010. 6. 24-25、札幌プリンスホテル（札幌）

[図書] (計1件)

- ①樋田京子：佐藤靖史、他監修、朝倉書店、日本血管生物医学会編「血管生物医学事典」、206-209、2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 貢伸 (ONO MITSUNOBU)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：50281829

(2) 研究分担者

樋田 京子 (HIDA KYOKO)
北海道大学・大学院歯学研究科・特任准教授
研究者番号：40399952

樋田 泰浩 (HIDA YASUHIRO)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：30399919

進藤 正信 (SHINDOH MASANOBU)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：20162802

東野 史裕 (HIGASHINO FUMIHIRO)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：50301891

戸塚 靖則 (TOTSUKA YASUNORI)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：00109456

北村 哲也 (KITAMURA TETSUYA)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：00451451

(3) 連携研究者
なし