

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790702

研究課題名（和文）治療効果の高い血管内皮前駆細胞を用いた難治性血管障害に対する治療法の研究開発

研究課題名（英文）The research and development of the cure for the intractable vascular lesion using functional endothelial progenitor cells

研究代表者 長野 真澄 (Nagano Masumi)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教

研究者番号：30436282

研究成果の概要（和文）：糖尿病を合併した虚血性疾患の成人患者の末梢血・骨髄・血管内皮より血管内皮前駆細胞(EPC)を単離し、ALDH活性によりAlde-Highおよび-Low EPCの分離を試み、分離したAlde-Highおよび-Low EPCにおいて細胞増殖能・遊走能・虚血改善能を検討した

研究成果の概要（英文）：We isolated Endothelial progenitor cells (EPC) derived from peripheral blood / bone marrow / the blood vessel wall of the adult patient of the ischemia that merged diabetes-related disease and tried separation of Alde-High and -Low EPC by ALDH activity and examined cell proliferation ability / migration ability / ischemia improvement ability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：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：再生医学・移植・Aldehyde dehydrogenase1 活性・血管内皮前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

狭心症・心筋梗塞・閉塞性動脈硬化症などの虚血性疾患に対して、骨髄・末梢血由来血管内皮前駆細胞(以下 EPC)を用いた治療の臨床応用が国内外で行われている。しかしながら、糖尿病を合併している場合、難治性であることが多数報告されている(Abaci et al., Circulation, 99:2239-42, 1999).

近年、EPC には階層性があり、未分化で増

殖能の高いEPCと、増殖能の低いEPCが混在していることが報告された(Ingram et al., Blood, 104: 2752-60, 2004)。しかし、増殖性の高いEPCを分離するのに有効なマーカーについては、現在まで報告がなかった。

申請者は、EPCを用いた細胞治療効果を上げるには、増殖能および治療効果の高いEPCを単離することが必須であると考え、その特

異的発現マーカーの探索を行い、虚血改善能の高い細胞群の分離に成功した。しかし、この研究結果は臍帯血由来 EPC のため、実際の治療に用いるためには、患者由来 EPC で確認することが必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果と問題点を踏まえ、虚血改善能の高い EPC の自家移植に向けた解析を行った。すなわち糖尿病を合併した虚血性疾患の成人患者の末梢血・骨髓・血管内皮より EPC を単離し、ALDH 活性により Alde-High および-Low EPC の分離を試みた。分離した Alde-High および-Low EPC において細胞増殖能・遊走能・虚血改善能を検討した。さらに分子生物学的なアプローチにより、EPC の創傷治癒能に影響を与える因子群を解明し、さらなる治療法を探索した。

3. 研究の方法

○ 末梢血由来 EPC の単離方法と培養法の確立：

増殖性の高い EPC の単離において、CD34 を指標とするよりは、ALDH 活性を指標に分離した方が、増殖能を反映することが分かっている。そこで、本申請において、末梢血由来 EPC が、臍帯血由来 EPC 同様に、ALDH 活性を指標に分離可能かどうか検討した。加えて、増殖性の高い末梢血由来 EPC の培養法において、従来の血管内皮細胞増殖因子 (VEGF, b-FGF, EGF, IGF-1) を含む EBM-2 培地が有効なのか、それとも他の培地が最適なのかについて併せて検討を行った。

細胞増殖能の検討;細胞 (EPC あるいは HUVEC) を 5×10^4 /dish の割合で 35mm dish に plating し、毎日 3 枚ずつトリプシンを用いて細胞を剥がし、トリパンブルー染色にて細胞数をカウントした。

細胞遊走能の検討；

in vitro 実験: トランスウェル (24well, 孔直径 8mm) の上層に細胞を 5×10^4 個 plating

し、下層にヒト SDF-1 を 200 ng/ml の濃度で配置した。6 時間後にトランスウェルをメタノール固定・染色し、孔を通過した細胞数をカウントした。

in vivo 実験: Cyclosporin-A を 20 mg/kg の濃度で免疫抑制をかけた C57/B6 マウスの背部に、皮弁の先端が虚血により壊死に至る 3cm x 2cm のコの字型切開を加えた。GFP ラベルした EPC 5×10^5 個を尾静脈より静脈注射し、24 時間後に皮弁に生着した GFP 陽性細胞数をカウントした。

虚血改善能の検討; Cyclosporin-A を 20 mg/kg の濃度で免疫抑制をかけた C57/B6 マウスの背部に、皮弁の先端が虚血により壊死に至る 3cm x 2cm のコの字型切開を加えた。GFP ラベルした EPC 5×10^5 個を尾静脈より静脈注射し、7 日後に皮弁の壊死領域の面積を測定した。

4. 研究成果

60 代および 70 代の糖尿病を合併した虚血性疾患患者末梢血 (G-CSF 投与) 5 例より、EPC の単離および ALDH 活性による分離を行い、患者由来 Alde-High および-Low EPC を単離培養することに成功した。有茎皮弁虚血モデルマウスにおいて、糖尿病を合併した虚血性疾患の成人患者由来 Alde-Low EPC は Alde-High EPC と比較して優れた創傷治癒効果を示した。Alde-Low EPC で発現の高い CXCR4 について shRNA 法を用いて発現を抑制した EPC を作成し同様の有茎皮弁モデルマウスに用よしたところ、EPC における CXCR4 の発現抑制により創傷治癒効果の抑制が観察された。逆に、Alde-High EPC に CXCR4 を強制発現させた EPC では、不完全ながら創傷治癒効果の改善がみられた。以上のことより、EPC の創傷治癒効果について、CXCR4 が重要であることが示唆された。

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2件)

① Nagano M, Kimura K et al. Hypoxia responsive mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood are effective for bone repair. *Stem cells and Development* 査読有 No.19, 2010, 224-235

② Tu T, Kimura K, Nagano M et al. Identification of human placenta-derived mesenchymal stem cells involved in re-endothelialization. *Journal of Cell Physiology* 査読有 No.226, 2010, 1195-1210

〔学会発表〕(計17件)

①木村健一, 長野真澄, 山下年晴, 秋本恵子, 野澤大輔, 落合直之, 大根田修.

ステロイド治療による脂肪組織由来間葉系幹細胞の分化に対する影響. 第10回日本再生医療学会総会 2011.3.1-2 東京

②山崎加奈子, 木村健一, 山縣憲司, 長野真澄, 大根田修

発生段階に応じたヒト歯髄由来間葉系幹細胞の機能解析. 第10回日本再生医療学会総会 2011.3.1-2 東京

③Trinh Nhu Thuy, 木村健一, 長野真澄, 松下昌之助, 大根田修.

Identification of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients. 第10回日本再生医療学会総会 2011.3.1-2 東京

④小林里美, 山下年晴, 長野真澄, 木村健一, 大根田修.

マウス肺の内皮細胞における HIF-3alpha の機能解析. 第8回がんとハイポキシア研究会 2011.1.29-30 札幌

⑤白石章, 木村健一, 長野真澄, 山下年晴, 坂東裕子, 原尚人, 大根田修.

原発性乳がん細胞を用いた低酸素応答性における機能解析. 第8回がんとハイポキシア研究会 2011.1.29-30 札幌

⑥山下年晴, 小林里美, 坪井一輝, 長野真澄, 大根田修.

血管内皮細胞における HIF 因子とがん転移との関連性の解析. 第8回がんとハイポキシア研究会 2011.1.29-30 札幌

⑦秋本恵子, 木村健一, 長野真澄, 高野晋吾, 山下年晴, 大根田修.

Glioblastoma 抑制に関するヒト間葉系幹細胞

の影響についての機能解析. 第8回がんとハイポキシア研究会 2011.1.29-30 札幌

⑧木村健一, 長野真澄, 山下年晴, 野澤大輔, 濱田洋美, 落合直之, 吉川裕之, 大根田修.

低酸素応答性の高い間葉系幹細胞を用いた骨治療. 第8回がんとハイポキシア研究会 2011.1.29-30 札幌

⑨福田慎一, 長野真澄, 山下年晴, 大鹿哲郎, 大根田修.

機能性が高い血管内皮前駆細胞の網膜色素変性症モデルマウスへの投与効果の検討. 第8回がんとハイポキシア研究会 2011.1.29-30 札幌

⑩Trinh Nhu Thuy, 木村健一, Geogina Salazar, 長野真澄, 松下昌之助, 大根田修.

Identification of the characteristic differences between adipose tissue-derived mesenchymal stem cells from diabetic and non-diabetic patients. 第8回がんとハイポキシア研究会 2011.1.29-30 札幌

⑪山下年晴, 小林里美, 坪井一輝, 長野真澄, 大根田修.

腫瘍血管内皮細胞における HIF 機能の解析. 第33回日本分子生物学会 2010.12.7-10 神戸

⑫小林里美, 山下年晴, 長野真澄, 木村健一, 大根田修.

マウス肺の内皮細胞における HIF-3alpha の機能解析. 第33回日本分子生物学会 2010.12.7-10 神戸

⑬Kensaku Murano, Masatsugu Ema, Kaori Kajitani, Kohsuke Kato, Satoru Takahashi, Osamu Ohneda, Masumi Nagano, Kyosuke Nagata.

Developmental defects and embryonic lethality caused by knock out of histone chaperone TAF-I. 第33回日本分子生物学会 2010.12.7-10 神戸

⑭秋本恵子, 木村健一, 長野真澄, 高野晋吾, 山下年晴, 大根田修.

グリオブラストーマ抑制に関するヒト間葉系幹細胞の影響についての機能解析. 第69回日本癌学会 2010.9.22-24 大阪

⑮白石章, 木村健一, 長野真澄, 山下年晴, 坂東裕子, 原尚人, 大根田修.

低酸素応答性における乳がん細胞の機能解

析. 第 69 回日本癌学会
2010. 9. 22-24 大阪

⑩長野真澄, 木村健一, 山下年晴, 大根田修
CXCR4 is crucial for ischemic tissue
repair through HIF-2 α in endothelial
progenitor cells 20th World Congress of
the International Society for Heart
Research 2010. 5. 13-16 京都

⑪長野真澄, 山下年晴, 濱田洋美, 大根田絹
子, 木村健一, 吉川裕之, 大根田修 ヒト血
管内皮細胞の虚血改善能における HIF-2 α と
CXCR4 の機能解析 第 9 回 日本再生医療学会
2010. 3. 18 広島

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/stemcell/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長野 真澄 (NAGANO MASUMI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
助教

研究者番号 : 30436282