

機関番号：15501
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791253
 研究課題名(和文) 糖尿病による骨髄細胞の機能低下における酸化ストレスの関与と抗酸化治療の効果
 研究課題名(英文) The attenuation of the diabetes-related functional impairment of bone marrow cells by antioxidant therapy
 研究代表者
 久保 正幸 (KUBO MASAYUKI)
 山口大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：60420519

研究成果の概要(和文)：自己骨髄細胞移植による心血管再生治療の効果が十分に得られない患者が散見される。その一因として、糖尿病の併発による骨髄細胞の機能低下が挙げられるが、機能低下メカニズムの詳細は不明であった。本研究では、糖尿病における骨髄細胞の機能低下に酸化ストレス亢進が関与することを示した。さらに、抗酸化治療によって酸化ストレスを軽減することで、細胞機能の低下を改善できることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The implantation of autologous bone marrow cells did not improve clinical symptoms or regional perfusion of ischemia in some patients. It speculates that this poor angiogenic potency is related to the complications of diabetes mellitus. However, the precise mechanisms of diabetes-related impairment of bone marrow cells are not fully understood. This study shows that oxidative stress contributes to the diabetes-related functional impairment of bone marrow cells, which can be attenuated by antioxidant therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：再生医療、骨髄細胞、血管新生、糖尿病、前駆細胞
酸化ストレス、活性酸素、抗酸化

1. 研究開始当初の背景

当教室で開発された自己骨髄細胞を用いた血管新生治療 (*Jpn Circ J.* 2001; 65: 845, *Cell Transplant.* 2002; 11: 747) は、難治性重症虚血性疾患の患者に対する有望な治療法として、日本をはじめ世界中の多くの施設で臨床応用がなされており、その有効性と安全性が報告されている。一方で、本治療による効果が一部の患者では十分に得られな

いことも分かってきた (*N Engl J Med.* 2006; 355: 1199)。その原因として、患者の加齢や糖尿病などの併発による骨髄細胞の機能低下が考えられている。

当教室で行った基礎研究でも、健常ラットの骨髄細胞と比較して、糖尿病ラットの骨髄細胞での血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 産生の減少や内皮細胞 (VE-cadherin 陽性) への分化の低下が認められた。さらに、糖尿病ラッ

トの骨髄細胞を下肢虚血に移植した後の血流回復は、健常ラットの場合と比較して低下していた。以上の結果から、糖尿病下の骨髄幹細胞では血管新生機能の低下が生じると共に、細胞移植による治療効果も低下することが示された (*Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 290: H1362)。このような糖尿病状態において細胞移植による血管再生治療の効果を十分に得るには、骨髄細胞の機能回復が必要と考えられる。しかしながら、糖尿病による骨髄細胞の機能低下に関する分子機序の詳細は不明であり、機能改善の有効策も未だに見当たらない。

一方で、糖尿病状態における血管内皮機能障害やインスリン抵抗性には活性酸素 (Reactive oxygen species, ROS) 増加による酸化ストレスが関与することが知られている (*Circulation.* 2003; 108: 1527, *Nature.* 2006; 440: 944)。さらに、糖尿病患者の血管内皮前駆細胞の機能低下に酸化ストレスが関与することが示されている (*Circulation.* 2007; 116: 163)。従って、糖尿病下の骨髄細胞においても酸化ストレスが亢進していると推察される。

以上の研究報告から考えると、糖尿病下の酸化ストレス亢進が骨髄細胞の機能低下に関与するといった仮説が考えられる。この仮説が正しければ、抗酸化物質の投与によって酸化ストレスを軽減することで、糖尿病下の骨髄細胞の機能低下を改善することが可能と考えられる。

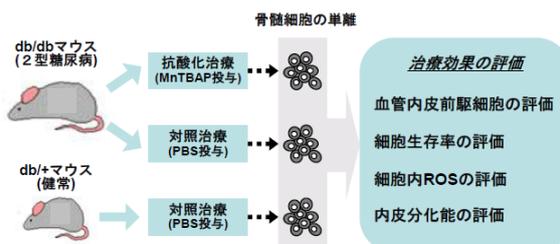
2. 研究の目的

本研究では、以下の点を明らかとすることを目的とした：

- (1) 糖尿病における骨髄細胞の機能低下に酸化ストレスが関与しているか否か？
- (2) 抗酸化物質の投与による酸化ストレスの軽減 (抗酸化治療) によって、糖尿病で低下した骨髄細胞の機能が回復するか否か？

3. 研究の方法

研究計画の概略は上図の通りである。詳細



な方法について、以下に示す。

(1) 実験動物

糖尿病における骨髄細胞の機能低下を検討するために、ヒト2型糖尿病と類似した病態を呈する db/db (C57BLKS/J Iar⁻+Lepr^{db}/+Lepr^{db}) マウスを用いた。なお、対照群には健常なヘテロ個体である db/+ (C57BLKS/J Iar⁻m⁺+Lepr^{db}) マウスを用いた。

(2) 抗酸化治療

糖尿病マウスに対する抗酸化治療として、superoxide dismutase 類似体である Mn(III) tetrakis 4-benzoic acid porphyrin chloride (MnTBAP) を 10 mg/kg/day で 4 週間連続して皮下投与を行った。また、対照治療として、糖尿病マウスおよび健常マウスに PBS を同様に皮下投与した。

(3) 体重、血糖値、尿中 8-OHdG 量の測定

抗酸化治療前、および治療 2、4 週間後に、マウスの体重および血糖値を測定した。また、同時期にマウスの尿を採集して、尿中の酸化ストレスマーカーの 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 量を ELISA 法にて測定した。また、尿中クレアチニン濃度を creatinine assay kit にて測定して、尿中 8-OHdG 値の補正を行った。

(4) 骨髄細胞採集および培養

抗酸化治療または PBS 投与 4 週間後に、マウスの大腿骨および脛骨から骨髄を採集した。比重遠心法にて骨髄単核球細胞を単離し、10% 牛血清を添加した RPMI1640 培地で、 2×10^6 /ml になるように調整し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

(5) 血管内皮前駆細胞の評価

単離直後の骨髄細胞を用いて、Flk-1/CD34 陽性細胞をフローサイトメトリーにて定量することで、血管内皮前駆細胞の割合を評価した。

(6) 細胞生存率の評価

培養 3 日後に、トリパンブルーで染色後、各ウェルの生存細胞を計測した。細胞生存率は、播種細胞に対する生存細胞の百分率で表した。

(7) 細胞内 ROS の評価

培養 3 日後に、ROS 感受性蛍光プローブ 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF) を用いて、骨髄細胞内 ROS 量を測定することで、酸化ストレスの程度を評価した。

(8) 内皮分化能の評価

培養 7 日後に、免疫染色にて VE-Cadherin 陽性細胞を定量することで、内皮細胞への分化を評価した。

4. 研究成果

(1) 体重、血糖値、尿中 8-OHdG 量の変化

糖尿病マウスの体重は経日的に減少していき、抗酸化治療の有無に関わらず治療後 4 週間後には健常マウスに比べて有意に減少していた ($p < 0.05$)。この体重減少は、糖尿病の最終段階によるものと考えられた。一方で、糖尿病マウスに対する抗酸化治療の有無による有意な体重差は認められなかった。

同様に、抗酸化治療の有無にかかわらず全期間を通して糖尿病マウスの血糖値に差はなく、健常マウスの血糖値と比べて有意に高かった ($p < 0.01$)。

健常マウスと比較して、糖尿病マウスの尿中 8-OHdG 量は全期間を通して、有意に高値を示した ($p < 0.01$)。一方で、抗酸化治療に伴って、糖尿病マウスの尿中 8-OHdG 量は次第に減少し、治療 4 週間後には治療前の値と比較して有意に低値を示した ($p < 0.05$)。しかしながら、対照治療群においては、治療前との有意な差は認められなかった。また、抗酸化治療 4 週間後の糖尿病マウスにおける尿中 8-OHdG 量は、同時期の対照治療群と比較して有意に低下していた ($p < 0.05$)。

(2) 血管内皮前駆細胞の評価

対照治療を行った糖尿病マウスの骨髄単核球細胞中の F1k-1/CD34 陽性細胞率は健常マウスよりも有意に低かった ($p < 0.01$)。しかし、抗酸化治療後の糖尿病マウスにおける F1k-1/CD34 陽性細胞率は、健常マウスより有意に低いものの ($p < 0.05$)、対照治療後の糖尿病マウスと比較すると有意に高かった ($p < 0.05$)。

(3) 細胞生存率の評価

対照治療後の糖尿病マウスの骨髄細胞における細胞生存率が最も低かった。その値は、健常マウスに比べると低い傾向が認められたが ($p = 0.065$)、抗酸化治療後の糖尿病マウスとの間には有意差は認められなかった。この結果に関しては、細胞生存の評価におけるトリパンブルー染色の感度が低いことが影響している可能性も考えられる。

(4) 細胞内 ROS の評価

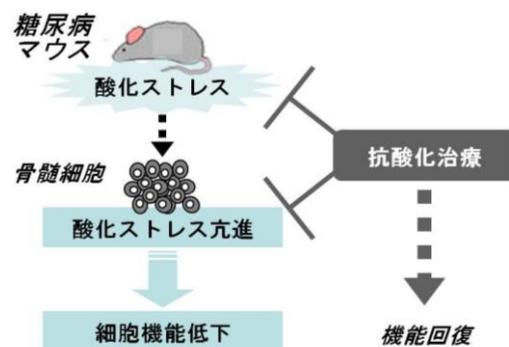
健常マウスと比較して、対照治療を行った糖尿病マウスの骨髄細胞では、細胞内 ROS レベルが有意に高く ($p < 0.01$)、酸化ストレスの亢進が示唆された。一方で、抗酸化治療後の糖尿病マウスでは、対照治療群と比較して、骨髄単核球細胞内の ROS レベルは有意に低値を示しており ($p < 0.05$)、抗酸化治療によって酸化ストレスが軽減されていることが示された。

(5) 内皮分化能の評価

対照治療後の糖尿病マウスの骨髄細胞における VE-cadherin 陽性細胞数は健常マウスの場合よりも有意に減少しており ($p < 0.01$)、内皮分化能の低下が示唆された。一方で、抗酸化治療後の糖尿病マウスでは、対照治療群と比較して、VE-cadherin 陽性細胞数の有意な増加が認められ、内皮分化能の増強が示唆された。

(6) 結語

本研究成果として、糖尿病マウスの骨髄細胞では機能低下が生じており、その要因として酸化ストレスが関与していることが示唆された。また、糖尿病マウス個体に対する抗酸化治療によって、骨髄細胞の酸化ストレスを軽減することで細胞機能の低下を改善できることが示された (下図)。



今後、糖尿病下での骨髄細胞における機能低下の改善策として抗酸化治療が有効な手段になり得ると考えられる。また、骨髄細胞は血管再生だけではなく、他の臓器 (肝臓、骨等) や細胞 (神経細胞、膵 β 細胞等) の再生修復治療にも用いられている。従って、糖尿病における骨髄細胞の機能低下のメカニズム解明と改善策を提示した本研究成果は、他分野にも波及効果をもたらすことが期待される。

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 2 件)

① Kubo M, Li TS, Kamota T, Ohshima M, Qin SL, Hamano K.

Increased expression of CXCR4 and integrin α M in hypoxia-preconditioned cells contributes to improved cell retention and angiogenic potency

J Cell Physiol. 2009; 220(2): 508-514.

(査読有)

②Ohshima M, Li TS, Kubo M, Qin SL, Hamano K.
Antioxidant therapy attenuates diabetes-related impairment of bone marrow stem cells.
Circ J. 2009; 73(1): 162-166.
(査読有)

[学会発表] (計3件)

①Kubo M, Li TS, Ohshima M, Fujimoto M, Nakai A, Hamano K.
Heat Shock Transcription Factor 1 Contributes to Ischemia-induced Angiogenesis by Regulating Kinetics of Bone Marrow Stem Cells.
American Heart Association 2010 Scientific Sessions
2010.11.13 McCormick Place, Chicago, Illinois, USA

②久保正幸, 李 桃生, 大島真子, 桂 春作, 古谷 彰, 濱野公一.
加齢動物の骨髄細胞に対する低酸素プレコンディショニングの有用性: 細胞移植治療の効果向上を目指して
第9回日本再生医療学会総会
2010.3.18 広島, 広島国際会議場

③久保正幸, 李 桃生, 大島真子, 桂 春作, 古谷 彰, 濱野公一.
Hypoxic pretreatment improves age-related functional impairment of bone marrow cells for inducing therapeutic angiogenesis
第32回日本分子生物学会年会
2009.12.9 横浜, パシフィコ横浜

[図書] (計1件)

①久保正幸, 李 桃生, 濱野公一.
虚血性心疾患に対する心血管再生治療の現状と未来
「びまん性冠動脈病変の臨床－基本的病態理解から治療の選択・実際」
メジカルビュー社
2010.10.刊行 133-140

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 正幸 (KUBO MASAYUKI)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 60420519

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし