

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 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591555

研究課題名（和文） 血管内皮前駆細胞移植による血管新生療法に対する Shh 遺伝子治療の併用効果

 研究課題名（英文） **Sonic Hedgehog Promotes Vasculogenic Activity in human CD34 positive Cells**

研究代表者

岡崎 悌之 (OKAZAKI TEIJI)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：00289456

研究成果の概要（和文）：CD34+細胞にSHhシグナル伝達系が存在し、SHhによりCD34+細胞の増殖・接着・遊走能を亢進、CD34+細胞のHUVECが形成する管腔構造への取り組みを促進した。またSHhはCD34+細胞の血管内皮細胞および血管平滑筋細胞への分化能を高めるということをin vitroにて明らかにした。さらにSHhと共培養したCD34+細胞はマウス下肢虚血モデルで血管内皮細胞および血管平滑筋細胞に分化したことを確認した。虚血性心血管疾患の細胞治療においてCD34+細胞のSHhシグナル活性の応用が示唆される。

研究成果の概要（英文）：The activation of SHh signaling by SHh treatment of human CD34+ cells enhanced the migration, proliferation, adhesion, and colony forming capacities that are essential for neovascularization including vasculogenesis/arteriogenesis. We have demonstrated the differentiation potential of CD34+ cells into both endothelial cells and vascular smooth muscle cells exhibiting up-regulation of genes expressed in vascular lineage cells. The SHh activated human CD34+ cells directly contributed to vascular regeneration while non-activated CD34+ cells showed less regenerative capacity in a mouse ischemic hindlimb model. The activation of cellular SHh signaling may increase the potency of autologous CD34+ cell therapy in ischemic diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
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：胸部外科学
 キーワード：心臓大血管外科学

1. 研究開始当初の背景

虚血性心血管疾患に対して遺伝子治療や細胞治療による血管新生の臨床試験は10年以上行われてきたが、我々は血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC) の血管新生能力を応用した自己骨髄単核球細胞移植 (TACT: therapeutic angiogenesis using cell therapy) を2000年より臨床試験として開始した。しかし糖尿病などの動脈硬化因子を併存する閉塞性動脈硬化症では、バージャー病に比し効果を認めない傾向にあった。動脈硬化因子を有する患者のEPCの機能の障害、細胞数の減少といった問題があることも明らかにされ、細胞治療の効果に影響すると考えられた。もう一つの問題として、無痛性歩行距離、潰瘍改善率、そして下肢切断回避率などでは有効性は示されたが、血流評価のひとつであるABI (ankle brachial pressure index) の有意な改善はみられなかった。その理由として、血管新生療法で新生される血管は側副血行路を増加させるような毛細血管床であるためと考えている。さらに新生血管が平滑筋にうら打ちされた成熟した血管であるかどうかということも重要な問題と考えている。久留米大学の結果を含めた、TACT trialの短期および長期の多施設での臨床結果が報告されたが、約30%の症例で non-responder であった (Lancet 2002, Am Heart J 2008)。これらの臨床結果を受けて、1) 成熟した血管の再生 2) 機能低下した EPC の強化、この二つの課題を解決するため、細胞治療において遺伝子治療を併用することに注目し当初の研究計画を作成した。

EPC 移植による血管新生療法において、移植前の EPC のソニックヘッジホッグ (Sonic Hedgehog : SHh) シグナルを活性化について検証することとした。SHh は血管内皮には作用しないが、EPCにはSHhの受容体である Ptch1 が存在し、SHh の刺激でEPCの増殖・遊走・管腔形成など、EPC の分化にも関与し血管新生を促すことが既に明らかにされている。急性および慢性の心筋虚血モデルに対して SHh 遺伝子治療を行い、組織学的に平滑筋細胞陽性のある程度の血管径を有した太い血管の増生を確認し、虚血領域が減少したことも報告されている (Pola R, Nat Med 2001)。成体における血管再生 (neovascularization) は、既存の血管内皮細胞の増殖・遊走による狭義の血管新生 (angiogenesis) と、骨髄に由来する未分化

な EPC の局所への動員による脈管形成・発生 (vasculogenesis) がある。血管新生療法は大きく2つに分類される。一つは増殖因子などの生理活性物質 (血管新生因子) による血管新生 (angiogenesis)、もう一つは血管内皮前駆細胞などの未分化な細胞成分による脈管形成 (vasculogenesis) を促すものである。前者は血管新生因子を虚血組織にデリバリーするためのタンパク投与や遺伝子治療であり、後者は血管内皮細胞へ分化・増殖し得る EPC の移植を行う細胞治療である。細胞治療では EPC を含んだ細胞からパラクライン的に血管新生因子が放出され、angiogenesis も促進される。よって、EPC に対して SHh シグナルの活性化を負荷することで angiogenesis/vasculogenesis を促し、より強力な血管新生療法が期待できると考えている。

2. 研究の目的

最初に、SHh のシグナリング活性化による EPC の血管系分化誘導効果を *in vitro* で検証することを研究の目的とした。今後の血管新生療法では、毛細血管床ではなく、より成熟し安定した大きな血管新生および脈管形成することを可能にしたいと考えた。成熟した血管が形成されるためには、血管内皮細胞の増殖・遊走、分化、管状構造の構築に引き続き、それが壁細胞 (周皮細胞、平滑筋細胞) に被覆される必要がある。EPC の SHh シグナルを活性化させ血管構成細胞への分化能を含む細胞機能を評価するが、血管内皮細胞への分化能だけでなく、平滑筋細胞への分化能も確認する。

次に、SHh のシグナリング活性化した EPC を下肢虚血モデルに移植し、実際の虚血部での血流改善効果を確認する。*in vivo* でも移植細胞が血管内皮細胞および平滑筋細胞に分化するかどうかの確認を行い、成熟した血管再生の可能性を検討する。

さらに、動脈硬化疾患を有する患者の EPC の機能の障害、細胞数の減少といった問題が細胞移植の臨床結果に影響したと考えられるが、臨床検体から採取した細胞を解析し臨床応用への可能性を検証する。健常人と動脈硬化疾患の患者を比較検討し、遺伝子発現状態の違いを明らかにすることで、SHh で前処理した患者の EPC 移植によって血管新生効果が増強される可能性が示唆されるかもしれない。

in vitro, *in vivo* の基礎研究を通じて臨

床応用への可能性を検証することも目的とした。

3. 研究の方法

【in vitro】

CD34 陽性細胞での SHh 受容体である Ptch1 の発現はすでに確認されており、SHh シグナルを活性化させることで CD34 陽性細胞の増殖遊走能・血管系細胞への分化能が向上し、またサイトカイン合成能が亢進することで、血管構成細胞に分化し、より成熟血管形成に近づくのではないかと仮説を立て、以下の基礎研究を行った。

- 1) CD34 陽性細胞を SHh 蛋白と共に培養することで、CD34 陽性細胞での SHh シグナルおよび血管新生関連因子の発現の有無について microarray を用いて検討する。
- 2) 細胞評価として、24 時間 SHh 蛋白と培養した後、SHh を含まない medium に変え全ての assay を行う。細胞機能は、増殖能・接着能・遊走能を評価する。接着能評価は、細胞をフィブロネクチン coating した dish に撒き直し、48 時間後に DAPI 染色を行い、接着細胞のみを counting して評価する。
- 3) 血管新生評価として、コロニー形成能・管腔形成能を評価する。コロニー形成能評価は、細胞をメチルセルロース含有培地に撒き 21 日後に形成コロニー数をカウントする。
- 4) 管腔形成能評価は、HUVEC との Matrigel 上での共培養により、tube like structure に対する細胞の取り込まれた細胞数で判定する。
- 5) CD34 陽性細胞の分化誘導能を評価するため、細胞をそれぞれ内皮系誘導培地、平滑筋系誘導培地にてそれぞれ培養後細胞回収し遺伝子発現解析 (PCR) を行う。

【in vivo】

SHh シグナルを活性化したヒト CD34 陽性細胞をマウス虚血肢モデルの虚血肢に筋注射し、ヒト CD34 陽性細胞のみを移植した群と比較し、レーザー Doppler (LDPI: Laser-Doppler perfusion imaging system) にて血流改善効果の評価したが、虚血肢/非虚血肢のレーザー Doppler 血流比にて評価する。虚血組織の新生血管の解析は血管内皮や平滑筋のマーカーの免疫染色にて行い、ヒトミトコンドリア (hMtCd) との二重染色にて vasculogenesis の存在についても確認する。

【臨床研究】

動脈硬化性疾患の危険因子である糖尿病に罹患した患者の末梢血 100mL を採取し、CD34 陽性細胞を分離し、コロニーアッセイを行う。SHh シグナル関連遺伝子やその他の血管新生関連遺伝子の発現状況について解析を行う。血管内皮や平滑筋のマーカー

の抗体である CD31, eNOS, VEGF, SM alpha-actin, SM22, PDGFRb などの免疫染色を行う。

4. 研究成果

【in vitro】

「研究の方法」の基礎研究 1)-5) の結果を下記に示した。

- 1) SHh シグナル関連遺伝子の発現では、SHh やその受容体である PTCH1 遺伝子、さらにはその下流の核内移行後の複合体である Gli1 遺伝子の上昇を認め、SHh シグナル経路が SHh 蛋白投与群で有意差をもってシグナル活性があることが明らかになった。また、血管新生関連遺伝子の発現状態の結果について、アンジオポイエチン 1、2 は発現をしていたものの control と SHh 群での有意な差は認められなかった。NPR1、FOXO4、BMP2、TIE1 遺伝子は SHh 群で有意に upregulation していた。
- 2) 増殖能は、SHh 群が有意に control 群に比べ、増殖能が向上しており、SHh 蛋白の濃度依存性の傾向にあったが、統計学的には濃度差による有意差は認めなかった。接着能は、SHh 群が control 群に比べ有意に亢進していた。遊走能は、細胞を上槽のみに撒き、下槽には SDF1 α 100ng/ml 含有 medium とし、下槽に遊走してきた細胞をカウントした。SHh 群の方が有意に SDF1 含有 medium に強く遊走していた。
- 3) コロニー形成能では、SHh 群において有意に亢進していた。
- 4) 管腔形成に取り込まれた細胞数に関しても、SHh 群での有意な上昇を認めた。
- 5) 内皮系分化誘導培地では、CD31 と eNOS の有意な上昇を認めた。平滑筋系分化誘導培地では、SM22 と calponin がわずかであったが、有意な上昇を認めた。

以上の結果をまとめると、CD34 陽性細胞には SHh シグナル伝達系が存在した。SHh は CD34 陽性細胞の増殖・接着・遊走能を亢進させ、さらに CD34 陽性細胞の HUVEC が形成する管腔構造への取込も促進していた。血管内皮細胞及び血管平滑筋細胞への分化能を高めることも明らかとなった。

【in vivo】

虚血肢に対して SHh と共培養した CD34+細胞を筋注射した群をヒト CD34 陽性細胞のみを筋注射した群と比較したが、有意に血流は改善していた。虚血肢の組織を免疫染色において、SHh と共培養した CD34+細胞を筋注射した群では有意に毛細血管 (/HPF) の増加を認め、移植細胞が血管内皮細胞および平滑筋細胞に分化していたこと (hMtCd と二重染色されていた) とが確認された。これらの結果は、SHh と共培養した CD34+細胞の移植で

は angiogenesis だけでなく, vasculogenesis のメカニズムの関与がより大きいものであることが示唆される結果であった。

【臨床研究】

現在, 健常者の末梢血 100mL を採取し, CD34 陽性細胞を分離, 培養を行っている。末梢血中の CD34 陽性細胞数は非常に少ないが, CD34 陽性細胞単独群と SHh 共培養した CD34 陽性細胞群とコロニー形成数を比較し, SHh 共培養した群に多い傾向にある。糖尿病患者でも同様の傾向を認めている。今後、臨床検体(末梢血)数を追加し, colony assay を行う予定である。

*以上の基礎研究の結果は, 「Graded Sonic Hedgehog Signaling Regulates Vasculogenic Fate and Function of Human CD34 Positive Cells in Ischemic Tissue」と表題で Circulation Research に提出した。H24 年度後半には査読に従い追加実験を行った。さらに臨床検体での結果を求められているので, 臨床研究の結果を追加し再提出する予定である。「ヒト末梢血 CD34 陽性細胞における Sonic Hedgehog シグナルの解析」という研究テーマで久留米大学倫理委員会に提出し, H25 年 1 月に承認されているので, 臨床研究の検体数を増加させ解析を行い, H25 年 9 月頃に論文の再提出を行う予定である。

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岡崎悌之、勝田洋輔、佐々木健一郎、有馬健、斉藤 裕、外山康之、香月与志夫、大塚昌紀、仲吉孝晴、大塚裕之、金谷蔵人、横倉義典、中村英司、廣松伸一、明石英俊、今泉勉：自己骨髄単核球細胞移植の成績と適応について、脈管学、査読有、51 巻、2011、441-446

〔学会発表〕(計 3 件)

①岡崎悌之、中村英司、廣松伸一、明石英俊、守永圭吾、清川兼輔：難治性潰瘍に対する自己骨髄単核球細胞移植の結果
第 41 回日本創傷治癒学会 2011/12/5-6 愛知

②金谷蔵人、伊井正明、岡崎悌之、青柳成明、浅原孝之：Sonic Hedgehog signaling 活性化によるヒト CD34 陽性細胞の血管系分化誘導効果の検討、
第 10 回日本再生医療学会総会 2011/3/1-2 東京

③岡崎悌之、大野智和、新谷悠介、奈田慎一、三笠圭太、飛永 覚、鬼塚誠二、澤田健太郎、田中厚寿、廣松伸一、明石英俊、青柳成明：自己骨髄単核球細胞移植の成績と適応について、
第 51 回日本脈管学会 2010/10/14-16 旭川

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 悌之 (OKAZAKI TEIJI)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：00289456

(2) 研究分担者

伊井 正明 (II MASAOKI)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：10442922

(3) 連携研究者

()
研究者番号