

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：32622

研究種目：若手研究B

研究期間：2010～2011

課題番号：22790732

研究課題名（和文） CD271陽性骨髄間葉系幹細胞を用いた血管新生療法の開発

研究課題名（英文） Novel therapeutic angiogenesis using mesenchymal stem cells
from bone-marrow mononuclear cells and CD271+ cells

研究代表者

磯 良崇 (Iso Yoshitaka)

昭和大学 医学部 助教

研究者番号：60384244

研究成果の概要（和文）：本研究では、骨髄間葉系幹細胞（MSC：mesenchymal stem cell）に注目し、同細胞による新規血管新生治療の開発を目的とした。従来法で採取したMSCおよびCD271抗体で純化したMSCともに向血管新生性を示した。下肢虚血モデルにエリスロポエチン+MSCを投与すると、MSC単独投与と比べて、有意な血流回復が認められた。MSCは血管新生治療の発展にとって有用な細胞源であり、エリスロポエチンがMSC機能を活性化させることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to develop novel therapeutic angiogenesis using mesenchymal stem cells (MSCs) from bone marrow. Both MSCs from total mononuclear cells and CD271+ cells in bone marrow have shown pro-angiogenic phenotype. Preconditioning with erythropoietin enhanced the pro-angiogenic property in MSCs. MSC from bone marrow is useful cell source for therapeutic angiogenesis. MSC implantation combined with erythropoietin may become a new strategy for therapeutic angiogenesis in peripheral artery disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

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：骨髄間葉系幹細胞、血管新生、末梢動脈疾患、エリスロポエチン、CD271

1. 研究開始当初の背景

(1) 自家骨髄単核球移植による末梢動脈疾患への血管新生治療は、世界に先駆けて本邦

で実施され、有効性が示されたが、新鮮分離細胞を用いる本法では幹・前駆細胞数の個人

差を解消できず、治療効果に差が生じることが明らかとなった。そのため、申請者は、次世代血管新生治療のための有用な細胞源として骨髄細胞の中でも間葉系幹細胞（以下MSC：mesenchymal stem cell）に注目した。MSCは自己複製能・多分化能といった幹細胞特性に加え血管新生因子を豊富に産生することが報告されている。

（2）従来、MSCの採取法は、培養皿に骨髄液を播種し、接着した細胞を継代する方法で行われている。しかし、この方法で得た培養皿の接着細胞は均一な集団ではなく、分化段階の異なる前駆細胞の集合体である。幹細胞の選別には特異的な細胞表面抗原発現を利用するが、これまでMSCは不明であったため、困難であった。最近になり、磁気抗体を用いて骨髄細胞中のCD271陽性細胞（神経成長因子受容体）を直接分離すると、増殖能・分化能共に非常に優れたMSCが単離されることが明らかになった。申請者らも追試を行い、CD271発現を指標に骨髄より優れたMSCを選択的に純化・採取し、生体外増幅が可能であることを再現した。

（3）MSCの能力を向上させる試みは、以前より行われている。例として化学化合物5-azacytidineによる心筋分化能の獲得や遺伝子導入による抗アポトーシス性の獲得がある。しかしながら、発癌性を有する化合物の使用や遺伝子導入法は、安全性の面から臨床応用に実践的でないと考えられる。申請者は、臨床で用いられるサイトカイン製剤に注目し、その幾つかを従来法で採取・培養したヒトMSCに添加し、マイクロアレイにより遺伝子発現変化を解析した。本予備実験の中で、エリスロポエチン（以下Epo）がCD31・endothelial specific molecule-1といった血管内皮細胞特異的遺伝子群の発現を誘導することがわかった。EpoはヒトMSCの向

血管新生能を増強し、血管内皮細胞様に分化させる可能性が示された。

2. 研究の目的

MSCは血管細胞への分化能に加え、血管保護因子を産生する。産生因子の中には血管内皮増殖因子（VEGF）、肝細胞増殖因子（HGF）やアドレノメジュリンなど血管新生因子の他に、血管新生の場を形成するためのマトリックス修飾因子も含まれている。

MSCを用い、より効果的で実践的な血管新生療法の開発を目指すため、本研究では、

（1）MSCの血管新生への効果およびCD271陽性細胞由来MSC（以下CD271MSC）の細胞機能の評価を行う。（2）MSCへのEpo添加の条件（量、投与日数など）設定を行ない下肢虚血モデルに投与し、効果およびメカニズムを検討する。

3. 研究の方法

（1）MSCの採取と培養

ヒトMSC：骨髄液採取後、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により純化採取を行った。採取後、速やかに培養。ラットMSC：大腿骨より骨髄液を採取し、比重遠心法で単核細胞を分離。分離後、プラスチック接着法によりMSCを採取、培養を行った。

培養法：基本培地MEMと20%FBSを用い標準化されたプロトコールに沿って培養を行った。Passage 5を中心に実験を行った。

（2）MSCの向血管新生能評価

○確立された分化条件で培養を行い、免疫染色で血管細胞分化を評価。

○馴化培地を作成しELISA法により培養上清中のVEGF・HGF濃度を測定する。

○虚血モデル：外科的処置によりマウス急性

心筋梗塞モデルおよびラット下肢虚血モデルを作成し、MSCもしくはMSC由来馴化培地を投与。組織学的検討で、CD31抗体による免疫染色を行い、心筋および骨格筋組織内の血管数を評価。

(3) MSCへのEpo効果の評価

エリスロポエチン添加: 0, 40, 80IU/ml で濃度設定を行った。

- 細胞増殖: 経時的な細胞数を評価。
- 細胞老化: senescence associated beta-gal染色で評価。
- 遺伝子発現: 網羅的遺伝子発現解析による検討。
- 下肢虚血モデル: 上述同様に外科的処置でラット下肢虚血モデルを作成し、MSCもしくはMSC+Epoを投与。レーザードップラー計により血流を評価。組織学的検討で、CD31抗体による免疫染色を行い、骨格筋組織内の血管数を評価。

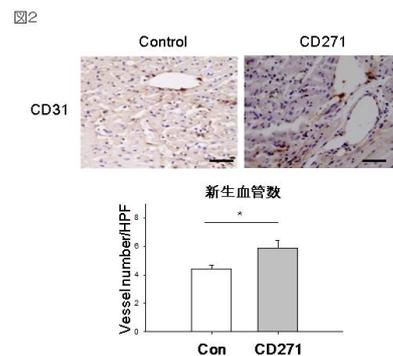
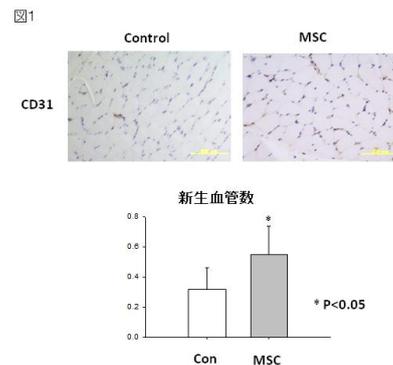
4. 研究成果

(1) MSCの向血管新生能

①ラット骨髄MSC: ラット下肢虚血モデルを作成しMSC移植を行ない、1週間後に屠殺、組織学的に血管数の評価を行った。MSC移植群 (n=11) ではコントロール群 (n=11) に比し、有意に新生血管の増加を認めた (図1)。1週後のMSCの組織内生着は認められなかった。そのため、MSCとラット骨格筋細胞において培養上清中の VEGF 濃度を比較したところ、MSCにおいて有意に高値であった ($p<0.05$)。

②ヒト CD271MSC: CD271MSCは形態、増殖能、分化能ともに従来法で採取したMSCと同様であった。至適条件下では、 α -smooth muscle actin 陽性の血管平滑筋様細胞やCD31 陽性の血管内皮様細胞に分化を認めた。また、CD271MSCはMSC同様に血管新生因子を放出することが知られている。細胞そ

のものではなく液性因子の in vivo での効果を検討するため、マウス心筋梗塞モデルを作成し24時間後に左心室より CD271MSC由来馴化培地を投与した。その結果、コントロール群 (n= 4) と比べ、治療群 (n= 5) において梗塞境界領域の血管数の有意な増加を認めた (図2)。

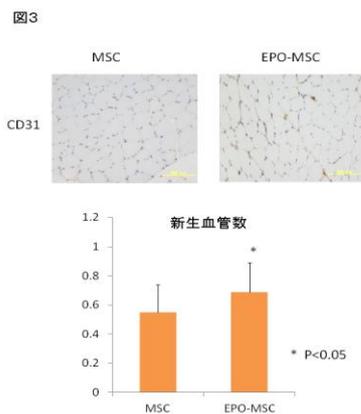


(2) EpoによるMSC修飾効果

①in vitro 実験系: ヒト・ラットMSCの培養液中に Epo 0 (コントロール), 40 (低濃度), 80 (高濃度) IU/ml の濃度設定で添加した。ヒトMSCにおいて、2日目では濃度依存性に細胞数の増加を認め、高濃度群は他の2群に比べ有意に細胞増殖を誘導していた ($p<0.05$)。しかしながら、コントロールでは経時的に細胞増殖を認めたのに対し、Epo添加群では5日目から10日目には細胞増殖は停止し、老化細胞数が増加していた。ラットMSCでも同様の傾向を認めた。網羅的解析遺伝子解析の検討では、高濃度2日間培養で VEGF や HGF の著明な発現増強を認めた。

この効果は、MSC 活性化サイトカインの1つである塩基性線維芽細胞増殖因子添加では認められなかった。背景で触れたように、Epo 添加では CD31 遺伝子発現もあり、内皮細胞分化の可能性も考えられたが、蛋白レベルでは検出・確認することが出来なかった。

②in vivo 実験系：①の検討より、ラットMSCが80%コンフルエント後に、高濃度Epo 添加培地に交換し2日間培養を行い、ラット下肢虚血モデルに移植した。対照群は通常培養MSC 投与群とした。MSC +Epo 群 (n=7) は、MSC 単独投与群 (n=8) より血流回復および新生血管の増加を有意に促進した (図3)。



(3) その他

①大型動物虚血性心不全モデルへのMSC 移植実験の検討の一部も行った。MSC 投与は小型動物での検討同様に血管新生を促進し、心機能を保持した。

②Epo は、骨髄MSCと同様に骨格筋由来MSCも活性化した。

(4) まとめと今後の展望

MSC による心血管再生の研究はこれまでも報告されているが、本研究ではより詳細な検討を行い、MSC 移植による血管新生増強は、パラクライン効果とその主たる機序である

ことを明らかにした。

また、CD271 発現で選択的に純化されたMSCの向血管新生能の証明は、国内外で初めての報告である。MSCはEpo 受容体発現があるもののEpo の作用は不明であったが、本研究により、高濃度短期間のEpo によるプレコンディショニングは、培養MSCの細胞増殖を促進し、VEGF 発現を増強することが明らかになった。下肢虚血モデルの検討では、MSC +Epo 投与群はMSC 単独投与群より有意に血管新生を誘導した。つまり、Epo はMSC のパラクライン効果を増幅させる可能性が示された。

MSCは少量の骨髄液より培養可能で、増幅させ治療に必要な細胞数を得ることができる。自己細胞なら安全性・倫理面で問題は少なく、またEpo も既に腎不全の臨床において使用されている。MSC +Epo 併用の新規血管新生治療は安全性・有効性の観点から十分に臨床応用可能であり、重症虚血肢治療の強力なオプションとして確立し得ると考えられる。

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9件)

- (1) Iso Y, Yamaya S, Sato T, Poole CN, Isoyama K, Mimura M, Koba S, Kobayashi Y, Takeyama Y, Spees JL, Suzuki H. Distinct Mobilization of Circulating CD271⁺ Mesenchymal Progenitors from Hematopoietic Progenitors during Aging and after Myocardial Infarction. *Stem Cells Transl Med.* 2012(in press) 査読あり
- (2) Iso Y, Watanabe T, Shoji M, Suzuki H. Stem/progenitor cell-based approach for restenosis after percutaneous coronary intervention: Application of bone marrow

progenitors and future perspective. *Translational Medicine* 2012 (in press) 査読あり

(3) Watanabe T, Sato K, Itoh F, Iso Y. Pathogenic involvement of heregulin- β (1) in anti-atherogenesis. *Regul Pept.* 2012;175:11-4. 査読あり

(4) Sato T*, Iso Y*, Uyama T, Kawachi K, Wakabayashi K, Omori Y, Soda T, Shoji M, Koba S, Yokoyama SI, Fukuda N, Saito S, Katagiri T, Kobayashi Y, Takeyama Y, Umezawa A, Suzuki H. Coronary vein infusion of multipotent stromal cells from bone marrow preserves cardiac function in swine ischemic cardiomyopathy via enhanced neovascularization. *Lab Invest.* 2011;91:553-564. *equal contribution. 査読あり

(5) Kawachi K, Iso Y. Sato T, Wakabayashi K, Kobayashi Y, Takeyama Y, Suzuki H. Effects of erythropoietin on angiogenesis after myocardial infarction in porcine. *Heart Vessels* 2011;27(1):79-88. 査読あり

(6) Watanabe T, Sato K, Itoh F, Iso Y. Nagashima M, Hirano T, Shichiri M The roles of salusins in atherosclerosis and related cardiovascular diseases. *J Am Soc Hypertens* 2011;5:359-65. 査読あり

(7) 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. 査読あり

(8) Mori H, Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Sato A, Endo K, Iso Y. Suzuki H, Takeyama

Y, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Shioda S. Cardioprotective effect of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on Doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Circ J.* 2010;74:1183-90. 査読あり

(9) Ozawa T, Toba K, Suzuki H, Kato K, Iso Y. Akutsu Y, Kobayashi Y, Takeyama Y, Kobayashi N, Yoshimura N, Akazawa K, Aizawa Y; EPO/AMI-I Pilot Study Researchers. Single-dose intravenous administration of recombinant human erythropoietin is a promising treatment for patients with acute myocardial infarction - randomized controlled pilot trial of EPO/AMI-1 study -. *Circ J.* 2010;74:1415-23. 査読あり

[学会発表] (計10件)

(1) Iso Y. et al. Impact of Small Dense LDL-cholesterol Levels on Older Women with Acute Coronary Syndromes Independently of LDL-cholesterol Levels. 日本循環器学会 2012 (福岡、2012. 3. 16-18)

(2) Iso Y., et al. Bone marrow mesenchymal stem cells prevent vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia after arterial injury in rats by altering smooth muscle cell phenotype. American Heart Association 2011 (Orlando, Nov. 13-16)

(3) Iso Y., et al. Perivascular administration of mesenchymal stem cells from bone marrow inhibits neointimal formation in a paracrine fashion. European Society of Cardiology 2011 (Paris, Aug. 27-31)

(4) 磯 良崇ほか。骨髄間葉系幹細胞を用い

た重症虚血肢治療の前臨床研究。日本脈管学会 2011 (岐阜、2011. 10. 20-22)

(5) Iso Y., et al. Significance of single center multidisciplinary approach to treatment of patients with critical limb ischemia. シンポジウム 3, 日本循環器学会 2011 accepted abstract (東北大震災のため中止)

(6) Iso Y., et al. Human Bone Marrow Progenitor Cells Derived From CD271+ Stem Cells Secrete Factors That Improve Cardiac Function After Myocardial Infarction and Activate Adult Resident Cardiac Progenitors. American Heart Association 2010 (Chicago, Nov. 14-16)

(7) Iso Y., et al., Elevated levels of hepcidin, inflammation and culprit coronary lesions in patients with acute myocardial infarction. European Society of Cardiology 2010 (Stockholm, Aug. 31)

(8) Iso Y., 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 (Atlanta, Mar. 14-16)

(9) Iso Y., et al. Elevated levels of hepcidin-25 in patients with acute myocardial infarction. 第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会(岐阜、2010. 7. 15-16)

(10) 磯 良崇ほか。末梢動脈疾患の集学的治療における運動療法・リハビリテーションの意義. 第 16 回日本心臓リハビリテーション学会(鹿児島、2010. 7. 17-18)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯 良崇 (Iso Yoshitaka)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：60384244

(2) 研究協力者

山谷清香 (Yamaya Sayaka)

昭和大学大学院医学研究科博士課程

Jeffrey Spees

バーモント大学医学部准教授