

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390336

研究課題名(和文)自己骨髄由来幹細胞を用いた心血管再生における新たな治療戦略

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategies using autologous bone marrow-derived stem cells for vascular regeneration

研究代表者

濱野 公一 (HAMANO, Kimikazu)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60263787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：自己幹細胞を用いた心血管再生治療の効果は限定的であり、患者による効果の違いも認められていた。我々は細胞を移植前に低酸素状態に短時間晒すことにより細胞機能の増強が誘導できることを明らかにしており、本研究ではこの低酸素プレコンディショニング法を臨床応用すべく研究を進めた。末梢血管障害を誘導した中型動物より採取した末梢血由来の自己幹細胞を、低酸素プレコンディショニング処理した後に虚血下肢へ移植すると、細胞移植28日後に極めて高い血管新生効果とそれに伴う血流の改善が認められ、さらにヒト末梢血由来幹細胞においても細胞機能の増強が認められたことから、本法の臨床における有効性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Autologous transplantation of stem cells often shows limited clinical outcomes, and a discrepancy of therapeutic effects between patients have been reported. Based on our previous studies demonstrating that hypoxic pre-treatment reinforces cellular functions in small animal experiments, we planned to apply hypoxic pre-treatment protocol to patients with vascular disease. In this study, we examined whether autologous transplantation of peripheral blood-derived stem cells (PBSCs) which have preconditioned in hypoxic incubation accelerates angiogenesis in the hypoxic tissues. Autologous transplantation of preconditioned-PBSCs resulted in an acceleration of angiogenesis and an improvement of blood flow in the hypoxia-induced hindlimb of middle animals. We also demonstrated that hypoxic pretreatment induces reinforcement of cellular functions in human PBSCs. Taken together, hypoxic pretreatment of stem cells is promising therapeutic approach for human clinical trials.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：自己細胞移植 血管障害 末梢血由来幹細胞

1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループは自己骨髄由来幹細胞を含む様々な幹細胞を用いた心血管再生治療に関する基礎と臨床研究に長年に渡り携わっており、1999年からは難治性虚血性心疾患および虚血肢疾患患者を対象とした世界初の臨床応用を行ってきた (Hamano et al., *Jpn Circ J.* 2001. 65: 845-847; *Cell Transplant.* 2002. 11: 747-752)。現在、骨髄幹細胞を含め様々な自己組織由来幹細胞を用いた心血管再生治療は世界各地の多くの施設で臨床応用がなされ、本治療法による虚血組織の血流増加や臨床症状の改善などの有効性が報告されている。自己組織由来幹細胞を用いた心血管再生治療法には拒絶反応や倫理的問題が存在しない為、将来的には難治性重症虚血性疾患患者に対する有用な治療法として大きな期待が寄せられている。

しかし、これまでの臨床試験では骨髄を含めた様々な組織由来幹細胞による心血管再生治療の治療効果は必ずしも十分であるとは言えず、患者ごとの治療効果のばらつきも認められている。その原因として、虚血環境 (炎症や酸化ストレスなど) の違いによって移植した幹細胞の生着率が極めて低いことや、加齢や糖尿病などにより移植幹細胞自身に機能障害が生じていることなどが考えられる。それ故に、自己幹細胞を用いた心血管再生治療の効果を向上させるには全く新しい治療戦略の構築が不可欠である。

2. 研究の目的

我々は、自己幹細胞を用いた心血管再生療法における上述の問題点を解決するために、過去数年間に渡り細胞レベル・小動物レベルでの検討を重ねてきた。その一連の研究を通じて、自己幹細胞を移植前に短時間、低酸素条件下で培養してから虚血部位に移植する“低酸素プレコンディショニング法”を考案した (Li et al., *Am J Cell Physiol Heart Circ Physiol.* 2002. 283: H468-473; Kubo et al., *Am J Cell Physiol Heart Circ Physiol.* 2007. 292: H2582-2588)。本手法を用いることにより、人為的に虚血状態を作り出したマウス下肢における骨髄由来および末梢血由来の幹細胞の移植効率の向上と血管新生の促進が認められた。

本研究では中型動物を用いた自己幹細胞移植を行い、“低酸素プレコンディショニング法”の臨床応用の足掛かりとする。

3. 研究の方法

(1) 下肢虚血中型動物モデルの作成

体重 3-3.5kg のニュージーランドホワイトラビット種の左肢大腿動脈とその分枝を麻酔科で切除し、下肢虚血中型動物モデルとした。モデル作成の成否はレーザー Doppler 計 (Periscan System; Perimed AD 社) を用いて行い、血流量が 30% 付近まで減少した個体を下肢虚血モデルとして細胞移植実験に

用いた。

(2) 末梢血由来幹細胞の単離

ラット耳静脈より血液を採取し、密度勾配法により幹細胞を単離した (Kubo et al., 2012. *PLoS One.* 7: e37934)。単離した末梢血由来幹細胞 (PBSCs) は、10% ウマ胎児血清を含む Dulbecco's-modified Eagle Medium (DMEM) 中で培養した。

(3) 末梢血由来幹細胞の低酸素プレコンディショニング

単離した自己ウサギ PBSCs は移植 24 時間前から 2% O₂, 33 条件下で培養し、1 x 10⁷ 細胞を虚血部に移植した。コントロール群として単離直後の自己 PBSCs (Fresh 群)、通常条件下で培養した自己 PBSCs を用いた。

(4) ストレス抵抗性の検討

低酸素プレコンディショニングを施したウサギ PBSCs に 100 μM H₂O₂ を添加し、通常条件下で培養した。3 日後に細胞内 ROS レベルや酸化条件下での細胞生存性について DCF 蛍光プローブによる解析およびプロピジウムイオダイド取り込み解析により検証した。

(5) ヒト末梢血由来幹細胞の単離と低酸素プレコンディショニング

ヒト PBSCs は上腕から採血した静脈血より単離し、中型動物由来 PBSCs と同条件下で低酸素プレコンディショニングを施した。処理後、H₂O₂ 曝露による酸化ストレス抵抗性や血管新生因子の発現量変化について ELISA 法などにより解析した。

4. 研究成果

(1) 中型動物を用いた低酸素プレコンディショニング法の有用性の検討

実臨床において心血管再生治療を必要とする患者は急性期と慢性期に大別されるが、末梢血管障害では特に糖尿病などの合併症として病態が現れることも多く、治療対象としては慢性期患者である場合が多い。我々のこれまでの研究では、小動物の大腿動脈切除後すぐに細胞を移植するという急性期モデルを用いてきた為 (Kubo et al., *Am J Cell Physiol Heart Circ Physiol.* 2008. 294: H590-595)、本研究では左肢大腿動脈とその分枝を切除した 7 日後に自己 PBSCs を移植する慢性期モデルを用いた検討を行った。

大腿動脈切除 6 日後に末梢血よりウサギ PBSCs を単離し、低酸素プレコンディショニング (Hypoxia) 群と通常培養 (Normoxia) 群、さらに移植直前に単離した (Fresh) 群を準備し、自家移植による血管新生促進効果を各群間で比較検討した。細胞移植の三週間後にレーザー Doppler による下肢血流量の測定を行い、動脈切除直後からの血流回復度 (Recovery 率) を算出し Normoxia 群と比較した。その結果、細胞移植三週間後に

Hypoxia 群において有意な血流量回復効果が認められた(図1)。小動物を用いたこれまでの結果と考え合わせると、Hypoxia 群において血管新生が促進されたことが予想される。

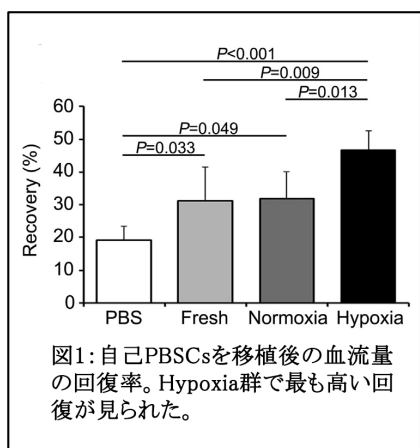


図1: 自己PBSCsを移植後の血流量の回復率。Hypoxia群で最も高い回復が見られた。

(2)低酸素プレコンディショニングによる酸化ストレス抵抗性の増大

続いて、低酸素プレコンディショニングの中型動物由来 PBSCs への酸化ストレス抵抗性に対する影響について *in vitro* で検証した。ウサギ静脈血から単離した PBSCs を低酸素条件下で 24 時間培養後、培地に H₂O₂ を添加しさらに三日間培養し、細胞回収後に DCF 蛍光プローブによる ROS レベルの測定およびプロピジウムイオダイド取り込みによる酸化条件下での細胞生存性の解析を行った。Normoxia 群との比較ではいずれの項目においても、Hypoxia 群の有意性が示された(図2)。この結果は、低酸素プレコンディショニングがウサギ PBSCs の酸化ストレス抵抗性を誘導していることを示唆しており、小動物のみならず中型動物においてもその細胞機能増強効果が示された。

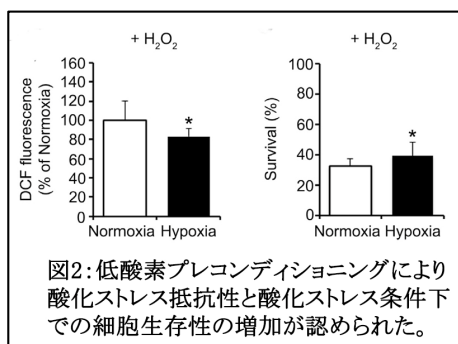


図2: 低酸素プレコンディショニングにより酸化ストレス抵抗性と酸化ストレス条件下での細胞生存性の増加が認められた。

(3)ヒト末梢血由来幹細胞に対する低酸素プレコンディショニングの効果

最後に我々は、低酸素プレコンディショニングのヒト PBSCs に対する効果を *in vitro* で検証した。フィコールを用いた密度勾配法によりヒト静脈血から PBSCs を単離し、小型・中型動物由来の PBSCs と同様の方法で低酸素プレコンディショニングを施した。低酸素処理後に、細胞生着性、VEGF 産生量、酸化

ストレス抵抗性の獲得の有無、酸化ストレス条件下での細胞生存性、の4項目について比較検討した結果、いずれの評価項目においても Hypoxia 群の優位性が示された(図3)。

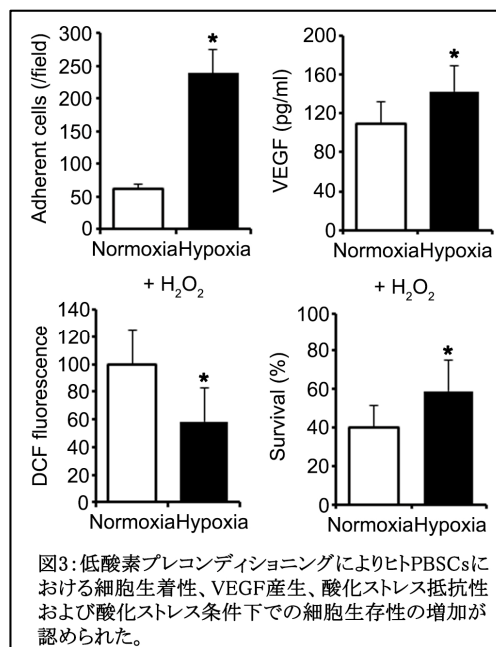


図3: 低酸素プレコンディショニングによりヒトPBSCsにおける細胞生着性、VEGF産生、酸化ストレス抵抗性および酸化ストレス条件下での細胞生存性の増加が認められた。

本研究の成果は臨床における低酸素プレコンディショニングの有用性を強く示唆するものであり、現在、厚生労働省にヒト幹細胞臨床研究の認可申請中である。認可され次第直ちに山口大学医学部附属病院における臨床試験を開始し、その有用性を実証する。

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4件)

(1) Kudo T, Hosoyama T, Samura M, Katsura S, Nishimoto A, Kugimiya N, Fujii Y, Li TS, Hamano K. Hypoxic preconditioning reinforces cellular functions of autologous peripheral blood-derived cells in rabbit hindlimb ischemia model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 444: 370-375. 査読有り

(2) Kubo M, Li TS, Kurazumi H, Takemoto Y, Ohshima M, Yamamoto Y, Nishimoto A, Mikamo A, Fujimoto M, Nakai A, Hamano K. Heat shock factor 1 contributes to ischemia-induced angiogenesis by regulating the mobilization and

recruitment of bone marrow stem/progenitor cells. *PLoS One*. 2012; 7: e37934. 査読有り

(3) Kubo M, Li TS, Kurazumi H, Takemoto Y, Ohshima M, Murata T, Katsura S, Morikage N, Furutani A, Hamano K. Hypoxic preconditioning enhances angiogenic potential of bone marrow cells with aging-related functional impairment. *Circ J*. 2012; 76: 986-994. 査読有り

(4) Li TS, Ikeda S, Kubo M, Ohshima M, Kurazumi H, Takemoto Y, Ueda K, Hamano K. Diabetic impairment of C-kit bone marrow stem cells involves the disorders of inflammatory factors, cell adhesion and extracellular matrix molecules. *PLoS One*. 2011; 6: e25543. 査読有り

〔学会発表〕(計9件)

(1) Hiroshi Kurazumi, Tao-Sheng Li, Kimikazu Hamano 「Mechanical stress/hemodynamic unloading affects the growth, release of paracrine factors, and differentiations of Cardiosphere-derived cells」 *Cell Symposia*. 2013年11月21日 (米国カリフォルニア州ロサンゼルス市)

(2) 工藤 智明、細山 徹、桂 春作、弘中 紫、大島 真子、久保 正幸、李 桃生、濱野 公一 「自己末梢血単核球を用いた血管新生療法における低酸素プレコンディショニングの前臨床試験」 第12回日本再生医療学会総会 2013年3月21日 (横浜、パシフィコ横浜)

(3) 藏澄 宏之、李 桃生、山本 由美、西本 新、久保 正幸、濱野 公一 「メカニカルストレスが細胞移植による心筋再生療

法に対して及ぼす影響」 第11回日本再生医療学会総会 2012年6月12日 (横浜、パシフィコ横浜)

(4) 藏澄 宏之、李 桃生、池永 茂、白澤 文吾、美甘 章仁、濱野 公一 「心臓が発生するメカニカルストレスに着目した心筋再生療法に関する研究」 第11回再生心臓血管外科治療研究会 2012年4月18日 (秋田、秋田キャッスルホテル)

(5) Hiroshi Kurazumi, Tao-Sheng Li, Masayuki Kubo, Shigeru Ikenaga, Akihito Mikamo, Kimikazu Hamano 「Mechanical stress suppresses the proliferation and improves the differentiation of cardiac stem cells and increases the release of paracrine factors」 ASCVTS 20TH ANNUAL MEETING. 2012年3月7日 (インドネシアバリ島)

(6) 久保 正幸、李 桃生、美甘 章仁、藤本 充章、中井 彰、濱野 公一 熱ショック転写因子 HSF1 は骨髄幹細胞の動態制御を介して、虚血組織での血管新生に關与する 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13日 (横浜、パシフィコ横浜)

(7) Masayuki Kubo, Tao-Sheng Li, Hiroshi Kurazumi, Yoshihiro Takemoto, Mako Ohshima, Kimikazu Hamano 「Hypoxic preconditioning enhances the angiogenic and therapeutic potential of bone marrow cells with age-related functional impairment」 American Heart Association Scientific Sessions. 2011年11月12日 (米国フロリダ州オーランド市)

(8) 藏澄 宏之、久保 正幸、大島 真子、李 桃生、濱野 公一 「骨髄由来細胞を用

いた血管再生治療に対する低酸素プレコンディショニング」 第 11 回心血管再生先端治療フォーラム 2011 年 7 月 2 日(東京、品川グランドセントラルタワー)

(9) 久保 正幸、李 桃生、藏澄 宏之、森景 則保、美甘 章仁、濱野 公一 「低酸素プレコンディショニングによる移植細胞の機能増強に基づいた血管再生治療法の開発」 日本循環器学会第 98 回中国・四国合同地方会 2011 年 5 月 13 日(徳島、あわぎんホール)

〔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：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱野 公一 (HAMANO, Kimikazu)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60263787

(2) 研究分担者

森景 則保 (MORIKAGE, Noriyasu)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50335741

李 桃生 (LI, Tao-Sheng)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授
研究者番号：50379997

久保 正幸 (KUBO, Masayuki)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：60420519
(平成 24 年度まで研究分担者)