

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究 B

研究期間：2011～2012

課題番号：23790887

研究課題名（和文）

血管内皮前駆細胞への低強度パルス型超音波刺激による新しい血管新生療法の開発

研究課題名（英文）

Ultrasound stimulation restores impaired neovascularization-related capacities of human circulating angiogenic cells

研究代表者

外山 康之 (TOYAMA YASUYUKI) 久留米大学・医学部・助教

研究者番号：40412506

研究成果の概要（和文）：

近年、末梢動脈疾患は高齢化、生活習慣病の増加を背景に患者数が増加してきている。症状が重篤化した重症虚血肢では下肢切断に至る場合も多く、効果的治療法の開発が急務とされている。重症下肢虚血症例への細胞移植による血管新生療法が臨床応用されるようになったが、その効果は未だ十分とは言えない。機械的刺激の負荷が血管内皮細胞の機能調節に重要なシグナルとなっていることが近年解明されている。そこで、本研究では移植前の血管内皮前駆細胞 (Circulating angiogenic cells: CAC) へ低強度パルス型超音波による機械的刺激を負荷することにより、同細胞が有する血管新生能を増強させ得るかについて検討した。

ヒト末梢血由来の CAC を培養し、培養期間中に低強度パルス型超音波刺激を加えた。超音波刺激により CAC の産生細胞数、遊走機能が増強され、培養液中のアンジオポエチン 2 および一酸化窒素濃度の有意な増加がみられた。ウェスタンブロットにより CAC の Akt リン酸化と eNOS 発現の増強を確認した。更にヌードマウス一側下肢虚血モデルにおいて、超音波前刺激を加えることで、CAC 移植後にレーザードブラによる評価で血流が増加し、CD31 陽性細胞で評価した毛細血管密度が増加した。動脈硬化患者由来の CAC を用いた実験でも同様の効果がみられた。

低強度パルス型超音波刺激は、非侵襲的に CAC の血管新生機能を高めることが可能であり、既存の血管新生療法の効果を増強させる新たな手段となり得る可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

Aims:

Unsatisfactory effects of therapeutic angiogenesis in critical limb ischaemia may be ascribed to use of circulating angiogenic cells (CACs) derived from atherosclerotic patients with impaired neovascularization-related capacities. We tested whether ultrasound cell stimulation can restore the impaired capacities.

Methods and results:

During culture of human peripheral blood-derived mononuclear cells for 4 days to achieve CACs, we stimulated the cells in culture daily with low-intensity pulsed ultrasound stimulation (LIPUS). Application of LIPUS to cells in culture derived from healthy volunteers augmented the generation and migration capacities of CACs, increased concentrations of angiopoietin 2 and nitrogen oxides in the culture medium, and increased the expression of phosphorylated-Akt and endothelial nitric oxide synthase in CACs on western blotting. Application of LIPUS to cells in culture derived from atherosclerotic patients also augmented the generation and migration capacities of CACs. Although neovascularization in the ischaemic hindlimb of athymic nude mice was impaired after intramuscular injection of CACs derived from atherosclerotic patients compared with that using CACs derived from healthy volunteers, LIPUS of the cells in culture derived from atherosclerotic patients restored the

neovascularization capacities.

Conclusion:

Therapeutic angiogenesis with LIPUS-pre-treated CACs may be a new strategy to rescue critical limb ischaemia in atherosclerotic patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：循環器内科

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：血管内皮前駆細胞、血管新生、超音波

1. 研究開始当初の背景

(1)近年、末梢動脈疾患（Peripheral arterial disease：PAD）は高齢化、生活習慣病の増加を背景に患者数が増加してきている。実際に欧米では、PAD全体が推定1,500～2,000万人存在し、症状が重篤化した重症虚血肢（Critical limb ischemia：CLI）症例が75万人とされている。CLI患者では、年間8万件以上の患者が下肢切断に至っており、CLIに対する効果的治療法の開発が急務とされている。

(2)我々は2000年よりCLIに至ったPAD患者を治療対象とした自家骨髄単核球細胞移植による血管新生療法の臨床試験を開始し、その効果と安全性について報告している（Tateishi-Yuyama et al. Lancet 2002）。この細胞療法は血管内皮前駆細胞（Circulating angiogenic cell: CAC）を応用したものであり、我々の臨床検討を含めた多くの報告では臨床効果として比較的良好な結果が示されているが、その一方で治療効果に乏しい症例もしばしば認められている。その理由の一つとして、動脈硬化危険因子（加齢、糖尿病、高血圧、脂質異常症）がCACの血管新生機能を低下させていることが挙げられる。実際、虚血性心筋症患者や動脈硬化危険因子をもつ患者においては細胞増殖数および遊走能が低下しており（Heeschen et al. Circulation 2004）、これらの各ステップにおける細胞機能を増強させることは血管新生能力の増強につながるものと考えられる。動脈硬化の危険因子をもつ虚血性心筋症の患者から採取した骨髄由来のCACは内皮型一酸化窒素合成酵素（endothelial NO synthase: eNOS）の活性が低下しているが、最近、eNOS活性を薬物により増強させることで同細胞の血管新生能力を回復・増強させたとの報告（Sasaki et al. PNAS 2006）がなされており、この考え方を裏付けている。

(3)機械的刺激の負荷が細胞機能調節に重要なシグナルとなっていることが近年解明されている（Orr et al. Dev Cell 2006）。また、

細胞分化には生化学的刺激のみではなく、機械的刺激の適切な負荷による誘導が有効であると理解されている（Engler et al. Cell 2006）。低強度パルス型超音波（Low-intensity pulsed ultrasound：LIPUS）は、有意な細胞障害を有さないレベルの機械的刺激であり、実際に細胞増殖・細胞分化効果を有しており、創傷や骨折において治癒・再生に臨床応用されている（Rutten et al. Bone 2008, Takeuchi et al. Arthritis Res Ther 2008）。最近、成熟内皮細胞においても細胞増殖効果およびeNOS活性化効果が報告されている（Altland et al. J Thromb Haemost 2004）。

2. 研究の目的

LIPUSという非侵襲的機械的刺激により、CACを用いた既存の血管新生療法の効果を増強させ、治療効果が不十分なCLI患者のQOLを向上させることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

まず、LIPUSを照射し、CACの細胞機能（増殖能、遊走能、分泌能）を細胞培養実験で評価する（計画1）。動物下肢虚血モデルを用いたLIPUS刺激CACの虚血肢筋注投与後の血流改善、血管新生増強についての評価（計画2）と並行して、LIPUS効果のメカニズムについて、細胞増殖・血管新生に関連する細胞内シグナルに焦点を当てて検証する（計画3）。低強度超音波発生装置としてすでに製品化している機器（KTAC-4000TM, NEPAGENE）を使用（図-1）。本実験での超音波照射システムおよび超音波条件設定の確立には、共同研究者であり、超音波エネルギーの治療応用の研究に従事している福岡大学解剖学講座立花克弘教授の指導、支援を得た。

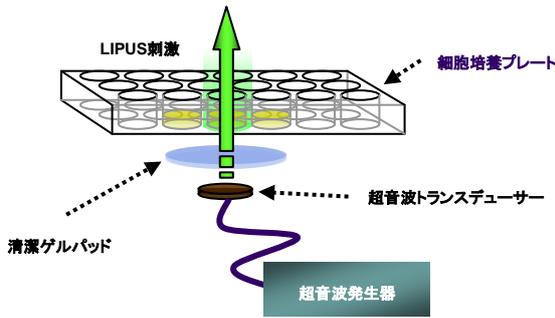
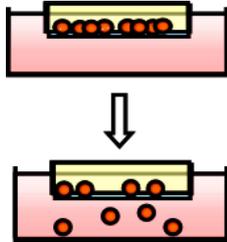


図-1 培養細胞への LIPUS 照射システム

一定の低強度刺激条件において、CAC の細胞数、遊走能を評価する。増殖・分化能は視野当たりの Dil-ac-LDL 取込み陽性細胞数により評価した。LIPUS 条件の至適化には、健康人由来細胞群、動脈硬化危険因子保有患者由来細胞群、両群で評価を行い、CAC 増殖数に加え、細胞遊走能といった血管新生機能の評価した。

図-2

Boyden-chamber assay による SDF-1 混合培養液を用いた CAC の遊走能の評価法のシエマ。Upper chamber から chemoattractant により、遊走した細胞数で評価する。



計画 2：下肢虚血動物での血管新生療法増強効果の検討

免疫不全マウス下肢虚血モデルを用いた血管新生能力評価

下肢虚血作製 1 週間後(慢性下肢虚血モデル)に LIPUS 照射または未照射の CAC を筋注投与する。各細胞懸濁液を筋注投与(細胞数: 50 万個/1 匹)する。14 日後における虚血下肢内の血管新生をレーザードップラー法による血流評価および免疫学的組織染色法(CD31 染色)による毛細血管密度評価にて行う。

計画 3：血管新生関連シグナル検討によるメカニズムの解明

LIPUS 刺激後の培養 CAC を用いて、血管新生関連シグナルとして、eNOS、Akt の反応をウスタンプロットにて検討する。

4. 研究成果

健康人由来 CAC を用いた ex vivo 実験において、LIPUS 照射後の培養 CAC 数は、30 mWatts/cm² の強度では変化はなく、100mWatts/cm²・60 秒ないし 240 秒の超音波を連日照射した群において有意に増加した。300 mWatts/cm² の超音波では培養CAC数が著明に減少した。

至適LIPUSを 100mWatts/cm²・240 秒と設定し実験を行った。LIPUS照射による培養液の温度変化はなかった。LIPUS照射後、trypan blue でみた viability の低下はなかった。100mW/cm²・240 秒のLIPUS刺激でCAC遊走能の有意な増強がみられた。フローサイトメトリにてLIPUS有および無のCACを比較したところ、内皮マーカーの発現に著変はなかった。しかし、LIPUS照射によってBrdU陽性細胞が有意に増加し、細胞増殖が促進されていることが分かった。LIPUS照射により、培養液中のVEGF・b-FGF・SDF-1・Ang-1 に変化はなく、Ang-2 に軽度だが有意な増加がみられた。また、ウスタンプロットにより、LIPUS単回照射後 1 時間から 6 時間にかけて徐々にeNOSの発現を増強させることが示された。照射前と比較して 6 時間後のeNOSは有意な増加がみられた。さらにLIPUS単回照射は 0.5 時間-1 時間後のリン酸化Aktの発現を増加させた。培養液中のNO_x濃度はLIPUS照射により徐々に増加し、2, 3, 6 時間後には有意に増加を認めた。

動脈硬化患者由来の CAC を用いた実験では、LIPUS は低下している患者由来 CAC の数、遊走能を健康人由来 CAC のレベルまで有意に回復させた。

ヌードマウス (BALB/cA-nu/nu) 一側下肢虚血モデルにおいて、LIPUS による前治療は CAC(健康者由来および患者由来)移植後の下肢血流増強効果を有意に上昇させた。更に組織免疫染色において、内転筋の CD31 陽性細胞で評価した毛細血管密度の増加効果(血管新生効果)を有意に上昇させた。

以上の成果から、LIPUS 刺激は CAC の有する血管新生能力を回復・増強し、既存の細胞治療の効果を増強することができる可能性があると考えられた。

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 1 件)

Ultrasound stimulation restores impaired neovascularization-related capacities of human circulating angiogenic cells

Yasuyuki Toyama, Ken-ichiro Sasaki, Katsuro Tachibana, Takafumi Ueno, Hidemi Kajimoto, Shinji Yokoyama, Masanori Ohtsuka, Hiroshi Koiwaya, Takaharu Nakayoshi, Yoshiaki Mitsutake, Hidetoshi Chibana, Naoki Itaya, and Tsutomu Imaizumi

Cardiovascular Research 95; 448-459, 2012
DOI : 10.1093
査読の有無 : 有

〔学会発表〕 (計 1 件)
AHA BCVS 2012
New Orleans, USA

発表標題 :
Ultrasound stimulation restores impaired
neovascularization-related capacities
of human circulating angiogenic cells

発表年月日 : 2012 年 7 月 23 日 ~ 2012 年 7 月
26 日

Yasuyuki _____ Toyama, Ken-ichiro
Sasaki, Katsuro Tachibana, Takafumi Ueno,
Hidemi Kajimoto, Shinji Yokoyama,
Masanori Ohtsuka, Hiroshi Koiwaya,
Takaharu Nakayoshi, Yoshiaki Mitsutake,
Hidetoshi Chibana, Naoki Itaya, and
Tsutomu Imaizumi

〔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

外山 康之 (TOYAMA YASUYUKI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号 : 40412506

(2) 研究分担者

研究者番号 :

(3) 連携研究者

立花 克郎 (TACHIBANA KATSURO)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号 : 40271605

