

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23日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791487

 研究課題名（和文） 低酸素プレコンディショニングにより骨髄細胞の血管再生機能が
 増強するか？

 研究課題名（英文） Can hypoxic preconditioning enhance angiogenic potency of
 bone marrow cells?

研究代表者

久保 正幸（KUBO MASAYUKI）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60420519

研究成果の概要（和文）：これまでに、申請者らは健常動物由来の骨髄細胞に対する *ex vivo* での低酸素プレコンディショニングが細胞移植治療の効果を向上させる簡便かつ有用な方法であることを報告してきた。しかし、加齢や様々な病態により細胞障害が生じることが知られており、そのような細胞に対しての低酸素プレコンディショニングがどのような効果をもたらすかは不明であった。本研究では加齢動物の骨髄細胞に対しても低酸素プレコンディショニングが有用であることを証明した。

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated that *ex vivo* hypoxic preconditioning of bone marrow cells from young healthy individuals can enhance their potency for inducing therapeutic angiogenesis. However, considering that advanced aged and systemic disease such as diabetes could contribute to dysfunction of bone marrow cells, the effect of hypoxic pretreatment on these functionally impaired cells is unknown. This study shows that hypoxic preconditioning enhances the angiogenic potency of the bone marrow cells with aged-related functional impairment.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

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：血管再生、プレコンディショニング、低酸素、骨髄細胞、再生医療、
 加齢、幹細胞、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

幹細胞を用いた再生修復治療は、世界中で多様な組織・臓器を対象とした臨床応用が行われ、その有効性と安全性が示されている。しかし、移植細胞の生着率が極めて低いといった問題もあり、必ずしも十分な治療効果が得られているとはいえない。また、加齢や糖尿病などの全身疾患を伴う臨床患者では幹細胞自体の機能低下も問題である。その解決

策として、移植細胞への遺伝子導入や *ex vivo* での増幅といった方法の有用性が報告されているが、操作の複雑さ、要する時間の長さ、安全性などの課題があり、臨床応用は困難といえる。そこで、治療効果を向上できる簡便かつ有用な方法の開発が望まれている。

我々は、短時間（24時間程度）かつ簡便な幹細胞の機能増強法として、移植前の *ex vivo* での低酸素培養（Hypoxic preconditioning）に

有効性を見出した。図1のように、低酸素プレコンディショニング後の細胞では、

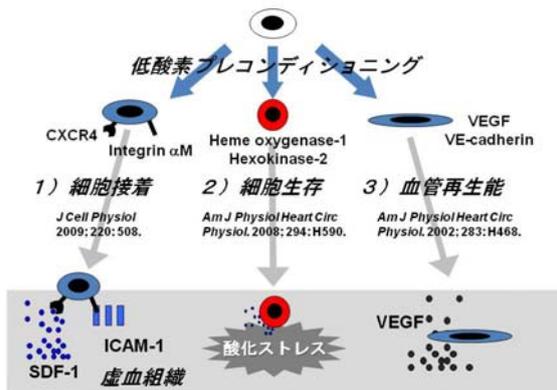


図1. 低酸素プレコンディショニングによる血管再生治療効果の向上メカニズム

- 1) 接着分子の発現亢進による細胞接着の上昇
- 2) 抗酸化・細胞生存分子の発現亢進に伴う酸化ストレス抵抗性獲得による細胞生存の上昇
- 3) 血管再生因子産生の促進などによる血管再生能の増強

によって、虚血組織へ移植後には血管再生治療の効果が向上することが明らかとなった。

これまでの研究では、若い健康動物由来の細胞が用いられてきた。しかし、血管再生治療を必要とする患者の大多数は高齢者で糖尿病などの様々な全身疾患を併発している。低酸素応答が細胞によって異なる点を考慮すると、加齢や病態下の細胞に対する低酸素プレコンディショニングが細胞機能に悪影響を及ぼす可能性も否定できない(図2)。

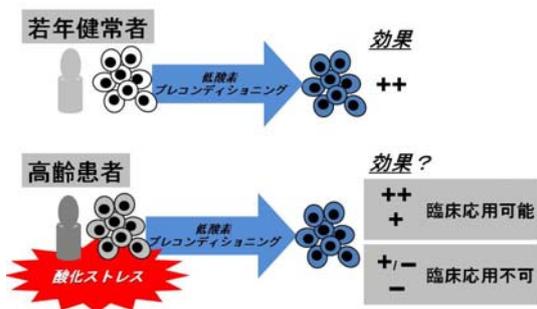


図2. 高齢患者の骨髄細胞に対する低酸素プレコンディショニングの効果は?

従って、臨床応用を考える上では、加齢や病態下で機能が低下した骨髄細胞に対する低酸素プレコンディショニングの効果と安全性を検証することが不可欠と考えられる。

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) 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が、細胞機能や血管再生治療効果に及ぼす影響
- (2) 若い健康動物の骨髄細胞に対して低酸素プレコンディショニングを行った場合と比較して、加齢動物の骨髄細胞での反応性の違いの有無

3. 研究の方法

(1) 実験動物および骨髄細胞の単離

実験動物として、加齢(Aged; 20-22 ヶ月齢)および対照(Young; 3 ヶ月齢)のC57BL/6マウスを用いた。大腿骨から骨髄を採集し、比重遠心法にて骨髄単核球を単離した。

(2) 加齢が骨髄細胞の細胞機能に及ぼす影響の評価

加齢が骨髄細胞に及ぼす影響を、数と質の面から評価した。単離直後の骨髄細胞を用いて、幹細胞マーカーCD34またはc-kit陽性細胞をフローサイトメトリーにて定量評価した。また、細胞老化マーカーp53の発現をWestern blot法にて解析した。さらに、テロメラーゼ活性について、TRAP(Telomeric Repeat Amplification Protocol)法にて定量評価した。

(3) 骨髄細胞の低酸素プレコンディショニング

単離後の骨髄細胞を低酸素(Hypoxia, 2%O₂; 低酸素プレコンディショニング)または正常酸素(Normoxia, 20%O₂)条件下で33°C、24時間培養後、以下の*in vitro*および*in vivo*での検討を行った。

(4) 低酸素プレコンディショニングが細胞機能に及ぼす効果の評価

低酸素プレコンディショニングが細胞機能に及ぼす効果を*in vitro*で評価した。上記(3)のように培養後の細胞を、酸化ストレス負荷(100 μM H₂O₂)条件下で37°C、1日間培養後、細胞生存を評価した。また、フィブロネクチン上で37°C、1日通常培養後、細胞接着を評価した。さらに、培養3日後の上清中のVEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)産生をELISA法にて定量すると共に、培養7日後に免疫染色にて内皮分化マーカーVE-cadherin陽性細胞を定量することで、血管再生能について評価した。

(5) 低酸素プレコンディショニングが細胞移植治療に及ぼす効果の評価

低酸素プレコンディショニングが細胞移植治療に及ぼす効果を*in vivo*で評価した。Agedマウスの下肢虚血モデルを作製後、虚血下肢筋肉内に上記(3)のように培養後の骨

髓細胞を直接移植した。移植 14 日後に、レーザードップラー法にて虚血下肢の血流量の変化を測定することで、血管再生治療効果を評価した。また、凍結切片作製後、虚血下肢における毛細血管密度をアルカリフォスファターゼ法にて評価した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

①加齢が骨髄細胞の細胞機能に及ぼす影響

Young マウスと比較して、Aged マウスの骨髄細胞では、幹細胞マーカー CD34 および c-kit 陽性細胞率が有意に減少していた ($P < 0.01$)。また、Aged マウスの骨髄細胞において、細胞老化マーカー p53 の発現上昇 ($P < 0.01$) やテロメラーゼの活性低下 ($P < 0.05$) も認められた。以上から、加齢により、骨髄細胞において機能低下が生じることが確認された。

②低酸素プレコンディショニングが細胞機能に及ぼす効果

低酸素プレコンディショニングが細胞機能に及ぼす効果を *in vitro* で評価した。Young マウスと比較して、Aged マウスの骨髄細胞の細胞生存および接着は有意に低下していた ($P < 0.05$) が、低酸素プレコンディショニングによって有意な改善効果が得られた ($P < 0.01$)。また、Aged マウスの骨髄細胞において機能低下が認められた VEGF 産生能 ($P < 0.05$) や VE-cadherin 陽性細胞数 ($P < 0.05$) といった血管再生能についても、低酸素プレコンディショニングによる有意な増強効果が認められた ($P < 0.05$)。なお、以上の *in vitro* 解析において、低酸素プレコンディショニングによる細胞機能の増強効果に、Young マウスと Aged マウスの間で反応性の違いは認められなかった。

③低酸素プレコンディショニングが細胞移植治療に及ぼす効果

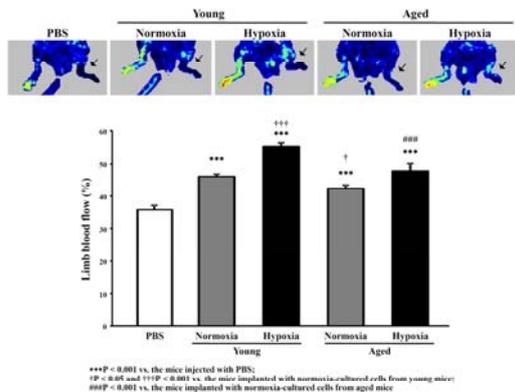


図3. 細胞移植後の虚血下肢での血流量変化
低酸素プレコンディショニングが細胞移

植治療に及ぼす効果を *in vivo* で評価した。Aged マウスにおいて、低酸素プレコンディショニング後の細胞を移植した虚血下肢では有意な毛細血管密度の増加 ($P < 0.05$) と血流量の上昇 ($P < 0.001$; 図3) が認められた。また、Aged マウスの骨髄細胞に対する低酸素プレコンディショニングによって得られた治療効果の増強は、Young マウスの骨髄細胞の場合と同程度であった。

④結語

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によって、細胞機能が増強すると共に、細胞移植による血管再生治療の効果を向上できることが分かった。また、低酸素プレコンディショニングによって加齢動物の骨髄細胞で得られた増強効果は、若い健康動物の骨髄細胞の場合と同程度であることが示された。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究において低酸素プレコンディショニングの有用性が立証できたことは、基礎研究にとどまらず、トランスレーショナルリサーチの観点からも意義深い成果であると考えられる。また、心血管のみならず他臓器の再生修復治療にも骨髄細胞が用いられている点を鑑みると、低酸素プレコンディショニングによる細胞機能の増強法の確立は他分野にも波及効果をもたらすことが期待できる。さらに、細胞移植による再生修復治療は、日本をはじめ世界中の施設で施行されており、本方法の有用性の立証は今後の臨床応用への契機となり、世界中の多くの患者への恩恵につながる可能性がある。

(3) 今後の研究の展望

これまでの我々の研究成果から、低酸素プレコンディショニングは、細胞移植による血管再生治療の効果を向上させる簡便かつ有用な方法であることが示唆された。また、本方法は特殊な機器や技術を必要とせず、一般的な施設で施行可能であることもあり、将来的な臨床応用が期待できる。

今後、ヒトの骨髄由来細胞を SCID マウスの虚血下肢筋肉に移植する実験、ならびに、ウサギ等の大動物を用いた実験を行うことで、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法の有用性ならびに安全性について、さらなる検証を行う必要がある。さらに、動物実験によって有用性と安全性を証明した後は、臨床試験への移行が期待される。

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, 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(5): e37934.

(査読有)

- ② 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.

Circulation Journal. 2012, 76(4): 986-994.

(査読有)

[学会発表] (計5件)

- ① 久保正幸, 李 桃生, 藏澄宏之, 大島真子, 美甘章仁, 藤本充章, 中井 彰, 濱野公一.

マウス下肢虚血モデルでの血管新生および骨髄幹細胞の動態制御における熱ショック転写因子 HSF1 の役割.

第11回日本再生医療学会総会

2012年6月14日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

- ② 久保正幸, 李 桃生, 大島真子, 西本 新, 山本由美, 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 欠損マウスでは骨髄幹細胞の動態が障害されることで、虚血組織での血管新生が低下する.

第53回日本生化学会中国・四国支部例会

2012年5月18日 岡山大学 創立五十周年記念館(岡山県)

- ③ 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関与する.

第34回日本分子生物学会年会

2011年12月13日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

- ④ Kubo M, Li TS, Kurazumi H, Takemoto Y, Ohshima M, Hamano K.

Hypoxic preconditioning enhances the angiogenic and therapeutic potential of bone

marrow cells with age-related functional impairment.

American Heart Association 2011 Scientific Sessions

2011.11.14 Orange County Convention Centre

(オーランド, アメリカ)

- ⑤ 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 あわぎんホール (徳島県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 正幸 (KUBO MASAYUKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 60420519

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし