

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791378

研究課題名(和文) ヒト末梢血単核球に対する低酸素プレコンディショニングの有用性と安全性の検証

研究課題名(英文) Verification of effectiveness and safeness of hypoxic preconditioning on the functional capacities of human peripheral blood mononuclear cells

研究代表者

村上 雅憲 (MURAKAMI, Masanori)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30448295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素プレコンディショニング処理されたヒト末梢血単核球細胞は、有意に機能増強しており、酸化ストレスに対する抵抗性、細胞生存力、VEGF産生量が増加していた。さらに、低酸素プレコンディショニング処理されたラビットの末梢血単核球細胞をラビット下肢虚血部位に自己移植すると有意に血管新生が誘導され、虚血部位の血流が改善した。本研究は末梢血単核球細胞の低酸素プレコンディショニング処理は虚血部位の血管新生を促進させる有効な方法であることを示している。

研究成果の概要(英文)：Hypoxic preconditioned human peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs) displayed significantly enhanced functional capacities and increased the resistance to oxidative stress, cell viability, and production of vascular endothelial growth factor. In addition, autologous transplantation of hypoxic preconditioned rabbit PBMNCs significantly induced new vessels and improved limb blood flow in rabbit hindlimb ischemia. Our study demonstrate that hypoxic preconditioning of PBMNCs is an effective way for enhancing angiogenesis in ischemic tissue.

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：低酸素プレコンディショニング 末梢血単核球細胞

1. 研究開始当初の背景

当教室で開発された自己骨髄由来細胞を用いた血管再生治療 (Jpn Circ J. 2001; 65: 845, Cell Transplant. 2002; 11: 747) は難治性重症虚血性疾患に対する有望な治療法であり、日本をはじめ世界中の多くの施設で臨床応用されている。大規模臨床試験においても一定の有効性と安全性が確認されている。しかし、虚血組織内(酸化ストレス亢進状態)での移植細胞の生着率が極めて低い問題(24 時間後の生着率 5%以下)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。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が考案されて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、安全性等の課題が残る。

これまでに当教室では、健常マウス由来の細胞を用いて、短時間かつ簡便な移植細胞の機能増強の方策として、移植前の *ex vivo* での低酸素培養(低酸素プレコンディショニング)の有効性を証明してきた。

低酸素プレコンディショニング後の細胞では、

- (1) 接着分子の発現亢進による細胞接着能の亢進
- (2) 抗酸化・細胞生存関連分子の発現亢進による酸化ストレス抵抗性獲得および細胞生存力の上昇
- (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。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。このような病態では、移植細胞における酸化ストレスの亢進や血管再生機能の低下が明らかとなっている。

こうした点を考慮すると、加齢や糖尿病下の細胞においても、低酸素プレコンディショ

ニングによる血管再生機能の増強効果が得られるかについては検討の余地があった。そこで、加齢動物や糖尿病動物由来の機能低下を示した細胞に対する低酸素プレコンディショニングの効果を検証した結果、若い健常マウスの場合と同様に細胞機能の増強がもたらされ、細胞移植による治療効果が向上することも明らかとなった。

以上のことから、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り、将来的には臨床応用が期待でき、臨床試験の実施が望まれる。しかし、臨床試験の前に、ヒト由来の末梢血単核球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必要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト(健常者および臨床患者)由来の末梢血単核球を用いて、低酸素プレコンディショニングの効果を検証することを目的とし、研究期間内に以下の点を明らかとする。

- (1) ヒト由来の末梢血単核球に対する低酸素プレコンディショニングが、細胞接着・細胞生存・血管再生能といった細胞機能を増強できるか?
- (2) 低酸素プレコンディショニング後のヒト末梢血単核球を虚血組織へ移植すると、血管再生治療の効果が向上するか? また、安全であるか?

3. 研究の方法

これまでに、マウス由来の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の増強がもたらされ、細胞移植による血管再生治療の効果が向上することを明らかとしてきた。本研究では、臨床応用を視野に入れ、ヒト(健常者および臨床患者)由来の末梢血単核球に対する低酸素プレコンディシ

ヨニングの効果と安全性を検証することを目的として、以下の解析を行う。

in vitro での解析：細胞接着・細胞生存・血管再生能を評価する。

in vivo での解析：SCID マウスの虚血下肢に移植を行うことで、血管再生治療効果への影響(有用性)ならびに安全性を評価する。

4. 研究成果

健常者の末梢血単核球細胞(PBMNCs)が低酸素プレコンディショニング(2%酸素濃度、33、24時間)により受ける種々の影響について解析した。健常者上腕の皮静脈より採血し、血清分離後に比重遠心法により単離されたPBMNCsを低酸素プレコンディショニングし、FACS解析を行ったところ、PBMNCs中のCD3、CD4、CD8、CD15陽性細胞の割合は、対照群と比べて変化せず、低酸素処理はPBMNCsの細胞分画に影響を及ぼさないことが明らかとなった。次に、低酸素プレコンディショニングによって健常者のPBMNCsが機能増強されているか否かについて細胞接着性、血管新生因子VEGFの産生能、酸化ストレス抵抗性を指標として検討した。その結果、低酸素プレコンディショニングによって有意な細胞接着能の増大が認められた(図1A)。また、接着細胞中のCD31陽性細胞数を検討したところ、低酸素プレコンディショニング処理された群においてCD31陽性細胞率が増加していた。続いて、低酸素プレコンディショニング処理されたPBMNCsの培養上清中のVEGF濃度をELISA法により算出したところ、対照群と比べて有意なVEGF産出量の増加が認められた(図1B)。さらに、低酸素プレコンディショニング処理後に過酸化水素処理を行い、酸化ストレス抵抗性を検討したところ、低酸素処理群では、対照群に比べてReactive Oxygen Species (ROS)産出量の低下(図1C、D)および細胞生存率の上昇が認められた(図1E、F)。以上の結果より、低酸素プレコンディシ

ヨニングによってPBMNCsの機能増強が誘導されることが明らかとなった。

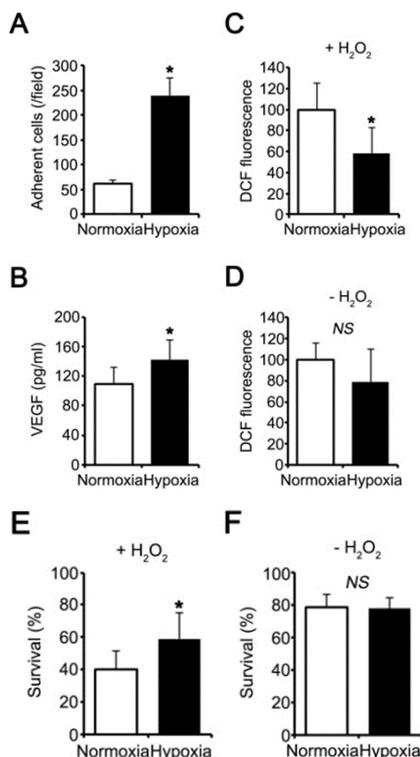
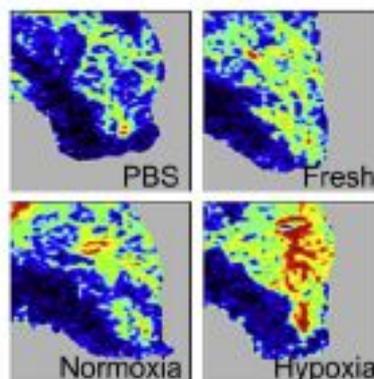


図1. 健常者PBMNCsの細胞接着能、VEGF産生量、活性酸素産生量、細胞生存率における低酸素プレコンディショニング効果の検討

さらに、ウサギの下肢虚血部位に低酸素プレコンディショニングされたウサギPBMNCsを自己移植したところ、有意に血管新生が誘導され、下肢の血流が回復した(図2A-B)。

A



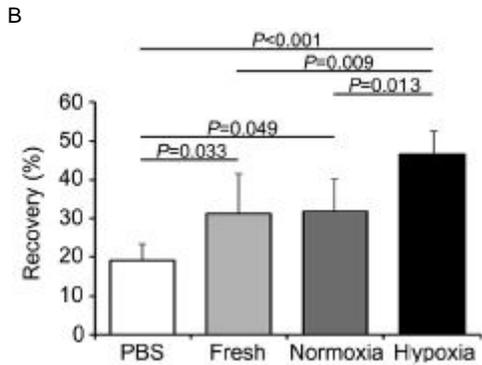


図 2. 低酸素プレコンディショニングされたウサギ PBMCs 移植によるウサギ下肢虚血部位の血流の変化

以上より、低酸素プレコンディショニングされた PBMCs は虚血部位における血管新生を誘導し、血流が回復されることが示唆され、有効な血管再生治療法であると考えられる。

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 3 件)

1. Murakami M, Gohra H, Yagi T, Jinbou M, Kobayashi T, Saito S, Takahashi T, Shiomi K, Ono S, Hamano K. Heart Lung Circ. 2014 ;in press. 査読有. DOI:10.1016/j.hlc.2014.04.004. Surgical Procedure for Coronary Artery Ectasia Associated with Saccular Fistula.
2. Murakami M, Morikage N, Samura M, Yamashita O, Suehiro K, Hamano K. Ann Vasc Surg. 2014 ;28(3):575-8. 査読有. Fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography for diagnosis of infected aortic aneurysms.
3. Murakami M, Kurazumi H, Suzuki R, Takahashi M, Mikamo A, Hamano K. Ann Thorac Surg. 2013 ;95(4):1458. 査読有. Valve replacement for papillary fibroelastoma involving the mitral valve chordae.

[学会発表](計 4 件)

1. 村上雅憲、佐村 誠、上田晃志郎、山下修、末廣晃太郎、森景則保、濱野公一、傍腎動脈腹部大動脈瘤手術における腎保護法の検討、第 54 回日本脈管学会総会、2013 年 10 月 10-12 日、ステーションコンファレンス東京(東京)
2. 村上雅憲、河村大智、永瀬 隆、佐村 誠、

山下 修、末廣晃太郎、森景則保、濱野公一、両側内腸骨動脈塞栓を併用した腹部大動脈瘤ステントグラフト内挿術後における殿筋跛行の検討、第 41 回日本血管外科学会学術総会、2013 年 5 月 29-31 日、大阪国際会議場(大阪)

3. 村上雅憲、永瀬 隆、佐村 誠、山下 修、末廣晃太郎、森景則保、濱野公一、大動脈峡部から胸部下行大動脈に発生した外傷性大動脈損傷に対する治療経験 - TEVAR or 保存的加療 -、第 53 回日本脈管学会総会、2012 年 10 月 11-13 日、ステーションコンファレンス東京(東京)
4. 村上雅憲、山下 修、末廣晃太郎、森景則保、濱野公一、当科における下腿三分枝以下に対する血管内治療の成績(会長要望演題)、第 40 回日本血管外科学会学術総会、2012 年 5 月 23-25 日、長野ビッグハット(長野)

[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

村上 雅憲(MURAKAMI, Masanori)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 30448295

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし