

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462162

研究課題名(和文) 臨床応用を目指した幹細胞プレコンディショニングによる血管細胞治療の効果の向上

研究課題名(英文) Therapeutic angiogenesis with preconditioned stem cells for clinical settings

研究代表者

桂 春作 (KATSURA, Shunsaku)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40457304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血単核球(PBMNCs)は虚血下肢の血管新生を誘導する強力な細胞移植ツールであるが、従来の移植方法では重症下肢虚血患者における治療効果は軽微である。本研究では、PBMNCsに対する低酸素プレコンディショニング法が下肢虚血の有効な治療手段となり得るかを自家細胞移植系で検証した。結果、低酸素で刺激したウサギPBMNCsは細胞機能が賦活化された。また、低酸素処理したPBMNCsをウサギ下肢虚血モデルへ自家移植すると、血管新生促進と血流改善が生じた。これらの結果は、低酸素プレコンディショニング法が虚血組織における移植細胞の生着性の向上や血管新生促進を誘導する有用性の高い手法であることを示している。

研究成果の概要(英文)：Peripheral blood mononuclear cell (PBMNC) is one of powerful tools for therapeutic angiogenesis in hindlimb ischemia. However, traditional approaches with transplanted PBMNCs show poor therapeutic effects in severe ischemia patients. In this study, we used autograft models to determine whether hypoxic pretreatment effectively enhances the cellular functions of PBMNCs and improves hindlimb ischemia. Preconditioned rabbit PBMNCs showed significantly enhanced functional capacities in resistance to oxidative stress, and cell viability. In addition, autologous transplantation of preconditioned rabbit PBMNCs significantly induced new vessels and improved limb blood flow. Our study demonstrated that hypoxic preconditioning of PBMNCs is a feasible approach for increasing the retention of transplanted cells and enhancing therapeutic angiogenesis in ischemic tissue.

研究分野：小児外科

キーワード：細胞移植治療 末梢血単核球 低酸素プレコンディショニング 前臨床試験

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 (Hamano *et al.*, *Jpn Circ J.* 2001. 65: 845-847) は、重症虚血患者に対する治療法で多くの施設で臨床応用され有効性が報告されている。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および生存率が低く、必ずしも十分な治療効果が得られているとはいえない。従って、移植後の虚血組織内での細胞生着率および生存率を上昇させることが治療効果の向上につながると考えられた。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、そ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、等の課題が残っている。

これまでに当教室では、小動物 (マウス) の細胞を用いた移植細胞機能を増強させる方法として、移植前に細胞を *ex vivo* で低酸素培養 (低酸素プレコンディショニング) することにより、短時間かつ簡便に細胞機能が増強されることを報告し、その有用性を証明してきた (Kubo *et al.*, *J Cell Physiol.* 2009. 220: 508-514)。我々がこれまでに明らかにしてきた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は、血管再生因子の産生亢進による血管再生能の増強、抗酸化・細胞生存分子の発現亢進による酸化ストレス抵抗性獲得に伴う細胞生存の上昇、細胞接着分子の発現亢進による細胞接着の上昇により、虚血組織内へ細胞移植後には血管再生治療効果が向上すること、などであり (Kubo *et al.*, *Circ J.* 2012. 76: 986-994)、スピードが求められる実臨床においても十分に利用可能な極めて有効な細胞機能増強法と言える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでに我々が培養細胞やマウスを用いた基礎実験で蓄積して

きた“低酸素培養による細胞機能の賦活化と重症虚血肢における治療効果”を、より大型の動物 (ウサギ) を用いて前臨床的に証明すること (非臨床 Proof of Concept 試験) である。

3. 研究の方法

本研究では、今後の臨床応用への移行を視野に入れ、中型動物 (ウサギ) 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有効性と安全性を検証することを目的として、*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 (低酸素プレコンディショニング処理した自己細胞をウサギ虚血下肢に移植し、血管再生治療効果への影響 (有効性) および安全性を評価する) などを行った。

実験手法の詳細は以下に示す。

(1) 末梢血単核球の単離と低酸素プレコンディショニング

ウサギ (オス: 3-3.5kg) の耳静脈から採血し、比重遠心法により末梢血単核球 (PBMCs) を単離した。単離した PBMCs を、未処置群 (Fresh)、通常酸素 (20%酸素) 培養群 (Normoxia)、低酸素 (2%酸素) 培養群 (Hypoxia) の 3 群に分け実験に使用した。Normoxia 群と Hypoxia 群は 24 時間それぞれの酸素濃度で培養し、Fresh 群は培養しないものとした。

(2) 細胞接着能の解析

低酸素プレコンディショニングを施した PBMCs をフィブロネクチンコーティングした 24 ウェル培養皿へ播種し、24 時間後に PBS で軽く洗浄し接着細胞数を計測した。

(3) 半定量的遺伝子発現解析

低酸素プレコンディショニングを施した PBMCs から RNA を抽出し (RNA isolation kit: キアゲン社)、ウサギ CXCR4 遺伝子発現

を半定量的 PCR 法により解析した。

(4) 酸化ストレス抵抗性試験

低酸素プレコンディショニングを施した PBMNCs に 100 μ M の過酸化水素を加え 24 時間培養した。培養終了後、活性酸素 (ROS) 産生を DCF プローブ (Lamda Fluorescence Technology 社) により定量化し、酸化ストレス抵抗性を評価した。

(5) 細胞生存試験

低酸素プレコンディショニングを施した PBMNCs を回収し、フローサイトメーター (ベックマン社) によりアネキシン V およびヨウ化プロピジウム陽性細胞数を算出し、アポトーシスが生じている細胞数および生細胞数を比較検討した。

(6) 下肢虚血モデルの作出と細胞移植試験

麻酔下でウサギの下肢左大腿動脈、膝窩動脈およびその分枝を除去し、下肢虚血モデルを作出した。レーザードップラー計で下肢血流が抑制されたのを確認したのち、手術 6 日後に自己 PBMNCs を採取し低酸素プレコンディショニングを施した。プレコンディショニング 24 時間後に、機能賦活化した PBMNCs、通常培養した PBMNCs をそれぞれ虚血下肢へ移植した (1×10^7 細胞を 6 箇所筋注)。また、コントロールとして PBS (10 μ l) を投与した群も用意した。なお、移植細胞の残存性を評価するために PBMNCs にはあらかじめ蛍光色素 (PKH26 : シグマ社) を取り込ませておいた。

(7) レーザードップラー計による血流評価

下肢虚血作製の 3、7、14、21、28 日後および移植直後にレーザードップラー血流計 (PeriScan System: Perimed AB 社) を用いて血流回復率を比較した。

(8) 血管新生の評価

PBMNCs 移植 21 日後 (虚血下肢作製 28 日後) のウサギ虚血下肢を採取し、骨格筋凍結切片上で血管密度を評価した。血管を可視化するために、アルカリホスファターゼ (ALP) 染色を実施し、筋線維あたりの ALP 陽性血管面積を算出した。

(9) 統計解析

SPSS ソフトウェア (IBM 社) を用いて 2 群間および多群間の統計解析を行った。

4. 研究成果

(1) 低酸素プレコンディショニングによりウサギ PBMNCs の接着性が向上する

まず、ウサギ耳静脈から採取した血液から比重遠心法により PBMNCs を単離した。続いて、単離したウサギ PBMNCs を低酸素条件 (2% 酸素) で 24 時間培養し、細胞接着能の向上が見られるか否かを検証した。

低酸素処理したウサギ PBMNCs と通常酸素条件で培養 (20% 酸素) した PBMNCs を、フィブロネクチンコーティングした細胞培養皿に播種し、24 時間後の細胞接着性について評価したところ、低酸素処理したウサギ PBMNCs において高い細胞接着性が認められた (Figure 1A)。また、細胞接着や細胞遊走に関与するケモカインレセプター CXCR4 の遺伝子発現を比較したところ、低酸素処理したウサギ PBMNCs において有意に発現亢進していた (Figure 1B)。これらの結果は、小動物 (マ

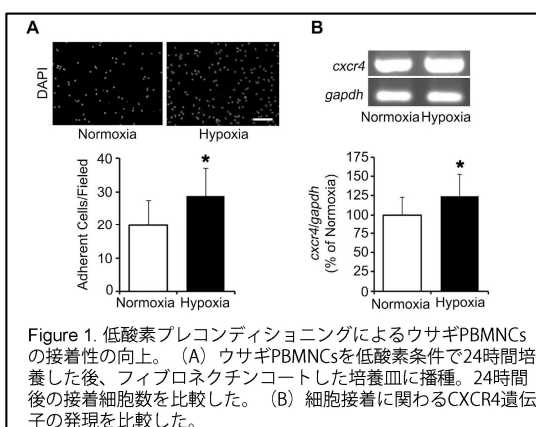


Figure 1. 低酸素プレコンディショニングによるウサギPBMNCs の接着性の向上。(A) ウサギPBMNCsを低酸素条件下で24時間培養した後、フィブロネクチンコートした培養皿に播種。24時間後の接着細胞数を比較した。(B) 細胞接着に関わるCXCR4遺伝子の発現を比較した。

ウス)以上の動物においても低酸素プレコンディショニングの細胞接着能亢進効果があることを示している。

(2) 低酸素プレコンディショニングによりウサギ PBMNCs の酸化ストレス抵抗性が亢進する

続いて、低酸素プレコンディショニングがウサギ PBMNCs の酸化ストレス抵抗性に影響を与えるか否かについて検証した。

低酸素培養したウサギ PBMNCs に過酸化水素を添加し、24 時間後に活性酸素産生および死細胞数を評価した。その結果、低酸素プレコンディショニングによりウサギ PBMNCs の活性酸素産生は抑制され、結果的に酸化ストレス環境下での細胞生存率が増加していた (Figure 2)。虚血環境下では強い酸化スト

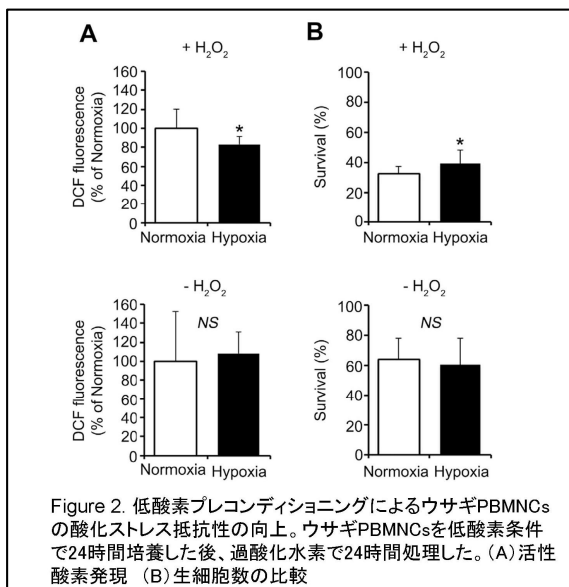


Figure 2. 低酸素プレコンディショニングによるウサギPBMNCsの酸化ストレス抵抗性の向上。ウサギPBMNCsを低酸素条件下で24時間培養した後、過酸化水素で24時間処理した。(A) 活性酸素発現 (B) 生細胞数の比較

レスが生じることから、低酸素プレコンディショニングによりウサギ PBMNCs の虚血下肢における生存性の向上が期待される。

(3) 機能賦活化した PBMNCs の自家移植により虚血下肢の血流が回復する

低酸素プレコンディショニングを施した自己 PBMNCs をウサギ虚血下肢へ移植し、血流改善効果が得られるか否かを検証した。移植に用いた細胞は、採取直後の PBMNCs (Fresh 群) 通常条件で 24 時間培養した

PBMNCs (Normoxia 群)、低酸素プレコンディショニングを施した PBMNCs (Hypoxia 群) であり、これにリン酸緩衝液投与群 (PBS 群) を加えた 4 群で血流改善効果を検証した。血流測定には、レーザー Doppler 血流系を用いた。

その結果、細胞移植 21 日後 (虚血処理 28 日後) の血流改善は、Fresh 群、Normoxia 群、Hypoxia 群のいずれにおいても認められたが、Hypoxia 群が最も高い血流改善効果を示した (Figure 3)。この結果は、低酸素プレコンディショニングにより機能賦活化した PBMNCs が下肢虚血治療に有用であることを示唆している。

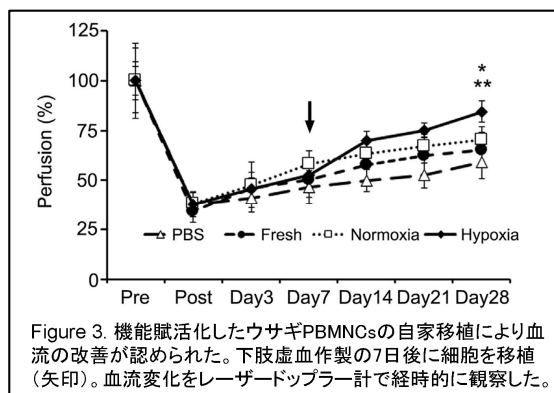


Figure 3. 機能賦活化したウサギPBMNCsの自家移植により血流の改善が認められた。下肢虚血作製の7日後に細胞を移植 (矢印)。血流変化をレーザー Doppler 計で経時的に観察した。

(4) 機能賦活化した PBMNCs の自家移植により虚血下肢での血管新生が促進する

最後に、PBMNCs を移植した虚血下肢における血管新生を検証した。細胞移植 21 日後 (下肢虚血 28 日) にウサギ下肢を採取し、大腿部 (細胞移植部位) の血管密度を評価したところ、Hypoxia 群においてのみ血管密度の

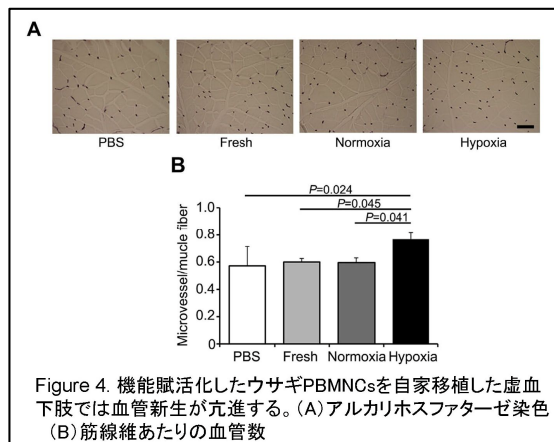


Figure 4. 機能賦活化したウサギPBMNCsを自家移植した虚血下肢では血管新生が亢進する。(A) アルカリホスファターゼ染色 (B) 筋線維あたりの血管数

意な増加が認められた (Figure 4)。このことは、先のレーザードップラー血流計による血流回復効果の結果と一致するものであり、細胞移植により血管新生が促進されその結果血流が改善したと推察される。

(5) 結論

本研究では、我々がこれまでに推し進めてきた「低酸素プレコンディショニングによるPBMCsの機能賦活化誘導とその臨床応用」に関する非臨床的検証を行った。得られた成果は、いずれも本法の今後の臨床応用に期待を抱かせるものである。実際、本研究期間には、本研究成果を加えた資料を「ヒト幹細胞の臨床応用に関する委員会」へ提出し、臨床試験実施が承認された。故に、本研究の主題の一つである「臨床応用を目指した～」は達成されたと自負している。今後は臨床研究を進めていき、「低酸素プレコンディショニングにより機能賦活化した PBMCs を用いた重症末梢血管障害治療」が標準治療法として広く認知されるように努力を続けていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Kudo T, Kubo M, Katsura S, Nishimoto A, Ueno K, Samura M, Fujii Y, Hosoyama T, Hamano K. Hypoxically preconditioned human peripheral blood mononuclear cells improve blood flow in hindlimb ischemia xenograft model. **Am J Transl Res**. 2014. 6(5): 570-579. 査読あり
2. 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(3): 370-375. 査読あり

〔学会発表〕(計1件)

1. 工藤智明、細山 徹、佐村 誠、桂 春作、李 桃生、濱野公一 血管新生療法に対する自己末梢血単核球を用いた低酸素プレコンディショニングの有用性 第44回日本心臓血管外科学会学術総会 2014年2月19日 2月21日 ホテル日航熊本 熊本県熊本市

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

該当なし

取得状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

桂 春作 (KATSURA, Shunsaku)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 40457304

(2)研究分担者

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

細山 徹 (HOSOYAMA, Tohru)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20638803

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