

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 1 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870785

研究課題名(和文) CD11b陽性細胞集団による重症虚血肢の血流改善効果の検討

研究課題名(英文) The effect of therapeutic angiogenesis using by CD11b+ cells transplantation in a murine model of hind limb ischemia

研究代表者

西中村 瞳 (Nishinakamura, Hitomi)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：90597692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウス虚血肢モデルにおいて、培養した骨髄細胞を移植する場合、採取直後の骨髄細胞より少ない細胞数で血流改善効果を促すことが可能であることを示す。GM-CSF存在下で培養した骨髄細胞のF4/80陽性細胞の移植治療では血管新生及びリンパ管新生、血流改善効果がコントロールに比べて有意に増加していた。さらにFoxp3陽性細胞と組織中IL-10の濃度がコントロールに比べて有意に増加しており、M-CSF存在下で培養した骨髄細胞のF4/80陽性細胞の移植治療の場合と同様の結果であった。これらの細胞を用いた細胞治療は重症下肢虚血の選択的な治療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The use of cultured BMCs can reduce the total number of injections required and were shown to induce therapeutic angiogenesis in a murine model of hind limb ischemia. Angiogenesis, lymphangiogenesis, and blood flow recovery ratio were significantly higher in the GM-CSF-cultured F4/80+ macrophage (GM-Macrophage)-treated group compared with controls. Furthermore, Foxp3+ cell numbers and tissue IL-10 concentrations were significantly increased compared with controls. There was no significant difference in blood flow recovery between GM-Macrophage and M-CSF-cultured F4/80+ macrophages (M-Macrophage). Thus, GM-Macrophage were associated with improved blood flow in hind limb ischemia similar to M-Macrophage. The selective methods of culturing and treating GM-Macrophage cells similar to M-Macrophage cells could be used clinically as a novel cell therapy for critical limb ischemia.

研究分野：細胞治療

キーワード：虚血肢 マクロファージ 血管再生

1. 研究開始当初の背景

閉塞性動脈硬化症の患者数は500万人を超え、その10~20%の患者が増悪して約2%の患者は下肢切断を必要とする重症虚血肢へと進行する。薬物療法、経皮的血管形成術、バイパス術などの既存の治療法では効果が不十分な症例が多く、毎年1万人を超える患者が四肢の切断を余儀なくされている。従来このような重症例は治療不可能であった。1997年、末梢血中のCD34陽性細胞が血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell; EPC) であることが報告されて以降、自己EPCを虚血部位に移植するという臨床試験が行われた。しかしながら虚血の改善効果はEPC投与数に依存し、より多くのEPCを確保、投与することが一定の治療効果を得るためには必要であり、強制的に骨髄のEPCを動員して回収する。患者が高齢であったり、高血圧、糖尿病などの冠動脈疾患危険因子とされている基礎疾患があったりする場合、末梢血循環EPCの数が減少し、その細胞機能の低下が認められる。この場合には患者の自己末梢血、または骨髄液から得たEPCを移植しても十分な治療効果は期待できない。その後、2000年には自家骨髄細胞移植が行われ始め、有効性、安全性が確認された。全身麻酔下にて少なくとも 1×10^9 個の骨髄単核球を得るため、約500~1000 mLの骨髄液採取を行い、分離、濃縮の作業後に虚血四肢骨格筋50箇所へ投与されるが、EPCの投与と同じ問題を抱え、無効例が20~30%の割合で存在する。これらの細胞移植治療の問題点は大きく2点である。

- 投与細胞群による血管新生・リンパ管新生へ作用機序が解明されていない
- 様々な基礎疾患を有した患者から大量の骨髄採取が必要である

以上の問題点を解決できる細胞移植治療は、閉塞性動脈硬化症の重症虚血肢の治療に効果的で、世間に幅広く定着する治療となり得る。我々は選択的で有効的な新しい細胞治療を確立するべく、マウス下肢虚血モデル (左側下肢の大腿動脈/静脈を結紮切離する) を用いて研究を進めてきた。

2. 研究の目的

骨髄細胞を培養、増殖させた細胞群投与によるマウス下肢虚血モデルの血管及びリンパ管構築の解析を行い、選択的で有効的な新治療を提唱する。

3. 研究の方法

(1) 骨髄分画細胞移入治療 (*J Vasc Surg.* 2013; 57:1090-9) の際に、指標として用いたマーカーであるCD11b陽性細胞集団に多く含まれるマクロファージ (Mφ) を *in vitro* で培養・増殖させた。

in vitro で再現性よくMφを分化、誘導するた

めに2通りの方法を選択した。野生型(WT)マウスの少量の骨髄細胞をマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)存在下で7日間培養、増殖させる方法、または、顆粒球単球コロニー刺激因子(GM-CSF)存在下で7日間培養、増殖させる方法である。得た細胞集団の性質をReal-time PCR及びFACSによって解析した。

- (2) これらのMφをマウス虚血肢へ移植してレーザードップラーによる血流の画像化を行い、健側下肢血流に対する患側下肢血流の比を経時的に解析した。
- (3) F4/80陽性を示すM-Mφ、GM-Mφを分取して下肢の虚血部位に移植し、レーザードップラーによる血流の画像化を行い、健側下肢血流に対する患側下肢血流の比を経時的に解析した。
- (4) (3)の結果より、血流改善効果が最も認められた組織中の血管・リンパ管新生を組織学的に解析し、下肢組織中で増加する因子について解析した。
- (5) (4)と同時に組織中の発現タンパクの解析を免疫染色及びELISAによって行った。

4. 研究成果

- (1) 2通りの方法で得た細胞集団のサイトカインの発現レベルを調べた結果、両者は対照的な性質を有しており、抗炎症性サイトカインであるIL-10の発現はM-CSF存在下で培養した場合の方が有意に高かった(図1)。またFACSの結果より、どちらの方法で培養した場合でもCD11b陽性かつF4/80陽性の細胞集団が得られることが分かった(図2)。

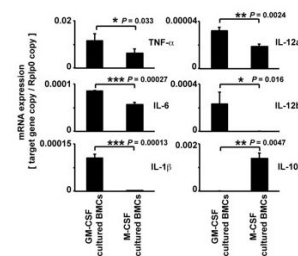


図1: *in vitro*で培養した骨髄由来の細胞集団(Mφを含む)炎症性サイトカイン、抗炎症性サイトカインの発現を調べた

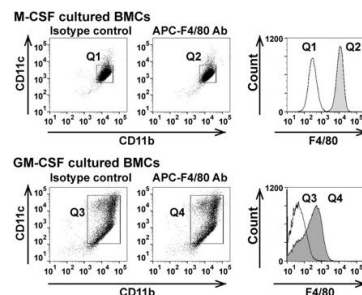


図2: *in vitro*で培養した骨髄由来の細胞集団(Mφを含む)

- (2) さらにこれらの細胞集団はコントロールに比べて有意な虚血肢血流改善効果をもつことが分かった(図3)。

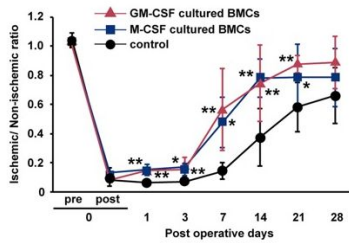


図3: *in vitro* で培養した細胞移植による血流改善効果
健側下肢血流に対する患側下肢血流の比を経時的に示す

- (3) F4/80 陽性を示す M-M ϕ 、GM-M ϕ を下肢の虚血部位に移植した場合、CD11b 陽性細胞よりもさらに数が少ない 1×10^5 個の細胞を移植することでコントロールに比べて血流改善効果が認められた(図4)。

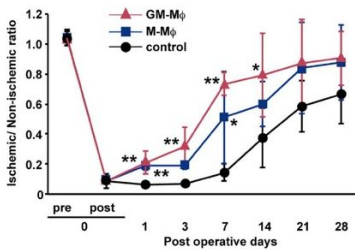


図4: M-M ϕ 、GM-M ϕ 治療による血流改善効果
健側下肢血流に対する患側下肢血流の比を経時的に示す

- (4) 有意な差が認められた M ϕ 移植後 7 日目の組織を用いて血管内皮細胞およびリンパ管内皮細胞の染色を行った。その結果、コントロールに比べて陽性細胞が有意に増加しており、血管新生・リンパ管新生が認められた(図5)。

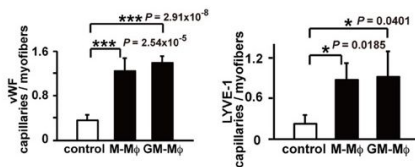


図5: 血管新生およびリンパ管新生
M ϕ 移植後7日目、血管内皮細胞のマーカーである von Willebrand factor (vWF) の染色およびリンパ管内皮細胞のマーカーである LYVE-1 の染色を行い、陽性細胞数をカウントして定量化した

- (5) また、虚血部位へ M-M ϕ または GM-M ϕ の移植を行った下肢組織中では抗炎症性サイトカインである IL-10 の発現がコントロールに比べて有意に増加していた(図6)。

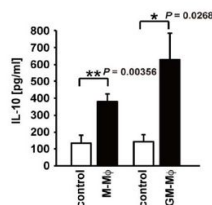


図6: マウス下肢のIL-10濃度
M ϕ 移植後7日目に健側および患側下肢組織中のIL-10を測定した

さらに、組織学的な解析結果より GM-M ϕ 投与の場合には Foxp3 陽性細胞がコントロールに比べて有意に増加していることも分かった。

M-M ϕ 、GM-M ϕ 移植による虚血肢血流改善効果において IL-10 が重要な働きを担うことが示唆され、その作用機序には違いがあることが予想される。現在さらなる解析を進めている。また、IL-10 の重要性については遺伝子欠損マウスを用いて検討中である。

M ϕ はおかれた環境によって機能や形態を変え、組織の恒常性維持や免疫反応などに寄与する。その性質は環境の変化に応じて可逆的で変化しうるから、極性を有するとも言われる。様々な性質の M ϕ 移植による血管再生治療のメカニズムを明らかにし、基礎疾患を有する虚血肢マウスを用いた治療効果も検討したいと考えている。

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 6 件)

Itoh T, Nishinakamura H, Kumano K, Takahashi H, Kodama S. The Spleen Is an Ideal Site for Inducing Transplanted Islet Graft Expansion in Mice. *PLoS One*. 2017 Jan 30;12 (1) : e0170899. 査読あり

Kumano K, Nishinakamura H, Mera T, Itoh T, Takahashi H, Fujiwara T, Kodama S. Pretreatment of donor islets with papain improves allograft survival without systemic immunosuppression in mice. *Islets*. 2016 Sep 2;8(5):145-55. 査読あり

Itoh T, Hata Y, Nishinakamura H, Kumano K, Takahashi H, Kodama S. Islet-derived damage-associated molecular pattern molecule contributes to immune responses following microencapsulated neonatal porcine islet xenotransplantation in mice. *Xenotransplantation*. 2016 Sep;23(5):393-404. 査読あり

Itoh T, Nitta T, Nishinakamura H, Kojima D, Mera T, Ono J, Kodama S, Yasunami Y. HMGB1-Mediated Early Loss of Transplanted Islets Is Prevented by Anti-IL-6R Antibody in Mice. *Pancreas*. 2015 Jan;44(1):166-71. 査読あり

Naito R, Nishinakamura H, Watanabe T, Nakayama J, Kodama S. Edaravone, a free radical scavenger, accelerates wound healing in diabetic mice. *Wounds*. 2014 Jun;26(6):163-71. 査読あり

Nishinakamura H, Kuwahara G, Kojima D, Tashiro T, Kodama S. GM-CSF treated F4/80⁺ BMCs improve murine hind limb ischemia similar to M-CSF differentiated macrophages. *PLoS One*. 2014 Sep 9; 9 (9) : e106987. 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

西中村瞳、秦優子、高橋宏幸、伊東威、小玉正太 - 極性を有するマクロファージ投与によるマウス虚血肢血流改善効果における IL-10 の作用機序の解析 - 第 16 回日本再生医療学会 (2017/03/07-09, 仙台)

西中村瞳、秦優子、熊野健二郎、高橋宏幸、伊東威、小玉正太 - 虚血肢マウスを用いた細胞治療における IL-10 の作用機序の解析 - 第 15 回日本再生医療学会 (2016/03/16-19, 大阪)

西中村瞳、桑原豪、小島大望、田代忠、伊東威、小玉正太 - M-CSF あるいは GM-CSF 培養 F4/80 陽性細胞投与によるマウス虚血肢モデルを用いた血流改善効果の比較検討 - 第 14 回日本再生医療学会 (2015/03/19-21, 横浜)

Nishinakamura H., Kuwahara G., Kojima D., Tashiro T., Kodama S. - M1 macrophages induce therapeutic improvements in a murine model of hind limb ischemia similar to M2 macrophages. - TERMIS EU Meeting 2014 (2014/06/10-13, Genova, Italian Republic)

西中村瞳、桑原豪、小島大望、田代忠、小玉正太 - M-CSF・GM-CSF 培養 CD11b 陽性細胞投与によるマウス虚血肢モデルを用いた血流改善効果の検討 - 第 13 回日本再生医療学会 (2014/03/04-06, 京都)

[図書] (計 2 件)

西中村瞳、伊東威、吉松軍平、小玉正太 - 脾臓が誘導する移植脾島再生機構 - 細胞 49 (4) 40-43, 2017

西中村瞳、伊東威、小玉正太 - 脾島の再生と移植 - 移植 52 (1) 07-12, 2017

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西中村瞳 (NISHINAKAMURA, Hitomi)
福岡大学・医学部・助教
研究者番号: 90597692