

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890036

研究課題名（和文） 虚血改善能の高いヒト虚血性疾患患者由来血管内皮前駆細胞の
単離と機能解析研究課題名（英文） Identification of functional endothelial progenitor cells suitable for the
treatment ischemic tissue derived from human ischemic disease patients

研究代表者 長野 真澄 (NAGANO MASUMI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・研究員

研究者番号：30436282

研究成果の概要：狭心症・心筋梗塞・閉塞性動脈硬化症などの虚血性疾患の患者本人の末梢血から虚血改善能・治療効果の高い血管内皮前駆細胞（EPC）を採取・増幅し、治療に用いることを目的として下記研究を行った。

糖尿病を合併した閉塞性動脈硬化症の患者末梢血由来 EPC をアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ALDH）活性により分離し、Alde-High EPC と Alde-Low EPC を単離した。これら EPC について、マウス有茎皮弁モデルを用いて虚血改善能を検討した。臍帯血由来 EPC と同様に、患者末梢血由来 Alde-Low EPC 投与群は Alde-High EPC 投与群と比較して、皮弁の壊死面積が減少する結果を得た。このことより、糖尿病を合併した患者由来末梢血 EPC においても、ALDH 活性により虚血改善能の高い EPC を分離することが可能であることが示された。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,330,000 | 0 | 1,330,000 |
| 2008 年度 | 1,350,000 | 405,000 | 1,755,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,680,000 | 405,000 | 3,085,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：血管内皮前駆細胞，虚血性疾患，閉塞性動脈硬化症，自家移植，アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性，マウス有茎皮弁モデル，糖尿病

1. 研究開始当初の背景

狭心症・心筋梗塞・閉塞性動脈硬化症など

の虚血性疾患に対して、骨髄・末梢血 EPC を用いた治療の臨床応用が国内外で行われ始

めている。現在治療に用いている EPC 採取方法は、CD34 陽性細胞を分離し使用する方法と、細胞を分画せずに全体を使用する方法の 2 通りであるが、まだ画期的な効果が挙がっているとは言い難い。EPC には階層性があり、未分化で増殖能の高い EPC と、増殖能の低い EPC が混在していることが報告された。しかし、増殖性の高い EPC を分離するのに有効なマーカーについては、報告がなされていなかった

研究代表者らは、ヒト臍帯血由来 EPC において、ALDH 活性を指標として Alde-High EPC と Alde-Low EPC を単離し、Alde-Low EPC が増殖能と虚血改善能に優れることを明らかにした。しかしながら、ヒト臍帯血由来 EPC は、患者への細胞治療の際には他家移植となってしまうため、自家移植できる EPC での検討が必要不可欠であった

2. 研究の目的

狭心症・心筋梗塞・閉塞性動脈硬化症などの虚血性疾患の患者本人の末梢血より治療効果の高い血管内皮前駆細胞(以下 EPC)を抽出・増幅し、その治療効果を検討するものである。さらに分子生物学的なアプローチにより、EPC の治療効果を左右する因子を解明し、さらなる治療法を探索する。

3. 研究の方法

糖尿病を合併した虚血性疾患患者より EPC を単離し、ALDH 活性を指標として Alde-High EPC と Alde-Low EPC を単離し、虚血改善能をマウス有茎皮弁モデルを用いて検討した。

4. 研究成果

糖尿病を合併した閉塞性動脈硬化症の患者 8 例よりインフォームド・コンセントを得て末梢血を採取した。そのうち 3 例で末梢血より EPC の培養に成功した。臍帯血由来 EPC

と同様に、患者末梢血由来 Alde-Low EPC 投与群は Alde-High EPC 投与群と比較して、皮弁の壊死面積が減少する結果を得た。このことより、患者末梢血由来 EPC においても ALDH 活性により虚血改善能の高い EPC を分離することが可能であることが示された。糖尿病を合併する虚血性疾患は難治性であるが、この Alde-Low EPC を用いることにより、治療効果の改善が見込まれる。

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 5 件)

① Yamashita T, Ohneda K, Nagano M, Miyoshi C, Kaneko N, Miwa Y, Yamamoto M, Ohneda O, Fujii-Kuriyama Y.

Hypoxia-inducible transcription factor-2alpha in endothelial cells regulates tumor neovascularization through activation of ephrin A1.

Journal of Biological Chemistry **283**(27): 18926-36 (2008) 査読有

② Hoshino T, Shimizu R, Ohmori S, Nagano M, Pan X, Ohneda O, Khandekar M, Yamamoto M, Lim KC, Engel JD.

Reduced BMP4 abundance in Gata2 hypomorphic mutant mice result in uropathies resembling human CAKUT.

Genes Cells **13**, 159-70 (2008) 査読有

③ Yamashita T, Ohneda O, Nagano M, Iemitsu M, Makino Y, Tanaka H, Miyauchi T, Goto K, Ohneda K, Fujii-Kuriyama Y, Poellinger L, Yamamoto M.

Abnormal heart development and lung

remodeling in mice lacking the hypoxia-inducible factor-related basic helix-loop-helix PAS protein NEPAS.

Molecular and Cellular Biology **28** 1285-97 (2008). 査読有

④ Ohneda O, Nagano M, Fujii-Kuriyama Y. Role of hypoxia-inducible factor-2alpha in endothelial development and hematopoiesis.

Methods Enzymology **435**, 199-218 (2007) 査読無

⑤ Nagano M, Yamashita T, Hamada H, Ohneda K, Kimura K, Nakagawa T, Shibuya M, Yoshikawa H, Ohneda O.

Identification of functional endothelial progenitor cells suitable for the treatment of ischemic tissue using human umbilical cord blood.

Blood **110**, 151-60 (2007) 査読有

[学会発表] (計 7 件)

① Masumi Nagano, Osamu Ohneda.

CXCR4 Plays a Crucial Role for Repairing Ischemic Tissue through Regulation by HIF-2a. 第73回日本循環器学会総会・学術集会, ポスター, 大阪国際会議場, 2009.3.21

② Masumi Nagano, Ken-ichi Kimura, Toshiharu Yamashita, Hiromi Hamada, Kinuko Ohneda, Hiroyuki Yoshikawa, and Osamu Ohneda

A Chemokine Receptor CXCR4 Plays a Crucial Role for Repairing Ischemic Tissue through Regulation of HIF-2a.

50th American Society of Hematology Annual Meeting, poster, Moscone Center (San

Francisco), 2008.12.8

③ 長野真澄, 山下年晴, 濱田洋美, 大根田絹子, 木村健一, 中川智貴, 吉川裕之, 大根田修.

虚血改善効果の高いヒト血管内皮前駆細胞における低酸素応答転写因子の機能解析.

第70回日本血液学会, 口演, 京都国際会議場, 2008.10.11

④ 長野真澄, 山下年晴, 濱田洋美, 大根田絹子, 木村健一, 吉川裕之, 大根田修.

虚血改善効果の高いヒト血管内皮前駆細胞の単離および機能解析.

第4回麒麟塾, 口演, コクヨホール(東京), 2008.7.19

⑤ 長野真澄, 木村健一, 山下年晴, 濱田洋美, 大根田絹子, 吉川祐之, 大根田修.

虚血改善効果の高いヒト血管内皮前駆細胞の単離および機能解析.

第5回がんとハイポキシア研究会, ポスター, 国立がんセンター東病院, 2007.12.1

⑥ 長野真澄.

虚血改善効果の高いヒト血管内皮前駆細胞の単離および機能解析.

第2回つくば医科学研究交流会, 口演, 三菱化学つくばクリエーションセンター, 2007.11.10

⑦ 長野真澄, 山下年晴, 濱田洋美, 大根田絹子, 木村健一, 中川智貴, 渋谷正史, 吉川祐之, 大根田修.

虚血改善効果の高いヒト血管内皮前駆細胞の単離および機能解析.

第69回日本血液学会, 口演, パシフィコ横浜, 2007.10.12

〔産業財産権〕

○取得状況（計 1 件）

名称：虚血性疾患治療剤の製造方法、

発明者：長野真澄，大根田修

権利者：筑波大学

番号：特願 2007-137091

取得年月日：2007. 5. 30

国内・国外の別：国内

〔その他〕

第 2 回つくば医科学研究交流会において、つくば医科学奨励賞を受賞した。

「虚血改善効果の高いヒト血管内皮前駆細胞の単離および機能解析」2007 年 11 月 10 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長野 真澄 (NAGANO MASUMI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・研究員

研究者番号：30436282

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし