

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題
(英語) Projects for Technological Development, Research Center Network for
Realization of Regenerative Medicine

研究開発課題名 : (日本語) 再生医療における血管形成制御技術の開発
(英語) Development and regulation of therapeutic angiogenesis

研究開発担当者 (日本語) 大阪大学 微生物病研究所 教授 高倉 伸幸
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Signal Transduction, Research Institute for Microbial
Diseases, Osaka University. Professor. Nobuyuki Takakura

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学 微生物病研究所 助教 内藤 尚道
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Signal Transduction, Research Institute for Microbial
Diseases, Osaka University. Assistant Professor. Hisamichi Naito

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学 微生物病研究所 助教 木戸屋 浩康
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Signal Transduction, Research Institute for Microbial
Diseases, Osaka University. Assistant Professor. Hiroyasu Kidoya

II. 成果の概要（総括研究報告）

虚血疾患に対する血管再生の治療において、移植された血管細胞源により再生される血管は、長期に維持される必要があり、その為には、幹細胞システムを併せ持つ血管を再生する必要がある。また遺伝子欠損症などの蛋白欠損による遺伝病を、血管内皮細胞移植で治療する際にも、長期に血管として維持される血管の再生が必須となる。我々は、血管内皮細胞の中に、クローナルに血管内皮細胞を産生し、幹細胞としての未分化性を併せ持つ血管内皮幹細胞を既存血管の中に見いだしてきた。この血管内皮幹細胞を、利用して血管を再生する為に、以下のように4つの研究項目を掲げて、研究を行ってきた。本年度の研究成果を以下に示す。

研究項目1では、まず、血管内皮幹細胞のヒト組織からの単離技術の開発（マウスからヒトへ）では、ヒトの組織を用いCD45陰性、CD31あるいはCD34陽性の血管内皮細胞をフローサイトメトリー法で描出できる酵素処理/組織調整法を見いだすことを目標に検討を行った。医薬基盤・健康・栄養研究所から購入したヒト脂肪組織などを用いて検討した。組織によって酵素反応の時間は異なっていたが、解析した臓器のすべてにおいて、CD45陰性CD31陽性の分画をきれいに観察できる酵素処理法を見いだせた。この方法で解析し、ヒト肝臓においてはSpEC2が内皮幹細胞のマーカーに有用であることが判明した。研究項目2では、内皮幹細胞を用いた成熟血管形成による虚血の改善の解析を行い、マウス下肢虚血モデルを用い、マウスの下肢筋肉内（0.3cm³程度の体積）に3000個の内皮幹細胞移植を行えば血流が改善することが判明した。また、血管内皮幹細胞は、骨髄のEPC移植に比べ、より長期に血管内皮細胞として血管に貢献することを証明した。さらに、血管再生治療を実際に行っている臨床医1名との連携を開始した。研究項目3では、臓器特異的血管形成の誘導技術開発（肝臓を中心にして）を行い、従来肝臓に血管内皮幹細胞を移植して正着させる前処置として、モノクローリン投与と、放射線照射の両方を行ってきたが、前処置を放射線照射単独にしても生着しうるかを検討した。その結果、モノクローリン処置なしでは効率は低下するが定着することが確認された。また、どの程度の細胞数を移植すれば、疾患モデルの改善につながるのかを解析し、マウス1匹当たり3000個の内皮幹細胞移植で正常マウス（100%）と比べ、5%程度（疾患発症に至らない割合）まである分子が発現できることが判明した。研究項目4では、血管内皮幹細胞の試験管内増幅技術の開発を行い、脂肪組織由来の血管内皮幹細胞分画を7日～10日の培養にて、2倍近く増幅させることが可能になった。研究項目5ではHUVECからの血管内皮幹細胞の誘導技術の開発を行い、HUVECに対してSpEC2の発現強度を亢進させる培養法の開発を行った。

In the therapy of blood vessel regeneration, newly developed blood vessels should be maintained for long term. For this purpose, stem cell system in vasculature is required. In addition, when transplantation of endothelial cells (ECs) is utilized for rescue of inherited genetic disorder, long term survival of ECs is required. We have identified endothelial stem cells in the pre-existing blood vessels which show clonal expansion of ECs and self-renewal activity. By utilizing this cell

population for realizing best therapeutic angiogenesis, we have investigated based on the following four plans of experiments.

In research plan 1 (Identification of cell surface markers of endothelial stem cells), in this year, we have tried to find the best method to treat tissue/organ for making single cell suspension by the exposure of several enzyme such as dispase and collagenase for detecting a CD45 negative and CD31 positive EC fraction. Using human fat tissue, we found the best condition to treat tissues. In this condition, we found that SpeEC2, one of EC stem cell marker in mice, can be available to identify human EC stem cell population. In terms of research plan 2 (Mature blood vessel regeneration by using EC stem cells for ischemia diseases), we conducted EC stem cell injection in mouse hind limb ischemia model and found that injection of 3,000 EC stem cells is enough for improvement of ischemia in this model. In addition, we showed that EC stem cell population contributed to newly developed blood vessel for longer term than bone marrow endothelial progenitor cell population. Moreover, we started the collaboration with researcher who is conducting vascular regeneration in clinic. In case of research plan 3 (Regeneration of organ (liver) specific blood vessels by EC stem cells), we, thus far, utilized monoclotaline treatment and radiation as a preconditioning for the transplantation of EC stem cells into liver, because EC stem cells can not colonize without any treatment. However, in this year, we have tried to transplant EC stem cells with only pretreatment of irradiation and found that irradiation alone also allow colonization of EC stem cells in the liver with fewer efficiency compared with both treatment. In a certain inherited disease model mice, we valuated how many number of EC stem cells is required to cure the disease in which the cause of this disease is a lack of molecules secreted from ECs in the liver and found that 3,000 EC stem cells is enough to prevent pathogenesis. In research plan 4 (Development of the culture system for EC stem cell expansion), approximately two fold expansion of EC stem cells can be achieved for 7-10 days by using several matrices in the culture. In research plan 5 (Induction of endothelial stem cell population from human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), we obtained one method to induce endothelial stem cell marker gene, SpEC2, in HUVECs by new culture system.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 5 件）

1. Muramatsu F, Kidoya H, Naito H, Hayashi Y, Iba T, Takakura N. Plakoglobin maintains the integrity of vascular endothelial cell junctions and regulates VEGF-induced phosphorylation of VE-cadherin. *J Biochem*. In press
2. Kanzaki R, Naito H, Kise K, Takara K, Eino D, Minami M, Shintani Y, Funaki S, Kawamura T, Kimura T, Okumura M, Takakura N. PSF1 (Partner of SLD Five 1) is a Prognostic Biomarker in Patients with Non-small Cell Lung Cancer Treated with Surgery Following Preoperative Chemotherapy or Chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol*. 23: 4093-4100, 2016

3. Yamane K, Naito H, Wakabayashi T, Yoshida H, Muramatsu F, Iba T, Kidoya H, Takakura N. Regulation of SLD5 gene expression by miR-370 during acute growth of cancer cells. *Sci Rep*. 6 :30941, 2016
4. Kise K, Kinugasa-Katayama Y, Takakura N. Tumor microenvironment for cancer stem cells. *Adv Drug Deliv Rev* 99: 197-205, 2016
5. Naito H, Wakabayashi T, Kidoya H, Muramatsu F, Takara K, Eino D, Yaman Ke, Iba T, Takakura N. Endothelial side population cells contribute to tumor angiogenesis and antiangiogenic drug resistance. *Cancer Res*, 76:3200-3210, 2016

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 血管内皮幹細胞による血管の再生と維持、口頭、高倉伸幸、千葉大学医学部、2016年9月15日、国内
2. 血管内皮幹細胞による高次血管構築の制御、口頭、高倉伸幸、京都（みやこめっせ）、2016年6月17日、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. WinterSchool@微研（血管研究、免疫学研究、感染学研究についての高校生向けセミナーを開催）、高倉伸幸、大阪大学微生物病研究所、2016年12月27日、国内

(4) 特許出願

該当なし