

**Combinatorial Treatment with Apelin-13 Enhances the
Therapeutic Efficacy of a Preconditioned Cell-Based Therapy
for Peripheral Ischemia**

(血管成熟化因子アペリン-13 と機能賦活化細胞移植の併用
による新たな血管新生療法の開発)

氏名 佐村 誠

所属 山口大学大学院医学系研究科
応用医工学系専攻 器官制御医科学領域
器官病態外科学 (外科学第一)

平成 28 年 1 月

目次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	4
3. 目的	6
4. 方法	7
5. 結果	12
6. 考察	29
7. 結語	31
8. 謝辞	32
9. 参考文献	33

1. 要旨

末梢血単核球細胞（PBMNC）に対する低酸素プレコンディショニングは、細胞機能を賦活化させ、細胞移植後の血管新生治療効果を増強させる。しかしながら、この治療法で得られた新生血管は未熟で非機能的であるため、重症虚血を改善するのに十分な治療法であるとは言い難い。本研究では、血管成熟化因子“アペリン-13”が細胞移植により誘導された新生血管の成熟化を誘導し得るか否か、また、本併用療法が重症下肢虚血に対する有効な治療法となり得るかを検証した。マウス下肢虚血モデルを用いた実験で、低酸素プレコンディショニングにより細胞機能を賦活化した PBMNC (H-PBMNC) の移植とアペリン-13 投与との併用治療群において、血管新生効果と新生血管の成熟化が誘導され、それぞれの単独治療以上の効果が得られた。その作用機序として、アペリン-13 は、H-PBMNC からの PDGF-BB と TGF- β 1 の分泌を促進させ、さらに、血管平滑筋細胞（VSMC）における PDGFR- β の発現亢進および PDGF-BB 存在下での VSMC の増殖・遊走を促進させることを見出した。また興味深いことに、低酸素プレコンディショニングにより PBMNC におけるアペリン受容体“APJ”の発現が亢進した。同様の結果は、マウス胸部大動脈を用いた *in vitro* リングアッセイにおいても確認され、H-PBMNC とアペリン-13 が大動脈から発芽した新生血管周囲への壁細胞動員を相乗的に誘導し血管成熟を促進することを認めた。すなわちアペリン-13 は、移植 PBMNC と内在性 VSMC の両細胞に作用し新生血管成熟を促すのである。これらの結果から、“低酸素プレコンディショニングにより細胞機能を賦活化した PBMNC の移植”と“アペリン-13”との併用療法は、重症下肢虚血に対する有効な治療戦略になると考える。

2. 研究の背景

細胞移植療法は、虚血組織に血管新生を誘導する極めて有望な治療法である。細胞移植による血管新生誘導の機序は、移植細胞の種類や移植方法により異なるが、なかでも末梢血単核球細胞（PBMNC）は、重篤な心血管疾患を有する患者からも安全かつ簡便に採取可能であることから、最も有用な細胞種の1つと考えられている [1]。PBMNC移植の血管新生効果は、PBMNCから分泌される細胞成長因子によるものと考えられているが、PBMNCに含まれる血管内皮前駆細胞（EPC）の関与も指摘されている [2-5]。しかしながら、他の細胞移植治療と同様に、重症下肢虚血に対するPBMNC移植の実臨床における治療効果は限定的であることから、治療法の更なる改善が望まれる [6-8]。細胞移植治療の共通した問題点として、虚血環境下における低い細胞生着率が挙げられており [9,10]、言い換えれば、虚血組織における移植細胞の生着率が向上すれば、細胞移植治療の効果の向上が期待出来る。この課題に対して我々は、移植細胞を低酸素に短時間曝露すること（低酸素プレコンディショニング）により、酸化ストレス耐性、細胞接着能、血管内皮細胞成長因子（VEGF）産生能、の向上が誘導され、結果として、PBMNC移植の血管新生効果および血流増加作用が増強されることを報告してきた [11-14]。

一方、虚血組織に対する細胞移植療法の臨床的効果を考える上で、細胞移植後の新生血管の形態学的・機能的成熟度に着目することも重要である。なぜならば、虚血組織へ酸素や代謝物を供給するために必要な十分な血流をもたらすには、新生血管は機能的でなければならないからである。しかしながら、細胞移植治療により虚血組織に形成された新生血管が未熟であるために、虚血状態を改善するには不十分である可能性が指摘されている [15]。事実、これまでに行われてきた数多くの“単独の”細胞移植療法では、臨床的な治療効果は十分であるとは言えない [16]。ところが近年、新生血管の成熟化を促す種々の成長因子を複数投与することで治療効果が向上した、とする報告が散見されるようになり [17,18]、さらに、細胞移植治療と遺伝子治療を併用することにより、虚血組織における新生血管の成熟化が誘導され治療効果が向上した、との報告もある [19]。これらの結果は、細胞移植治療と細胞成長因子投与との併用療法が重症虚血性疾患に対する有効な治療手段となり得ることを示唆している。

血管成熟化には、血管内皮細胞（EC）の発芽に引き続き、壁細胞による被覆、マトリックスの蓄積、血管壁の形成が必要である [20]。新生血管の成熟化において、アンギオポエチン-1（Ang-1）とアペリンは重要な役割を果たす。壁細胞から分泌される Ang-1

は、ECの遊走、接着および生存を制御している [21]。一方アペリンは、Gタンパク質共役受容体である APJ の内因性リガンドとして同定され、新生血管の血管径を調整することが知られている [22-24]。アペリンには 2 つのアイソフォーム（アペリン-36、アペリン-13）が存在し、いずれも EC の細胞膜上に存在する APJ に作用し、EC の増殖や遊走を促進させる [25]。このような血管成熟化における Ang-1 とアペリンの働きから、どちらも虚血組織における血管新生治療効果を向上させる可能性がある。実際、骨髄単核球細胞移植治療に Ang-1 の効果を上乗せした併用療法、また、VEGF 投与とアペリン-13 投与の併用療法でマウス下肢虚血モデルの新生血管成熟化を促進したとの報告もある [19,22]。すなわちこれらの報告は、虚血性疾患に対する細胞移植療法において新生血管の成熟化を標的とした治療戦略が有望な方策となり得ることを示している。

3. 目的

我々の最終目標は、“PBMNC を用いた従来の細胞移植治療にアペリン-13 投与を組み合わせた新たな重症虚血性疾患治療法の確立”である。そこで本研究では、低酸素プレコンディショニングによる移植細胞の機能増強・細胞移植治療・アペリン-13 投与による新生血管成熟化、の3要素を組み合わせた血管新生療法が重症下肢虚血に対する有効な治療方法となり得るかを検証した。

4. 方法

実験動物

C57BL/6 マウス (8-9 週齢・雄) を日本 SLC 社から購入した。本研究における全ての動物実験は、山口大学 Animal Care and Use Committee の承認を得ており、ヘルシンキ宣言に則って行われた。

PBMNCs の分離と低酸素プレコンディショニング

PBMNCs は、マウス末梢血から Lympholyte-Mammal (Cedarlane Laboratories 社) を用いた比重遠心法で分離し、10% FBS、1% penicillin-streptomycin を含む RPMI 1640 培地で 2×10^6 cells/ml の細胞数で培養した。これまでの報告 [12] と同様に、低酸素プレコンディショニングは 2%酸素 (hypoxia)・24 時間の培養で行い (H-PBMNC)、通常培養は 20%酸素 (normoxia)・24 時間の培養 (N-PBMNC) とした。

PBMNC 移植とアペリン-13 投与

マウス左大腿動脈中樞を結紮切離した後、伏在動脈まで分枝を含め切除し、下肢虚血モデルを作成した。下肢虚血モデル作成後、直ちに PBMNC 移植とアペリン-13 投与を行った (n=40)。hypoxia と normoxia の条件で培養した PBMNC (PBS に懸濁) を 1 ヶ所に付き 5×10^5 個もしくは PBS を 4 ヶ所に移植した。アペリン-13 ($0.1 \mu\text{mol/kg/day}$) (Bachem 社) もしくは PBS を腹腔内に連続 7 日間投与した [26,27]。

実験群を以下の 5 つに群分けした：(1) PBS の筋肉内、腹腔内投与 (Control 群, n = 8)、(2) アペリン-13 の腹腔内投与 (apelin 群, n = 8)、(3) normoxia 条件下で培養した PBMNC の移植とアペリン-13 の腹腔内投与 (N-PBMNC+apelin 群, n = 8)、(4) hypoxia 条件下で培養した PBMNC の移植 (H-PBMNC 群, n=8)、(5) hypoxia 条件下で培養した PBMNC の移植とアペリン-13 の腹腔内投与 (H-PBMNC+apelin 群, n=8)。

下肢血流測定

下肢虚血作成の直前・直後、下肢虚血作成後 3、7、14、21、28 日目に足底の血流量を laser speckle perfusion imaging system (OMEGA ZONE, Omega Wave 社) を用いて測定した。虚血肢 (左) と非虚血肢 (右) の血流量を同時に測定し、虚血肢の血流比を非虚血肢の値を基準として算出した。

血管反応性評価

虚血肢における血管拡張能を評価するため、アセチルコリン (Ach) (10 $\mu\text{mol/L}$) (Sigma Aldrich 社) を下肢虚血作成後 28 日目に静脈内投与した。Ach 投与後における血流増加率を虚血肢 (左) と非虚血肢 (右) とともに測定した。また、Ach 投与による血流増加が、一酸化窒素 (NO) 依存的血管拡張作用によるものであることを検証するため、NO 産生阻害薬である NG-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル塩酸塩 (L-NAME) (100 $\mu\text{mol/L}$) を、Ach 投与 15 分前に静脈内投与した [28]。

免疫組織染色

下肢虚血作成後 28 日目に各群 5 匹ずつマウスを犠牲死させ、虚血肢の大腿四頭筋と内転筋を採取した。採取した骨格筋を OCT 化合物 (Sakura Finetek Japan 社) で包埋し、液体窒素で急速凍結した。骨格筋の薄切凍結切片 (5 μm 厚) を作成し、風乾した後に 4% PFA を用いて室温で 20 分間固定した。1% Triton X-100 を含んだブロッキング試薬 (DAKO 社) を用いてブロッキングした後、内皮細胞を染色するため、DyLight488 標識抗 Lectin 抗体 (1:100, Vector Laboratories 社) と壁細胞を染色するため、Cy3 標識抗 α -SMA 抗体 (1:100, Sigma-Aldrich 社) を用いて、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晚反応させた。BZ-X700 蛍光顕微鏡 (Keyence 社) を用いて微小血管を評価した。各群異なる 4 切片からそれぞれ各 20 視野をランダムに選択し、血管数および血管径を BZ-II analyzer ソフトウェア (Keyence 社) を用いて算出した。

大腿動脈結紮モデル

下肢血管に虚血を誘導するため、マウス左大腿動脈中枢を結紮し、分枝を切離した。RT-PCR に備え、血流を遮断した大腿・伏在動脈を、虚血作成前、虚血作成後 3、7、14、28 日目にそれぞれ採取した (n=4)。さらに免疫組織染色用に、虚血作成後 3 日目の虚血大腿動脈と骨格筋を採取した (n=3)。虚血血管における APJ 発現細胞・血管内皮細胞・血管平滑筋細胞の局在を、次に示す抗体を用いた免疫蛍光染色により評価した。ウサギ抗 APJ ポリクローナル抗体 (1:200, Abcam 社)、マウス抗 vWF モノクローナル抗体 (1:50, DAKO 社)、マウス抗 α -SMA モノクローナル抗体 (1:50, Enzo Life Sciences 社)、FITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1:500, DAKO 社)、Alexa-Fluor 555 標識ヤギ抗ラビット IgG 抗体 (1:500, Life Technologies 社)。

ウェスタンブロット法

ウェスタンブロット法は、全細胞ライセートから抽出したタンパク質 (10-30 μ g) を用いて行った。1次抗体として、ウサギ抗 APJ ポリクローナル抗体 (1:1000, Abcam 社)、ウサギ抗 PDGFR- β モノクローナル抗体 (1:10,000, Abcam 社)、ウサギ抗 β -actin ポリクローナル抗体 (1:5,000, Novus Biologicals 社) を用いた。2次抗体として西洋ワサビペルオキシターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (1:5000, DAKO 社) を反応させ、Chemiluminescence western blot detection system (GE Healthcare 社) を用いた化学発光により特異的バンドを検出した。

免疫細胞染色

PBMNC における APJ 発現を評価するため、マウス PBMNC をフィブロネクチンコートした培養皿に播種し、10% FBS/RPMI 1640 培地中で normoxia と hypoxia の条件でそれぞれ培養した。培養後、4% PFA で固定し、1次抗体として抗 APJ 抗体 (1:200, Abcam 社)、2次抗体として Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:500, Life Technologies 社) をそれぞれ用いて染色した。

VSMC における APJ 発現を評価するため、VSMC (6-9 継代, 2.5×10^5 cells/well) (Applied StemCell Inc 社) を 12-well 培養皿に播種し、24 時間培養した (n=3)。培養後、4% PFA で固定し、1次抗体として Cy3 標識抗 α -SMA 抗体 (1:100, Sigma Aldrich 社) と APJ 抗体 (1:200, Abcam 社) を用いて染色した。さらにアペリン-13 存在下での VSMC における PDGFR- β の発現を評価するため、アペリン-13 (1 μ M) を添加、非添加でそれぞれ培養した VSMC (2.5×10^5 cells/well) (n=3) を、抗 PDGFR- β 抗体 (1:100, Abcam 社) を 1次抗体とし、Alexa Fluor 555 標識した 2次抗体を用いて染色した。染色された細胞は蛍光顕微鏡を使用し、1 ウェルあたりランダムに選択した 5 視野の細胞数を算出した。

定量的 RT-PCR

大腿動脈結紮モデルにより得られた虚血動脈から、RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen 社) を用いて、添付されているプロトコールに従い全 RNA を抽出し、PrimeScript[®] RT Master Mix (TaKaRa 社) を用いて逆転写反応を行った。逆転写反応により合成した cDNA を鋳型とし、QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen 社) を用い、Light Cycler (Roche Applied Science 社) による定量的 RT-PCR 解析を行った。PCR に用いたプライマーの配列は以下のとおりである。

APJ: 5'-CCACTGTGGGCCACTTATAACC-3', 5'-CAGCCTTAGCCGAGCATTG-3',

GAPDH: 5'- TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC-3', 5'-AAGATGGTGATGGGCTTCCCG-3'.

GAPDH の発現量に対する *APJ* の発現量比を $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法を用いて算出した。

酵素結合免疫吸着法 (ELISA)

血管成熟化に関連する細胞成長因子の産生量を評価するため、アペリン-13 を加えた PBMNC の培養上清を用いて、PDGF-BB、TGF- β 1、VEGF、HGF、bFGF の産生量を ELISA (R&D System 社) で測定した。アッセイは添付されているプロトコールに従って行った。N-PBMNC もしくは H-PBMNC (2×10^6 cells/ml) を 24-well plate に播種し、アペリン-13 (1 μ M) を加え、24 時間培養した (n=4)。

細胞増殖と遊走能評価

VSMC に対するアペリン-13 の効果を評価するため、WST-8 (Naclai Tesque 社) を用いた細胞増殖アッセイを行った。VSMC (1×10^4 cells/well) を 96 well plate に播種し、アペリン-13 (1 μ M) もしくは PDGF-BB (10ng/ml; Sigma Aldrich 社) を加え、48 時間培養した (n=6)。各ウェルに Cell Count Reagent SF (Nacalai Tesque 社) を加えて、37°C で 90 分間反応させた。反応後、マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm 波長における吸光度を測定した。

VSMC の遊走能評価のため、8.0- μ m 孔のトランズウェル (Corning 社) を使用した。VSMC にアペリン-13 (1 μ M) を加え、24 時間培養した後、トランズウェルに播種した。VSMC (5×10^4 cells/ml) を播種したインサートに 100 μ l の培地を加え、チャンバーには 600 μ l の培地と PDGF-BB (10ng/ml) を加えた (n=3)。12 時間培養した後、インサートのフィルターを 0.5% クリスタルバイオレット (Sigma Aldrich 社) と 20%メタノールで 10 分間固定した。各フィルターの 5 視野をランダムに選択し、孔を通過した細胞数を顕微鏡下で計測した。

大動脈リングアッセイ

過去の報告 [29] を参考に大動脈リングアッセイを行った。以下、方法を簡潔に記述する。顕微鏡下で外膜除去したマウス胸部大動脈を 0.5mm 長のリングとなるように切除し、Opti-MEM[®]培地 (Life Technologies 社) で 24 時間培養した。次に、96-well 培養皿で N-PBMNC もしくは H-PBMNC (2×10^6 cells/ml) を含んだ 50 μ l の growth

factor-reduced Matrigel® (BD biosciences 社) にリングを包埋し、Matrigel®上層に 150µl の Opti-MEM®培地とアペリン-13 (1 µM) を加え 37°Cで 7 日間培養した。培養開始 3、5 日目に培地を交換した。培養終了後、大動脈リングを 4% PFA で固定し、Cy3 標識抗α-SMA 抗体で染色した。発芽した血管数を顕微鏡下で測定し、新生血管周囲のα-SMA 陽性細胞を蛍光顕微鏡で評価した。

統計学的分析

全てのデータを平均値 ± 標準偏差で表記した。多群間の統計学的な比較は one-way ANOVA 検定で評価し、Bonferroni 法で補正した。2 群間の統計学的な比較は Student's t-test で評価した。 $p < 0.05$ もしくは $p < 0.01$ をもって統計学的に有意差ありとした。統計学的解析は全て、STATA software (StataCorp 社) を用いた。

5. 結果

低酸素プレコンディショニングで機能賦活化した PBMNC 移植とアペリン-13 の併用は、 虚血肢における機能的血管新生を促進した

虚血肢における血流評価のため、laser speckle perfusion imaging system を用いて虚血作成後から経時的に両足裏の血流を測定し (Fig. 1a)、5 群間で比較した。その結果、我々のこれまでの研究結果と同様、PBMNC 移植を行った全ての群において PBS 群よりも有意な血流増加が認められた。また、本実験の特筆すべき結果として、虚血作成後 7 日から 28 日までの間、H-PBMNC+apelin 群がどの群よりも著明に血流が増加し、虚血作成後 28 日目には虚血作成前まで回復していたことが挙げられる。一方、H-PBMNC 群と N-PBMNC+apelin 群の血流は虚血作成後 28 日目には差を認めなかった (Fig. 1b)。

次に、“PBMNC 移植とアペリン-13 投与の併用”により虚血下肢に成熟した機能的血管を誘導するか否かを、アセチルコリン (Ach) 投与による血管拡張能の評価により検証した [30]。虚血作成後 28 日目に Ach を投与した結果、血管拡張による血流増加が全ての群で見られた (Fig. 2a, b)。特に、H-PBMNC+apelin 群において Ach 投与後の最も顕著な血流増加が認められ、治療後の新生血管が血管拡張能を有した機能的血管であることが示唆された (Fig. 2a)。また、NO 産生阻害薬である L-NAME を前投与することにより下肢血流増加が打ち消されることから、治療群における血流増加は Ach による血管拡張作用によるものであることが示された (Fig. 1d)。

一方、組織学的評価においても、我々のこれまでの研究と同様に、H-PBMNC 移植治療により虚血肢における血管新生が誘導されることが確認された (Fig. 3a, b)。しかしながら、H-PBMNC 移植 (細胞の単独移植) のみでは新生血管数の増加が認められるものの、アペリン-13 投与を行った群 (アペリン単独投与) に比べ血管径は小さかった。これに対して、PBMNC 移植とアペリン-13 投与を併用した群 (細胞移植+アペリン投与) では、 α -SMA 陽性細胞に被覆された成熟新生血管を多数認めた。特筆すべきは、H-PBMNC 移植とアペリン-13 の併用 (機能賦活化細胞移植+アペリン投与) において、より高い成熟血管形成が認められたことである (Fig. 3c)。

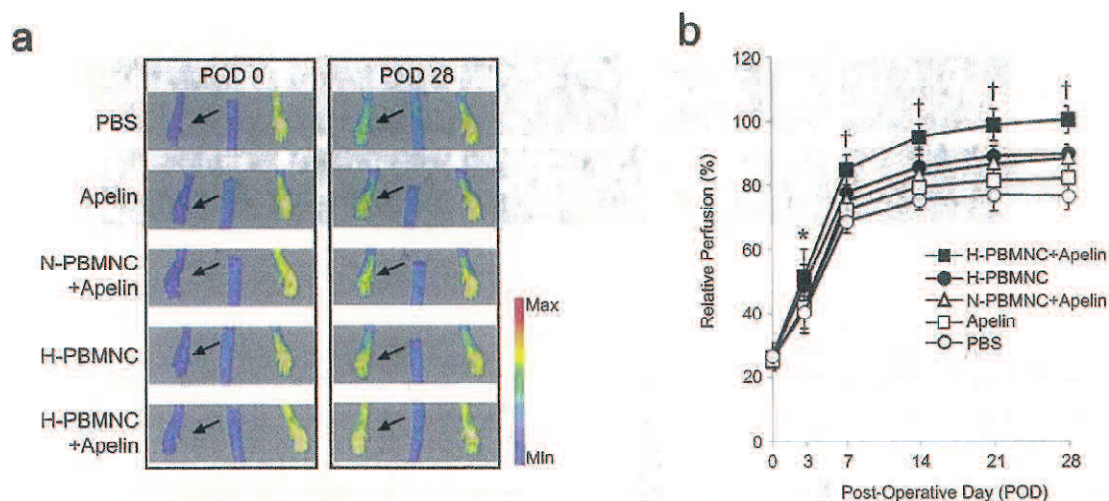


図 1. 低酸素プレコンディショニングによる PBMNC の機能賦活化、PBMNC 移植による血管新生療法、そしてアペリン-13 投与の 3 要素を併用した血管新生療法による血流改善効果

治療後の虚血肢血流を laser speckle perfusion imaging system を用いて経時的に測定した。(a) 左下肢 (矢印) の血流は、全ての群で虚血作成直後 (POD 0) の減少と虚血作成後 28 日目での改善が認められた。(b) 下肢血流の定量解析では、H-PBMNC 移植とアペリン-13 投与との併用群において虚血肢における最も高い血流改善効果が認められた。PBS ; PBS 投与群, apelin ; アペリン-13 投与群, N-PBMNC+apelin ; normoxia 条件下で培養した PBMNC 移植とアペリン-13 投与群, H-PBMNC ; hypoxia 条件下で培養した PBMNC 移植群, H-PBMNC+apelin ; hypoxia 条件下で培養した PBMNC 移植とアペリン-13 投与群, を表す。* は $p < 0.05$ vs. PBS 群を、† は $p < 0.01$ vs. 他の 4 群を表す。

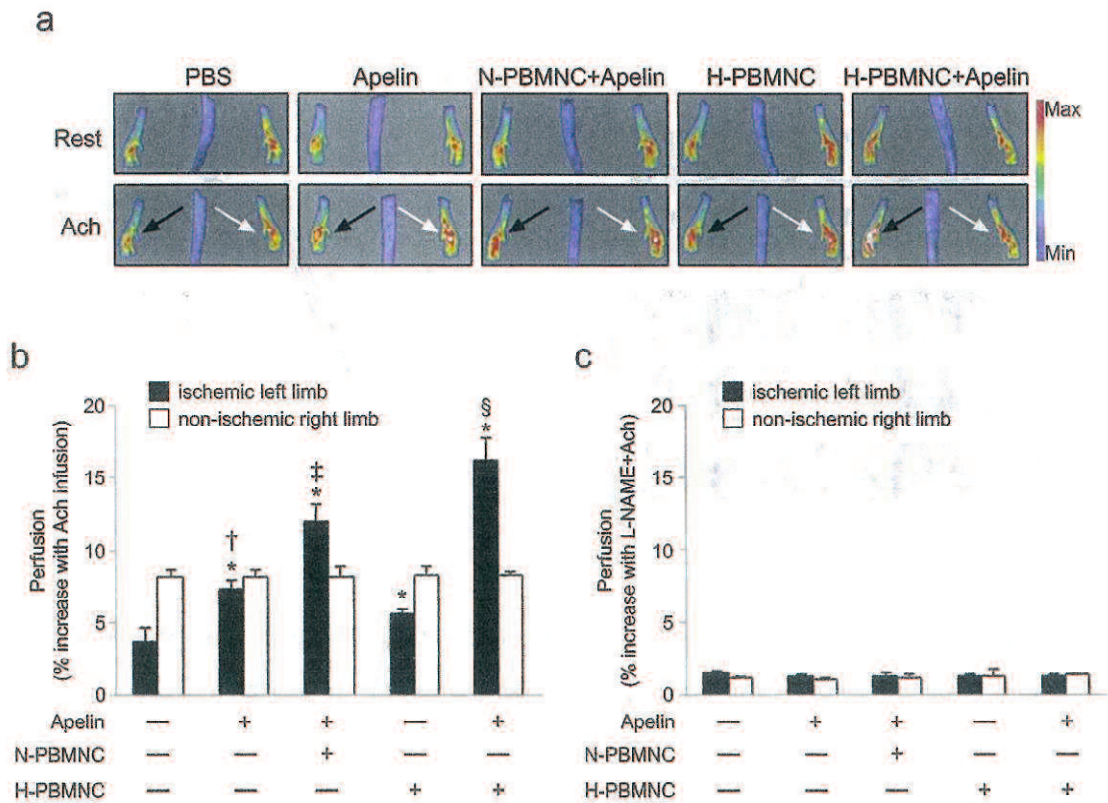


図2. H-PBMNC移植とアペリン-13投与の併用が虚血肢における血管拡張能を有する新生血管を誘導した。

(a) Ach投与前 (Rest) と投与後 (Ach) における代表的な画像。虚血作成後28日目のマウスにAchを経静脈的に投与し、直ちに下肢血流をlaser speckle perfusion imaging systemを用いて測定した。黒矢印は虚血肢を、白矢印は非虚血肢を表す。(b) 虚血肢(黒)もしくは非虚血肢(白)におけるAch投与後における血流増加率の定量解析結果。PBMNC移植とアペリン-13投与の併用により、虚血肢における血流が有意に増加した。

(c) 虚血肢(黒)もしくは非虚血肢(白)におけるL-NAMEとAch投与後における血流増加率の定量解析結果。Ach投与後の血流増加はNO産生阻害により阻害された。*は $p < 0.05$ vs. PBS群を、†は $p < 0.01$ vs. H-PBMNC群を、‡は $p < 0.01$ vs. apelin群、H-PBMNC群を、§は $p < 0.01$ vs. apelin群、apelin+N-PBMNC群、H-PBMNC群を表す。

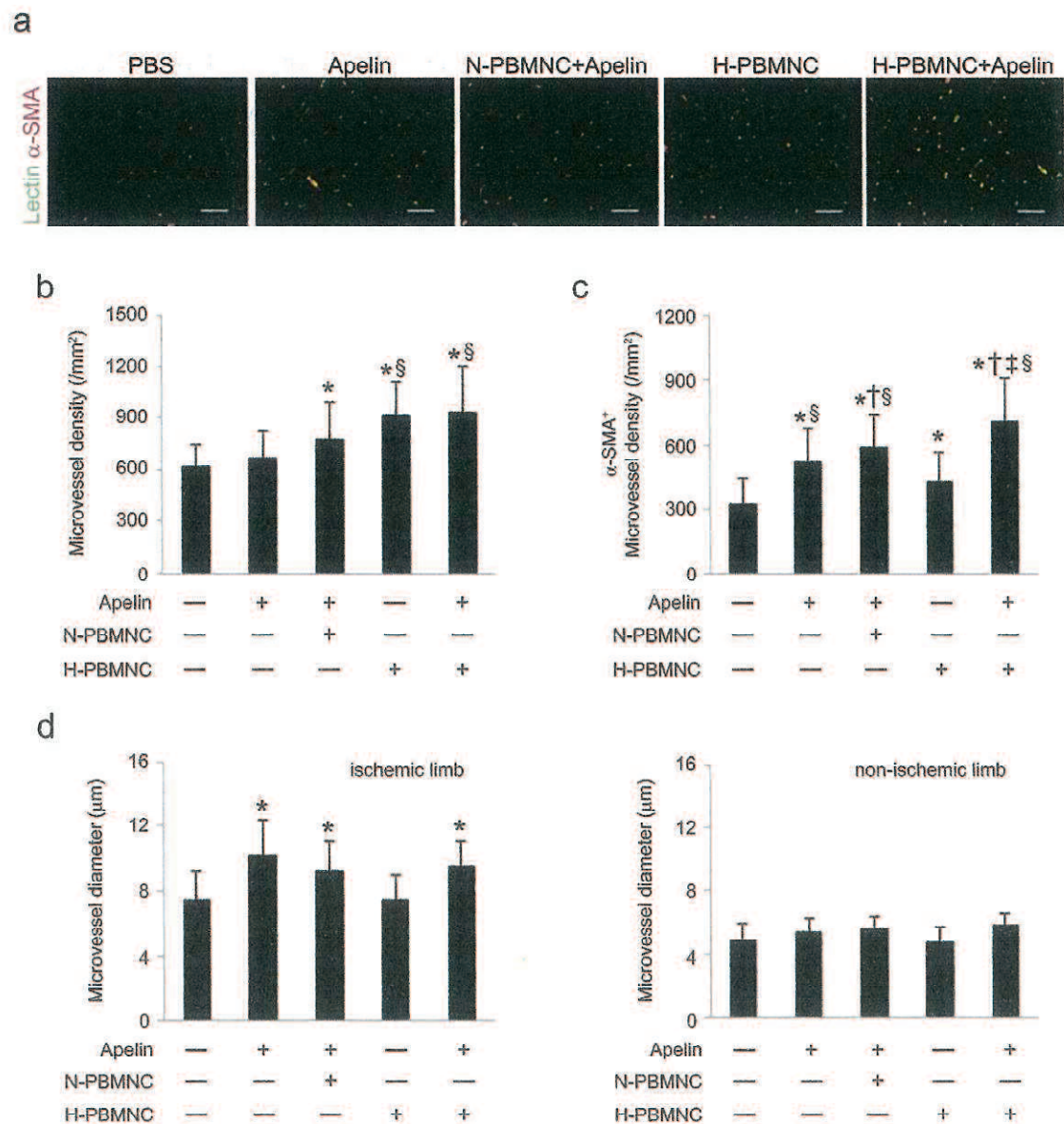


図3. H-PBMNC移植とアペリン-13投与の併用が虚血肢における新生血管成熟化を誘導した。

虚血作成後28日目にマウス下肢骨格筋を採取し、薄切凍結切片の断面から成熟化微小血管密度を計測した。(a) 下肢筋切片における微小血管の代表的な画像。EC (血管内皮細胞) と VSMC (血管平滑筋細胞) をそれぞれ DyLite488 標識抗 Lectin 抗体 (緑) と Cy3 標識抗 α -SMA 抗体 (赤) を用いて可視化した。スケールバーは 50 μ m を表す。

(b) Lectin 陽性微小血管密度の定量解析結果。* は $p < 0.01$ vs. PBS 群、apelin 群を、§ は $p < 0.01$ vs. apelin+N-PBMNC 群を表す。(c) α -SMA 陽性微小血管密度の定量解析結

果。* は $p < 0.01$ vs. PBS 群を、† は $p < 0.01$ vs. apelin 群を、‡ は $p < 0.01$ vs. apelin+N-PBMNC 群を、§ は $p < 0.01$ vs. H-PBMNC 群を表す。(d) 虚血肢、非虚血肢における微小血管径の定量解析結果。* は $p < 0.01$ vs. PBS 群、H-PBMNC 群を表す。

低酸素プレコンディショニングは PBMNC における APJ 受容体の発現を亢進させ、
アペリン-13 の感受性を増強させる。

アペリン受容体をコードするヒト APJ 遺伝子の第一イントロンに低酸素応答性領域 (HRE) が存在することから [31]、低酸素プレコンディショニングが PBMNC における APJ 発現の亢進を誘導し、アペリン-13 に対する感受性を高める可能性がある。事実、低酸素プレコンディショニングを施したマウス PBMNC において、APJ 発現量と APJ 陽性細胞数の有意な増加が認められた (Fig. 4a, b)。これらの結果は、アペリン-13 は新生血管の成熟化を直接促進させる作用に加え、H-PBMNC の細胞機能に何らかの影響を与え得る事を示唆している。そこで我々は、APJ 発現の亢進した H-PBMNC からの成長因子分泌にアペリン-13 が影響を及ぼすか否かを検証した。その結果、アペリン-13 の刺激により、新生血管周囲への壁細胞動員に重要な PDGF-BB と TGF- β 1 [32, 33] の分泌が H-PBMNC において有意に増加した (この現象は N-PBMNC では認められなかった) (Fig. 4c)。血管新生に重要なその他の成長因子 (VEGF、bFGF、HGF) の分泌は、アペリン-13 の刺激では変化が見られなかった (未発表データ)。まとめると、アペリン-13 の PBMNC に対する主な作用は、VSMC の機能を向上させる成長因子の分泌亢進であった。

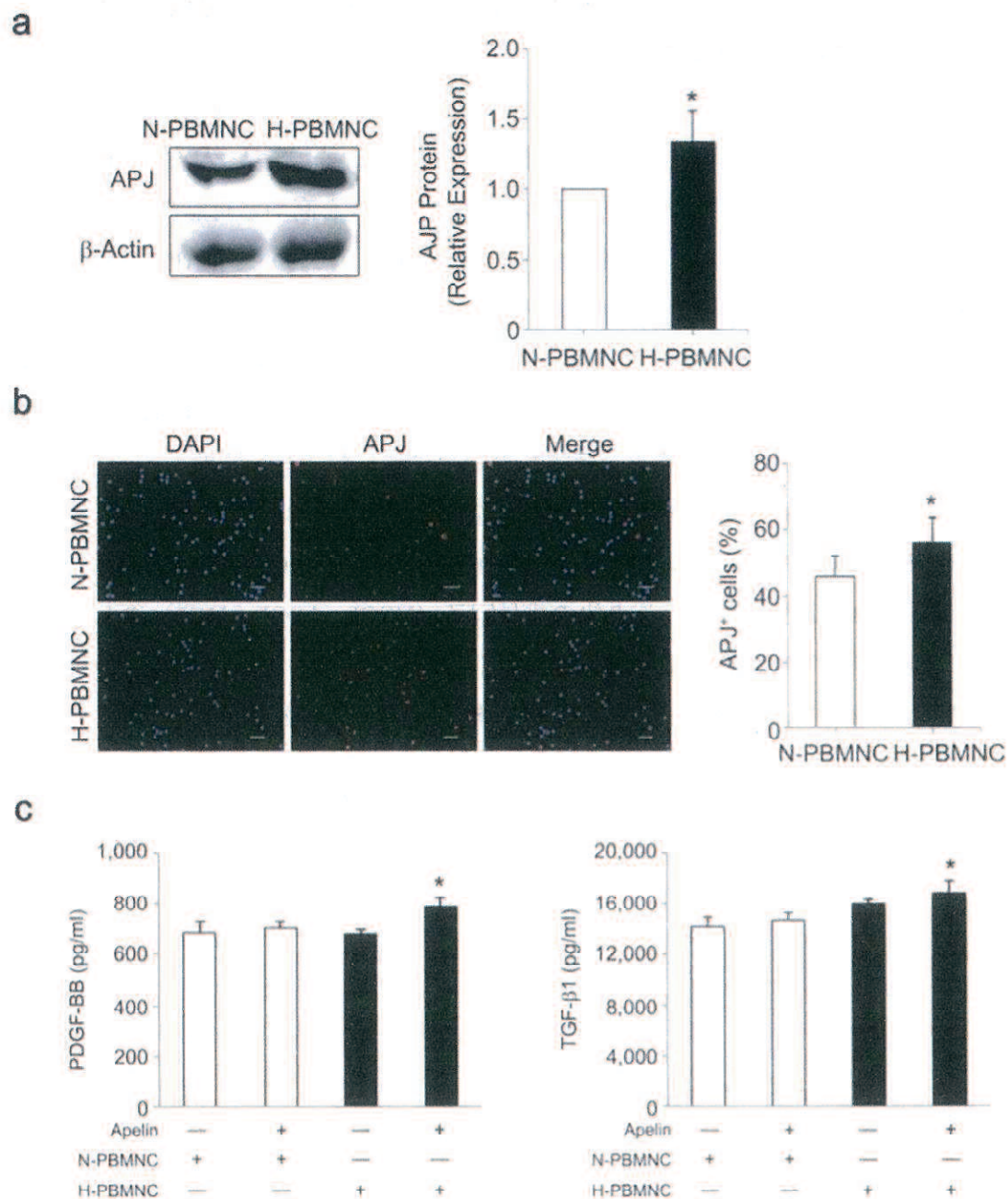


図4. 低酸素プレコンディショニングはPBMNCにおけるAPJ発現を亢進させることにより、アペリン-13に対する反応性を増加させ、成長因子の分泌を促進させる。

(a) APJの発現はH-PBMNCで有意に増加した。*は $p < 0.05$ vs. N-PBMNCを表す。

(b) 低酸素プレコンディショニングはAPJ陽性PBMNCを増加させた。スケールバーは20 μm を表す。*は $p < 0.01$ vs. N-PBMNCを表す。

(c) H-PBMNC+apelin群でPDGF-BBとTGF- β 1の分泌が増加した。培養上清中のPDGF-BBとTGF- β 1の濃度はELISAを用

いて分析した。* は $p < 0.01$ vs. N-PBMNC 群を表す。

虚血により動脈中の VSMC における APJ の発現が亢進する。

アペリン-13 は、血管内皮細胞 (EC) 膜表面の APJ に結合し血管成熟化を誘導する [22]。APJ は VSMC にも発現しており、アペリン/APJ 軸は血管収縮と関係がある [34]。我々は、虚血下肢におけるアペリン-13 の標的細胞を同定するため、マウス大腿動脈結紮モデルの虚血動脈における APJ 発現を評価した。このモデルでは、大腿-伏在動脈における APJ mRNA 発現レベルが虚血作成後 3 日から 14 日目まで有意に増加し (非虚血時と比較し約 3 倍増)、28 日目には虚血前まで低下していた (Fig. 5a)。次に虚血作成後 3 日目の虚血血管における APJ 発現細胞の同定を試みた。虚血下肢動脈における APJ の発現は血管平滑筋細胞 (VSMC) に限局し、EC には認められなかった。一方、非虚血下肢においては VSMC と EC ともに APJ 発現は検出されなかった (Fig. 5b)。

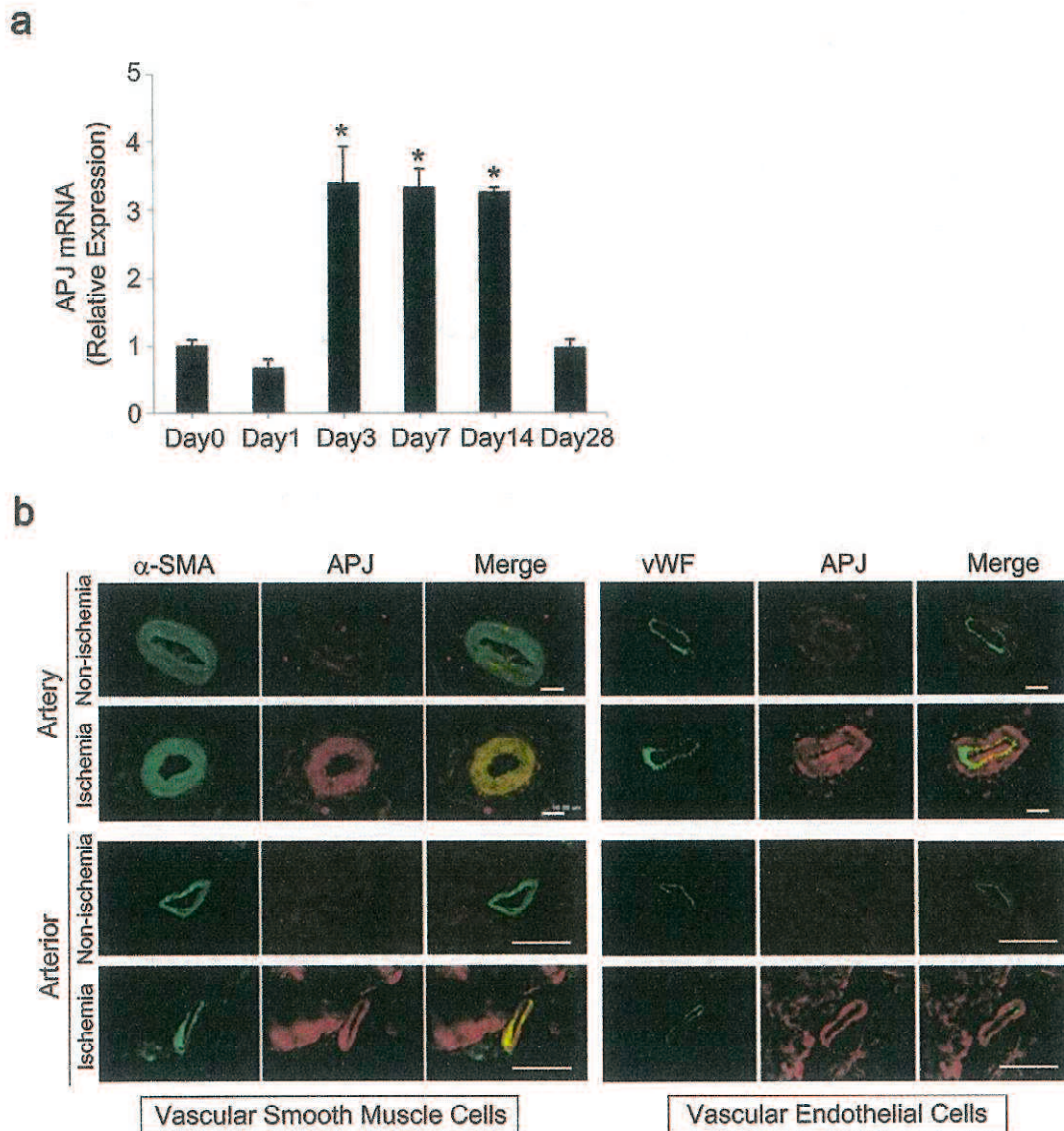


図 5. 虚血動脈における VSMC における APJ の発現。

(a) マウス下肢虚血動脈（虚血作成前、虚血作成後 1、3、7、14、28 日目）における APJ 遺伝子に対する定量的 RT-PCR の結果。虚血動脈における APJ mRNA 発現レベルは、虚血作成後 3 日目から 14 日目にかけて有意に増加し 28 日目には虚血前まで低下した。* は $p < 0.01$ vs. 虚血前 (Day0) を表す。(b) 虚血動脈において、VSMC において APJ 発現が認められ、EC では検出されなかった。虚血動脈における APJ 発現細胞を同定するため、虚血作成後 3 日目に虚血動脈を採取し、APJ (赤)、vWF (緑)、 α -SMA (緑) に対する免疫組織染色を行った。スケールバーは 50 μ m を表す。

アペリン-13はPDGF-BBによるVSMCの増殖と遊走作用を増強させる。

これまでの一連の研究により、虚血下肢のVSMCにおけるAPJ発現の亢進が明らかとなった。そこで次の研究として、VSMCに対するアペリン-13の作用を検証することとした。*In vitro*においてVSMCでのAPJ発現を認めた為 (Fig. 6a)、アペリン-13がVSMCの増殖や遊走に影響を与えるかを*in vitro*で検証した。その結果、アペリン-13はVSMCの増殖能と遊走能を促進し、PDGF-BB存在下でその効果がさらに増強された (Fig. 6b, c)。これらの結果は、アペリン-13がVSMCの機能活性化因子としての役割を有することを示している。興味深いことに、アペリン-13は、容量依存的にVSMCにおけるPDGFR- β の発現も増加させる (Fig. 6d)。この結果は、アペリンが、先に示したVSMC機能 (遊走能や増殖能) に対する直接作用に加えて、PDGF-BBへの感受性をも増強させることを示唆している。



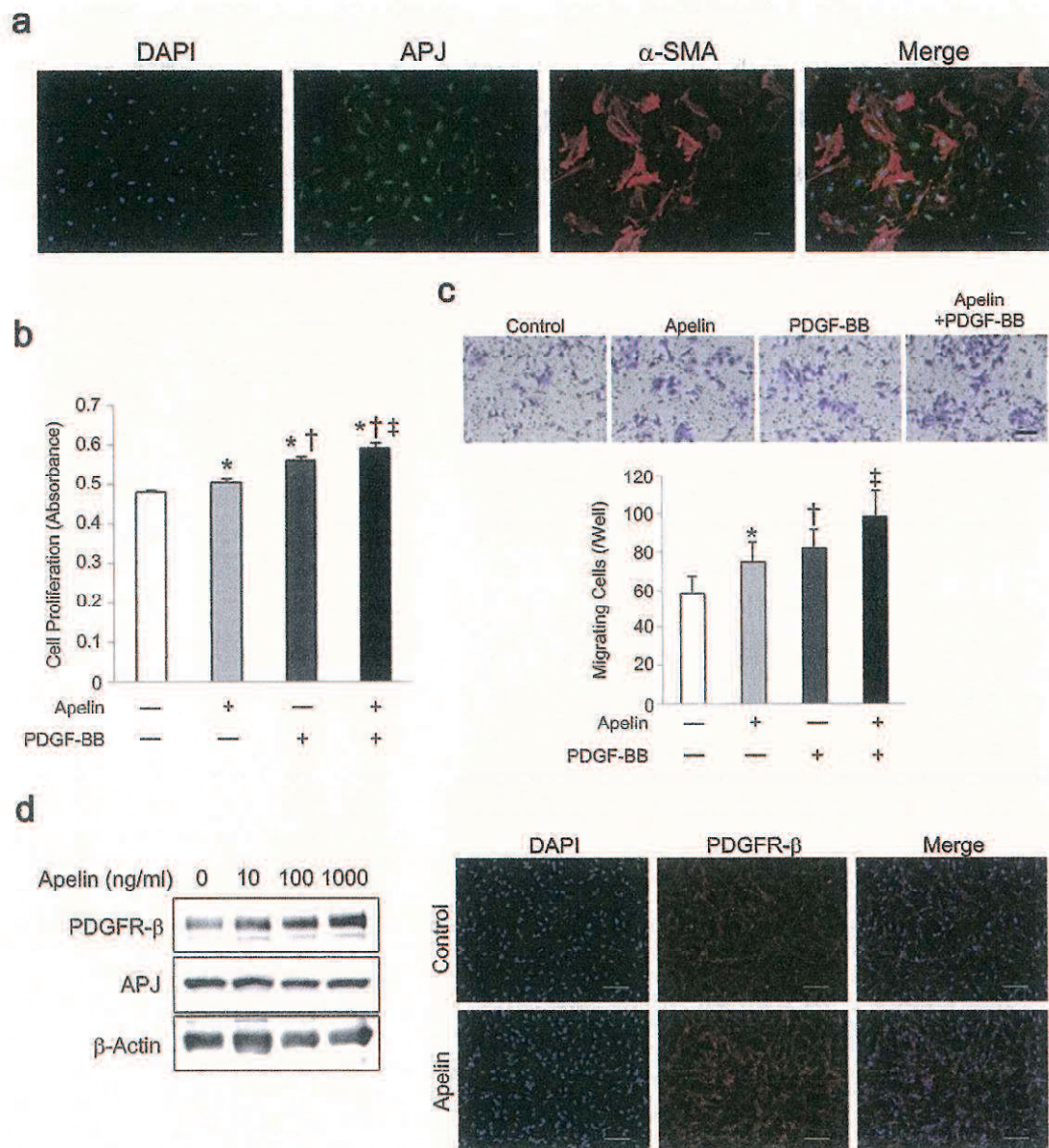


図 6. アペリン-13 は PDGF-BB 存在下で VSMC の増殖や遊走を促進させる。

(a) 培養 VSMC における APJ の発現。写真は、APJ (緑)、 α -SMA (赤) に対する免疫組織染色の代表的な画像である。核は DAPI (青) で染色した。(b) アペリン-13 は VSMC の増殖に対する PDGF-BB の作用を増強させた。アペリン-13 は、PDGF-BB と同様に VSMC の増殖を促進し、さらに PDGF-BB との相乗的な効果を示した。(c) アペリン-13 は、VSMC の遊走を促進させた。またアペリン-13 は、VSMC の遊走における PDGF-BB の作用も増強させた。(d) アペリン-13 は、VSMC における PDGFR- β の発現を亢進した。アペリン-13 を含む培地で VSMC を培養し、PDGFR- β と APJ の発現をウ

ウェスタンブロット法と免疫細胞染色で解析した。VSMCにおけるPDGFR- β 発現は、アペリン-13濃度依存的に増加した(左図)。PDGFR- β (赤)に対する免疫細胞染色においても、VSMCにおけるPDGFR- β の発現増加が認められた(右図)。スケールバーは50 μ mを表す。*は $p < 0.01$ vs. controlを、 \dagger は $p < 0.01$ vs. apelinを、 \ddagger は $p < 0.01$ vs. PDGF-BBを表す。



アペリン-13 と H-PBMNC は血管新生と新生血管成熟化を増強させる。

本研究で我々は、“H-PBMNC 移植とアペリン-13 投与の併用”により虚血下肢における成熟血管が増加することを マウス下肢虚血モデルを用いて明らかにした (*in vivo* による検証)。しかしながら、PBMNC 移植により誘導された新生血管の成熟化に対して、投与したアペリン-13 が相乗的に作用するか否かは明らかではない。そこで、Matrigel®に包埋したマウス胸部大動脈と H-PBMNC の上層にアペリン-13 を含む培地を重層した *in vitro* 実験系を構築し (Fig. 7a)、血管新生とその成熟化に対する H-PBMNC とアペリン-13 の相乗的効果を検証した。培養 7 日目に、大動脈からの新生血管数を評価した。N-PBMNC と併用した場合、アペリン-13 が新生血管数に影響を及ぼすことはなかったが、新生血管周囲への VSMC の遊走はアペリン-13 を投与した全ての群で増加した (Fig. 7b-d)。一方、H-PBMNC 単独では血管新生を促進するのみであったが、H-PBMNC とアペリン-13 の併用群では血管新生と新生血管の成熟化の促進が認められた (Fig. 7b, d)。これらの結果は、血管新生に対するアペリン-13 と H-PBMNC 移植の併用による相乗的な効果を示している。

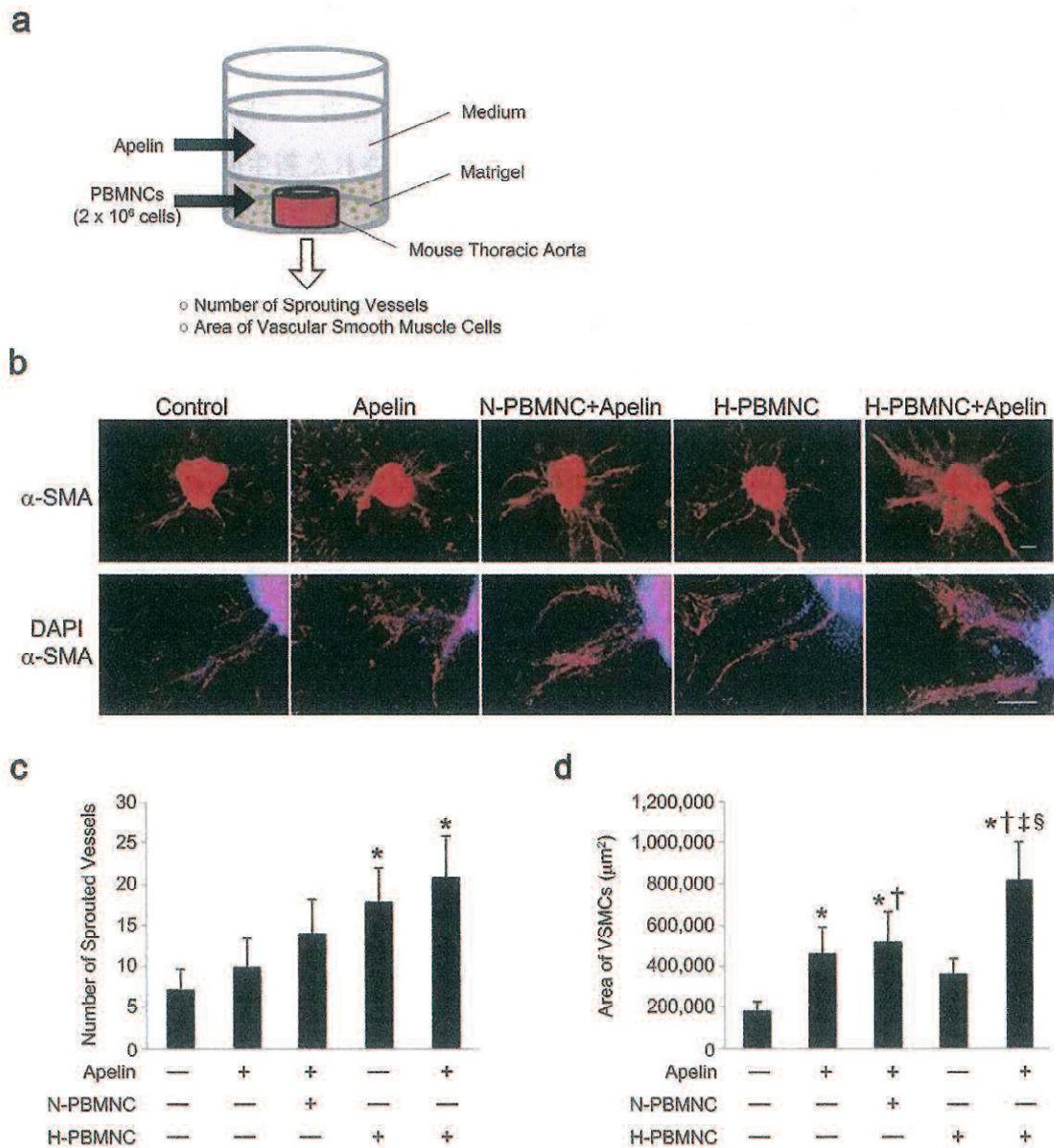


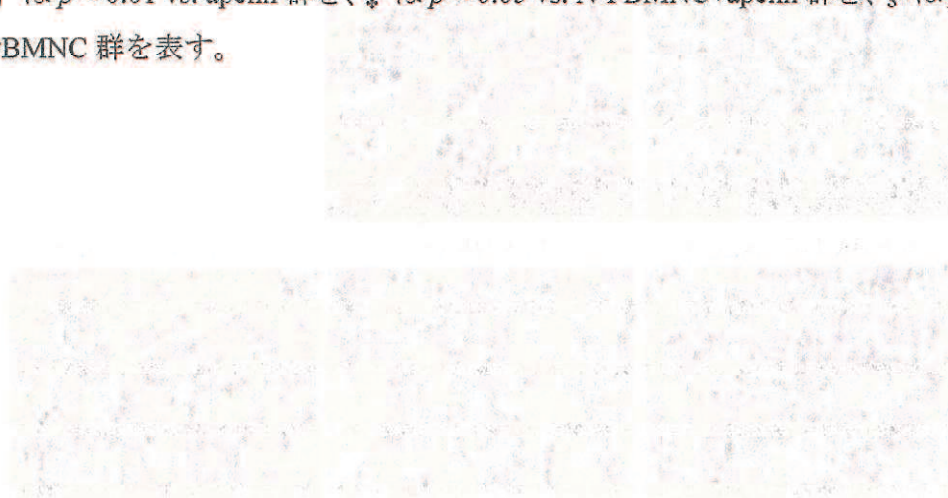
図7. アペリン-13はH-PBMNCと相乗的に新生血管の成熟化を誘導する。

(a) マウス胸部大動脈、PBMNC、アペリン-13を用いたリングアッセイの概要図。マウス胸部大動脈とPBMNCをMatrigel®に包埋し、アペリン-13は上層の培地に加えた。

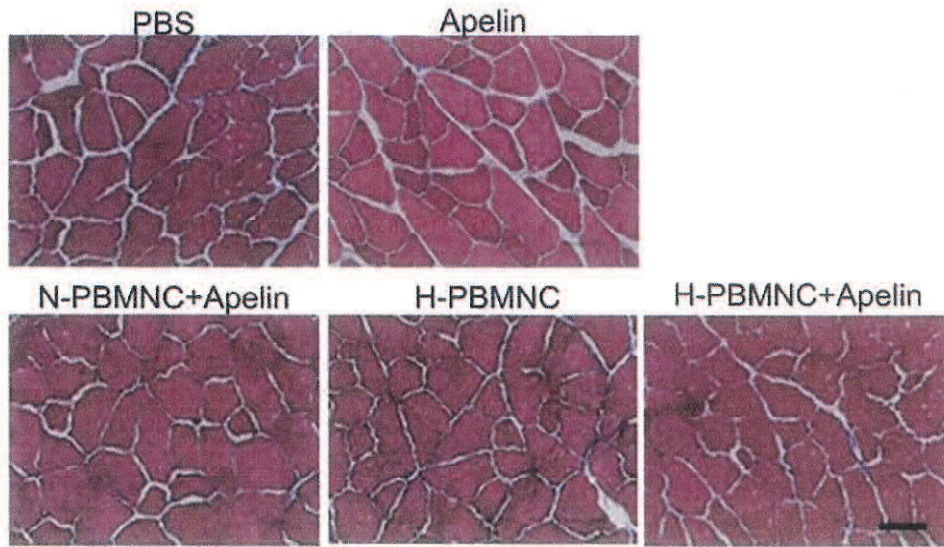
(b) 大動脈リングと新生血管の代表的な画像である。新生血管周囲のVSMCは、 α -SMA(赤)発現により同定した。スケールバーは200 μm を表す。

(c) H-PBMNCとアペリン-13は、大動脈リングからの血管新生を促進した。大動脈リングからの新生血管数は、H-PBMNC+apelin群で有意に増加した。*は $p < 0.01$ vs. PBS群を表す。(d) H-PBMNCとアペリン-13の併用は、大動脈リングからの新生血管を成熟化させた。新生血管の成

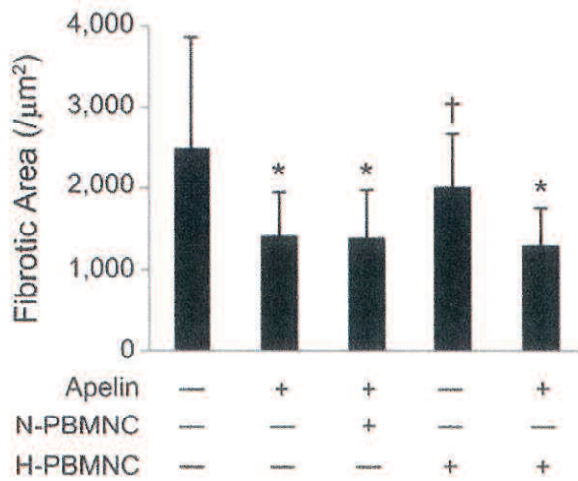
熟化は、各視野における α -SMA 陽性細胞の面積で定量評価した。* は $p < 0.05$ vs. PBS 群を、† は $p < 0.01$ vs. apelin 群を、‡ は $p < 0.05$ vs. N-PBMNC+apelin 群を、§ は $p < 0.01$ vs. H-PBMNC 群を表す。



a



b



補足図 1. 虚血作成後 28 日目の虚血下肢における線維化の評価

(a) 虚血下肢筋切片におけるマッソントリクローム染色画像。スケールバーは 50 μm を表す。青は線維組織を表す。(b) 線維組織密度の定量解析結果。* は $p < 0.01$ vs. PBS 群、H-PBMNC 群を、† は $p < 0.01$ vs. PBS 群を表す。

6. 考察

本研究で我々は、PBMNC 移植治療、PBMNC に対する低酸素プレコンディショニング、アペリン-13 投与、の 3 要素を併用した血管新生療法が、重症下肢虚血に対する有効な治療方法となりうることを示した。

我々は、この併用療法により NO 依存的な血管拡張能を有する機能的な新生血管が増加し、結果として虚血下肢での血流改善が誘導されることを、マウス下肢虚血モデルを用いて見出した。一方で、H-PBMNC の単独移植においても虚血肢における Ach 応答性血管拡張を有意に増加させたが、非虚血肢で観察される定常状態の血流までには達しなかった。この結果は、多くの機関で用いられている従来の細胞移植療法では、重症下肢虚血の血流改善には不十分であることを示唆している。注目すべきことに、今回の実験では、“アペリン-13 投与と H-PBMNC 移植の併用療法”により虚血肢における α -SMA 陽性血管（すなわち成熟した新生血管）が有意に増加し、アペリン-13 が PBMNC 移植の治療効果を向上させることが示めされた。またその効果は、“N-PBMNC との併用群”よりも有意に高いものであった。以上の結果から、我々が新たに開発した併用療法 (triple combination therapy) は、重症下肢虚血に対する優れた治療法となり得る。

同様の治療概念として、細胞移植治療と *Ang1* 遺伝子導入による併用療法が、ウサギ下肢虚血モデルでの量的・質的血管新生をもたらすことが報告されている [19]。従って、細胞移植治療と 1 種類もしくは複数の血管成熟化因子とを同時に投与する併用療法は、重症下肢虚血に対する有望な治療戦略となり得ることは明白である。さらに我々は、本併用療法の別の治療効果として、アペリン-13 が虚血下肢における線維化を抑制することを明らかにしており、アペリン-13 併用治療のさらなる有益性を示すものである (Supplementary Figure S1)。加えて我々は、アペリン-13 と細胞移植治療の相乗的効果が、低酸素プレコンディショニングと組み合わせることで最も有効となることを示した。これは、単に未処理の細胞との併用ではなく、低酸素処理により機能賦活化した細胞 (PBMNC) を使用することが、優れた治療効果を発揮する上で必須であることを示唆している。

In vitro 実験の結果から、細胞移植による血管新生療法の有効性を高める上で、アペリン-13 が少なくとも 2 つの作用点を有することがわかる。1 つは H-PBMNC からの PDGF-BB 分泌を促進すること、他方は VSMC における PDGFR- β の発現亢進である。PDGFR シグナル伝達経路が血管成熟化過程の特に“壁細胞の動員”に重要な役割を果たしていることから [32, 35]、同時投与したアペリン-13 が“H-PBMNC”と“VSMC”

の両細胞に作用することで PDGFR シグナル伝達経路を介した VSMC の機能を高め、その結果、虚血肢における新生血管成熟化を誘導する可能性がある。これまでも、低酸素刺激が肝星状細胞及び肝細胞における APJ の発現を亢進させ、アペリン/APJ シグナル伝達経路の活性化により、PDGF-BB の分泌が誘導されることが示されていることから [36]、APJ の発現亢進により H-PBMNC のアペリン-13 に対する反応性が高まり、PDGF-BB の分泌が増加する可能性がある。PDGF-BB の分泌増加が H-PBMNC にのみ見られるという事実は、新生血管成熟化を相乗的に増強させるためには、低酸素刺激による PBMNC での APJ の発現亢進が重要であることを示している。一方、EC における Ang-1 受容体 Tie-2 の発現が低酸素刺激により亢進することが知られており、同様の治療戦略としてアペリンの代わりに Ang-1 を用いることも可能かもしれない [37]。この点について我々は、従来から知られるアペリン-13 の VSMC への直接的な作用 [34, 38] に加えて、“VSMC における PDGFR- β の発現亢進” および “VSMC の機能増強における PDGF-BB との相乗的効果” についても明らかにした。これらの相乗的効果は、(同様に本研究で明らかにした) H-PBMNC へのアペリン-13 の作用と組み合わせる事が可能であるため、リーズナブルである。また、アペリン-13 による VSMC での PDGFR- β の発現亢進は、H-PBMNC から分泌される PDGF-BB に対する反応性を増加させる。さらに、虚血動脈の VSMC において APJ が一過的に発現亢進する事実は、(*in vitro* 実験で認められた) アペリン-13 による PDGFR- β の発現誘導が虚血肢 VSMC においても同様に生じることを意味し、本併用療法において VSMC の増殖や遊走が増強されることを示している。このように、H-PBMNC とアペリン-13 の併用療法は虚血肢においてより高い治療効果をもたらすことが出来る。

PBMNC 移植に加え、アペリンは心血管疾患に対する治療薬として第 1 相臨床試験が実施されている [39, 40]。その中で、アペリン-13 の *in vivo* における不安定性が臨床応用への課題として挙げられてきているが、最近の研究では、ナノリポソームへの封入した安定化アペリン-13 の不全心における治療効果が動物モデルで実証されている [41] ことから、ナノリポソームへの封入は、アペリン-13 の循環系における安定化を可能にし、標的組織への移行を促進する方策として一つの有効な手段となり得る。

7. 結語

本研究で得られた成果を総合的に考えると、“低酸素プレコンディショニングにより機能賦活化した PBMNC 移植”と“アペリン-13 投与”の併用療法は、重症下肢虚血に対する有望な治療法の 1 つとなり得る、と結論づけることができる。

8. 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました山口大学大学院 器官病態外科学講座（第一外科）、濱野公一教授に深謝申し上げます。

また、実験のご指導を頂きました、細山徹先生（山口大学大学院 器官病態外科学講座）、西本新先生（山口大学大学院 器官病態外科学講座）、上野耕司先生（山口大学大学院 器官病態外科学講座）に感謝申し上げます。

9. 参考文献

- [1] Minamino, T., Toko, H., Tateno, K., Nagai, T. & Komuro, I. Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet*. 2002; 360: 2083-4.
- [2] Asahara, T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997; 275: 964-7.
- [3] Hojo, Y. et al. Expression of vascular endothelial growth factor in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 35: 968-73.
- [4] Kalka, C. et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 3422-7.
- [5] Rehman, J., Li, J., Orschell, C. M. & March, K. L. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 2003; 107: 1164-9.
- [6] Horie, T. et al. Long-term clinical outcomes for patients with lower limb ischemia implanted with G-CSF-mobilized autologous peripheral blood mononuclear cells. *Atherosclerosis*. 2010; 208: 461-6.
- [7] Kajiguchi, M. et al. Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Circ J*. 2007; 71: 196-201.
- [8] Moriya, J. et al. Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. *Circ Cardiovasc Interv*. 2009; 2: 245-54.
- [9] Hayashi, M., Li, T. S., Ito, H., Mikamo, A. & Hamano, K. Comparison of intramyocardial and intravenous routes of delivering bone marrow cells for the treatment of ischemic heart disease: an experimental study. *Cell Transplant*. 2004; 13: 639-47.
- [10] Zhang, M. et al. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol*. 2001; 33: 907-21.
- [11] Kubo, M. et al. Increased expression of CXCR4 and integrin alphaM in hypoxia-preconditioned cells contributes to improved cell retention and angiogenic potency. *J Cell Physiol*. 2009; 220: 508-14.
- [12] Kubo, M. et al. Hypoxic preconditioning increases survival and angiogenic potency of

- peripheral blood mononuclear cells via oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 294: H590-5.
- [13] Kudo, T. et al. Hypoxic preconditioning reinforces cellular functions of autologous peripheral blood-derived cells in rabbit hindlimb ischemia model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 444: 370-5.
- [14] Kudo, T. et al. Hypoxically preconditioned human peripheral blood mononuclear cells improve blood flow in hindlimb ischemia xenograft model. *Am J Transl Res.* 2014; 6: 570-9.
- [15] Kainuma, S. et al. Cell-sheet therapy with omentopexy promotes arteriogenesis and improves coronary circulation physiology in failing heart. *Mol Ther.* 2015; 23: 374-86.
- [16] Cao, Y., Hong, A., Schulten, H. & Post, M. J. Update on therapeutic neovascularization. *Cardiovasc Res.* 2005; 65: 639-48.
- [17] Banquet, S. et al. Arteriogenic therapy by intramyocardial sustained delivery of anovel growth factor combination prevents chronic heart failure. *Circulation.* 2011; 124: 1059-69.
- [18] Richardson, T. P., Peters, M. C., Ennett, A. B. & Mooney, D. J. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol.* 2001; 19: 1029-34.
- [19] Kobayashi, K. et al. Combination of in vivo angiopoietin-1 gene transfer and autologous bone marrow cell implantation for functional therapeutic angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 1465-72.
- [20] Jain, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003; 9: 685-93.
- [21] Suri, C. et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell.* 1996; 87: 1171-80.
- [22] Kidoya, H., Naito, H. & Takakura, N. Apelin induces enlarged and nonleaky blood vessels for functional recovery from ischemia. *Blood.* 2010; 115: 3166-74.
- [23] Kidoya, H. et al. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J.* 2008; 27: 522-34.
- [24] Tatemoto, K. et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 251: 471-6.
- [25] Takakura, N. & Kidoya, H. Maturation of blood vessels by haematopoietic stem cells and progenitor cells: involvement of apelin/APJ and angiopoietin/Tie2 interactions in

- vessel caliber size regulation. *Thromb Haemost.* 2009; 101: 999-1005.
- [26] Frier, B. C., Williams, D. B. & Wright, D. C. The effects of apelin treatment on skeletal muscle mitochondrial content. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009; 297: R1761-8.
- [27] Higuchi, K. et al. Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology.* 2007; 148: 2690-7.
- [28] Parker, J. L. & Adams, H. R. Selective inhibition of endothelium-dependent vasodilator capacity by *Escherichia coli* endotoxemia. *Circ Res.* 1993; 72: 539-51.
- [29] Baker, M. et al. Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nat Protoc.* 2012; 7: 89-104.
- [30] Mikami, S. et al. Autologous bone-marrow mesenchymal stem cell implantation and endothelial function in a rabbit ischemic limb model. *PLoS One.* 2013; 8: e67739.
- [31] Eyries, M. et al. Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ Res.* 2008; 103: 432-40.
- [32] Hellstrom, M., Kalen, M., Lindahl, P., Abramsson, A. & Betsholtz, C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development.* 1999; 126: 3047-55.
- [33] Ma, J., Wang, Q., Fei, T., Han, J. D. & Chen, Y. G. MCP-1 mediates TGF-beta-induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration. *Blood.* 2007; 109: 987-94.
- [34] Hashimoto, T. et al. Apelin stimulates myosin light chain phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 1267-72.
- [35] Lindahl, P., Johansson, B. R., Leveen, P. & Betsholtz, C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science.* 1997; 277: 242-5.
- [36] Melgar-Lesmes, P. et al. Hypoxia and proinflammatory factors upregulate apelin receptor expression in human stellate cells and hepatocytes. *Gut.* 2011; 60: 1404-11.
- [37] Willam, C. et al. Tie2 receptor expression is stimulated by hypoxia and proinflammatory cytokines in human endothelial cells. *Circ Res.* 2000; 87: 370-7.
- [38] Liu, Q. F. et al. Apelin-13-induced proliferation and migration induced of rat vascular smooth muscle cells is mediated by the upregulation of Egr-1. *Biochem Biophys Res*

- Commun. 2013; 439: 235-40.
- [39] Japp, A. G. et al. Vascular effects of apelin in vivo in man. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52: 908-13.
- [40] Japp, A. G. et al. Acute cardiovascular effects of apelin in humans: potential role in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 2010; 121: 1818-27.
- [41] Serpooshan, V. et al. [Pyr1]-Apelin-13 delivery via nano-liposomal encapsulation attenuates pressure overload-induced cardiac dysfunction. *Biomaterials.* 2015; 37: 289-98.