

泌量が得られたのは、血管内皮細胞成長因子 A (VEGF-A : Vasucular Endothelial Growth Factor-A, 以降 VEGF と省略する) のみであった (Fig.1 ; VEGF の体内血中濃度はおよそ 200~1100pg/mL とされている)。以上より、VEGF は MSC による虚血組織保護効果において、主要な役割を果たしている因子の一つであることが示唆されている。

VEGF は、血管内皮細胞の増殖や血管新生、動脈形成、リンパ管新生などに関与する因子と言われている。また腫瘍や網膜の血管新生、リウマチ、乾癬においても重要な役割を果たしており、臨床研究も積極的に行われている。

Fig.1 より MSC による VEGF 分泌にはロット差があることが分かる。これは MSC を医薬品として考えた時、細胞によって治療効果に大きな差が生じる可能性につながり、投与される細胞の修復能力を予め把握することが重要になる。そこで我々は、各ロットの通常条件培養時の網羅的遺伝子発現プロファイルと虚血応答性 VEGF 分泌とを比較し、VEGF 分泌応答と正の相関を示す 17 種類の遺伝子 (VSR 遺伝子 : VEGF Secretion Related Candidate Gene) を同定した。さらに RNAi により、VSR 遺伝子を発現抑制することで生じる、hMSC の虚血誘導性 VEGF 分泌の変化が検討した。その結果、RNAi により虚血時の VEGF 分泌量および分泌変化率の双方に有意な減少が認められた遺伝子は、17 種類のうち VSR6、7 遺伝子であることが明らかとなった (Fig.2-4)。従って VSR6、7 遺伝子は、hMSC の虚血応答性 VEGF 分泌に有意な生理的役割を担っており、特性解析指標 (バイオマーカー) 候補となる可能性が高いことが示唆された。

しかし、これら 2 つの遺伝子の性質や機能については不明な点が多い。これまでの実験は、酸素濃度 1% の低酸素およびグルコース無添加という条件を組み合わせた擬似的虚血条件

で行ってきたが、今後 VSR6、7 遺伝子の詳細な機能を解明するに当たり、実験系をより簡潔にする必要がある。そこで筆者は、低酸素のみに着目し、低酸素条件下 (酸素濃度 1%、グルコースあり) で hMSC の培養を行った。さらに VSR6、7 遺伝子を発現抑制し、低酸素条件下での hMSC による VEGF 分泌への VSR 遺伝子の影響を検討した。

これまでの研究により、VSR6、7 遺伝子は hMSC の虚血応答性 VEGF 分泌に重要な役割を担っていることが明らかとなったが、その具体的な作用機構については不明である。低酸素時には転写因子の一種、低酸素誘導因子 (HIF : Hypoxia Inducible Factor) の発現量が増加することが知られており、また虚血細胞において、血管新生に関与する多くの因子をコードする遺伝子の転写を促進し、血管新生を誘導すると言われている。さらに、低酸素時の VEGF (タンパク質) 分泌を誘導する VEGF 遺伝子の転写にも、HIF が関与することが報告されており、VEGF は HIF 制御下にあると考えられている。

そこで本研究では、VSR6、7 遺伝子と HIF の関係を検討することで、hMSC の虚血応答性 VEGF 分泌における VSR6、7 遺伝子の制御機構の解明を試みた。すなわち VSR6、7 遺伝子を発現抑制し、HIF 感受性遺伝子の発現量の変化を測定することで、虚血時において VSR 遺伝子が HIF 誘導から VEGF (タンパク質) 分泌までのどの過程を制御しているか検討した。

B. 研究方法

B-1 低酸素条件下での hMSC の VEGF 分泌における VSR6、7 遺伝子の影響

B-1-1 使用細胞

hMSC は Lonza 社より入手した。ロットごとの年齢、性別、人種は Table 1 の通りである。

B-1-2 RNAi による VSR 遺伝子の機能障害

hMSC (PS#8) を 6 穴細胞培養用マルチウェルプレートに 1×10^5 cell/well となるように播種し、基本培地中で 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件下で一時培養後、Lipofectamine RNAiMAX [Invitrogen] を用いて Stelth RNAi [Invitrogen] を導入し、VSR6、7 遺伝子をノックダウンした。

1well あたりの添加量が 50nM となるように、Stelth RNAi を OPTI-MEM I Reduced Serum Medium [GIBCO, Invitrogen] で希釈し、Lipofectamine RNAiMAX を $4 \mu\text{L}$ /well となるように、同様に OPTI-MEM I Reduced Serum Medium で希釈した。希釈した Stelth RNAi 溶液と、Lipofectamine RNAiMAX 溶液を緩やかに 1 : 1 の容積比で混合し、複合体を形成させるために室温で 10~15 分間インキュベートした。

hMSC を抗生物質不含の基本培地で洗浄し、各 well に OPTI-MEM I Reduced Serum Medium を 2.5mL /well 加えた後、混合した複合体溶液を $500 \mu\text{L}$ ずつ加えて 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下で 4 時間インキュベートした。4 時間後に培地を基本培地に交換し、さらに 20 時間(合計 24 時間) インキュベートした。

ここで用いた Stelth RNAi の配列を Table 2 に示す。Stelth RNAi のネガティブコントロールとして、Stelth RNAi Negative Universal Control Med GC#3 [Invitrogen] を用いた。

なお 3 ロット (A、C、H) について同様の実験を行った。

B-1-3 細胞培養

RNAi 開始 24 時間後の hMSC を 1×10^4 cell/well となるように 96 穴細胞培養プレ

ート上に継代し、基本培地中で 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件下で 80%コンフルエントになるまで培養した。その後、以下に示す通常条件または低酸素条件においてさらに 24 時間培養を行い、細胞および培養上清を回収した。

通常条件 (コントロール群)

- インキュベータ : 通常酸素濃度 (37°C , $5\%\text{CO}_2$; MCO-175 [SANYO])
- 培地 : 無血清、グルコース (+) 4.5g/dL DMEM [GIBCO, Invitrogen, cat# 11965 + 100 unit/mL ペニシリン G + $100 \mu\text{g/mL}$ 硫酸ストレプトマイシン [GIBCO, Invitrogen]

低酸素条件 (低酸素群)

- インキュベータ : 酸素濃度 = 1.0% (37°C , $\text{N}_2:\text{O}_2:\text{CO}_2 = 94.0\% : 1.0\% : 5.0\%$; MCO-175M [SANYO])
- 培地 : 無血清、グルコース (+) 4.5g/dL DMEM [GIBCO, Invitrogen, cat# 11965] + 100 unit/mL ペニシリン G + $100 \mu\text{g/mL}$ 硫酸ストレプトマイシン [GIBCO, Invitrogen]

B-1-4 Total RNA の抽出

培養細胞からの Total RNA の抽出は、MagAttract RNA Cell Mini M48 Kit [QIAGEN]、BioRobot M48 Workstation [QIAGEN] を使用し、QIAGEN 社のマニュアルに従って行った。RNA サンプル濃度は 260nm の吸光度を測定することで評価し、 260nm の吸光度と 280nm の吸光度の比が 1.6 以上であることを指標に純度を確認した。吸光度測定は Nano Drop ND-1000 [Thermo] を用いて行った。抽出した RNA サンプルは -80°C にて冷凍保存した。

B-1-5 ノックダウン効率の測定

RNAi を行った各遺伝子が、実際にノックダウンされているかどうか確認するために、各 VSR 遺伝子の mRNA 発現量を定量する目的で、ABI Prism 7000 [Applied Biosystems] を用いて定量的リアルタイム RT-PCR を行った。

B-1-4 において Total RNA を抽出した後、RNA 濃度が $1\text{ng}/\mu\text{L}$ となるよう希釈し、未知サンプルとした。

ノックダウンを行っていない hMSC を用いて同様に Total RNA を抽出し、RNA 濃度を測定後、スタンダードサンプルとして、検量線が成り立つ濃度となるように $10\text{ng}/\mu\text{L}$ 、 $3.3\text{ng}/\mu\text{L}$ 、 $1\text{ng}/\mu\text{L}$ 、 $0.33\text{ng}/\mu\text{L}$ 、 $0.1\text{ng}/\mu\text{L}$ の希釈系列を作成した。

各遺伝子の mRNA 発現量を補正するための内部標準としては EEF1A1 (Eukaryotic translation Elongation Factor 1 Alpha 1) の mRNA を用いた。定量的リアルタイム RT-PCR に内部標準として汎用される GAPDH mRNA は、低酸素条件下で発現量が大きく変動すると言われている。一方、EEF1A1 は hMSC において mRNA の安定性が高く、発現量の変動が少ないため内部標準として適している。

VSR 遺伝子の発現検出用には、TaqMan プローブとプライマーの混合液である TaqMan Gene Expression Assay [Applied Biosystems] を用いた。使用した TaqMan Gene Expression Assay は Table 3 に示す通りである。

mRNA の定量には、QuantiTect Probe RT-PCR Kit [QIAGEN] を使用し、試薬を次に示す順序および比率で混合して調整した (Table 4)。

調整した Mix Solution を $24\mu\text{L}$ ずつ 1.5mL チューブ [Eppendorff] に分注し、RNA 濃度 $1\text{ng}/\mu\text{L}$ に希釈した未知サンプル、スタンダー

ド用サンプルをそれぞれ $6\mu\text{L}$ ずつ混合した。また DPEC 処理済蒸留水 [Nacalai Tesque] を $6\mu\text{L}$ 混合したものを Non-template control として作成した。

以上のサンプルを、 $25\mu\text{L}/\text{well}$ となるよう Micro Optimal 96-well Reaction Plate [Applied Biosystems] に分注し、プレートを ABI PRISM Optical Adhesive Covers [Applied Biosystems] でシールした後、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System [Applied Biosystems] を用いて定量的 RT-PCR を行い、タイムコースをリアルタイムでモニターした。サーマルサイクラーの条件設定は Table 5 の通りである。

検出されたシグナルからベースラインを設定し、これらをもとに PCR 産物の増幅が指数関数的に起こる領域でシグナルの閾値を設定した。シグナルの閾値に到達するサイクル数 (Threshold Cycle : Ct 値) を縦軸に、初期の mRNA 量対数を横軸にプロットし、検量線を作成した。

未知サンプルについても Ct 値を求めることにより、検量線からサンプル中の目的 mRNA 量を算出した。得られた結果は EEF1A1 の mRNA 発現量を用いて補正し、各サンプルの補正值をネガティブコントロールの補正值と比較することで各遺伝子の発現量の変動を解析した。

B-1-6 VSR 遺伝子阻害後における VEGF 分泌量の測定

VEGF の分泌量は Quantikine ELISA Kit [R&D] を用いて、B-1-3 で回収した細胞上清中の VEGF 量を測定した。測定は、R&D 社のマニュアルに従って行った。使用した ELISA Kit は Human VEGF Immunoassay [R&D, cat# DVE00] である。

B-1-7 統計解析

群間の差に対する統計学的検定は、統計ソフトウェア Sigma Stat [SYSTAT Software] または Microsoft Excel [Microsoft] により行った。

mRNA ノックダウン効率測定データについては、等分散性と正規性が仮定出来る場合には Student's t-test、等分散性が仮定出来ないが正規性は仮定出来る場合には Welch's t-test、正規性が仮定出来ない場合には Mann-Whitney test を用いた。等分散性の検定には F 検定、正規性の検定には Kolmogorov-Smirnov 検定を用いた。

VEGF の濃度データについては、two-way ANOVA を行った。

B-2 hMSC の VEGF 分泌における VSR6、7 遺伝子の制御メカニズム

B-2-1 使用細胞および RNAi による VSR 遺伝子の機能障害

虚血応答性 VEGF 分泌における VSR6、7 遺伝子の制御機構を検討するために、B-1-1 と同様の hMSC を使用し、B-1-2 と同様の手順で RNAi による VSR 遺伝子のノックダウンを行った。

なお 2 ロット (A および H) について同様の実験を行った。

B-2-2 細胞培養

RNAi 開始 24 時間後の hMSC を 1×10^4 cell/well となるように 96 穴細胞培養プレート上に継代し、基本培地中で 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件下で 80%コンフルエントになるまで培養した。その後、以下に示す通常条件または擬似的虚血条件においてさらに 24 時間培養を行い、細胞および培養上清を回収した。

通常条件 (コントロール群)

- インキュベータ: 通常酸素濃度 (37°C 、 $5\%\text{CO}_2$; MCO-175 [SANYO])
- 培地: 無血清、グルコース (+) 4.5g/dL DMEM [GIBCO, Invitrogen, cat# 11965] + 100 unit/mL ペニシリン G + $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 硫酸ストレプトマイシン [GIBCO, Invitrogen]

擬似的虚血条件 (虚血群)

- インキュベータ: 酸素濃度 = 1.0% (37°C 、 $\text{N}_2:\text{O}_2:\text{CO}_2 = 94.0\% : 1.0\% : 5.0\%$; MCO-175M [SANYO])
- 培地: 無血清、グルコース (-) DMEM [GIBCO, Invitrogen, cat# 11966] + 100 unit/mL ペニシリン G + $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 硫酸ストレプトマイシン [GIBCO, Invitrogen]

B-2-3 虚血後における HIF1 α 感受性遺伝子発現量の測定

虚血応答性 VEGF 分泌における VSR6、7 遺伝子の制御に HIF の関与があるか検討するために、6 種類の HIF1 α 感受性遺伝子の発現量を測定する目的で、ABI Prism 7000 [Applied Biosystems] を用いて B-1-5 と同様に、定量的リアルタイム RT-PCR を行った。

なお、B-1-2 で回収した細胞を、B-1-4 と同様に Total RNA を抽出した後、RNA 濃度が $1\text{ng}/\mu\text{L}$ となるよう希釈し、未知サンプルとした。

また、HIF1 α 感受性遺伝子の発現検出用には、TaqMan プローブとプライマーの混合液である TaqMan Gene Expression Assay [Applied Biosystems] を用いた。測定した HIF1 α 感受性遺伝子と使用した TaqMan Gene Expression Assay を Table 6 に示す。

(倫理面への配慮)

Lonza 社の hMSC はヒト由来細胞であるが、提供者の同意を取り適切に細胞を採取していることが確認されている。このため国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会規程にある倫理審査該当品目ではなかった。

C. 研究結果

C-1 低酸素条件下での hMSC の VEGF 分泌における VSR6、7 遺伝子の影響

低酸素条件において VSR6、7 遺伝子を発現抑制することにより、hMSC による VEGF 分泌にどのような影響があるか検討した。

まず RNAi により VSR6、7 遺伝子が発現抑制されているかを確認するために、定量性リアルタイム RT-PCR でノックダウン効率を測定した。結果は VSR6 遺伝子においてはロット A が 26%、ロット C が 45%、ロット H が 37%であり、VSR7 遺伝子においてはロット A が 43%、ロット C が 48%、ロット H が 43%にまで発現が抑制された (Fig.5)。VSR6、7 遺伝子双方において有意な発現抑制が見られた。

VSR6、7 遺伝子発現抑制により、低酸素群の VEGF 分泌量にどのような変化が見られるか検討した。

ロット A について測定した結果、VSR6 遺伝子の発現抑制後、低酸素条件下においてネガティブコントロール群に比較して、VEGF 分泌の有意な増加が認められた。一方 VSR7 遺伝子の発現抑制後では、低酸素条件下においてネガティブコントロール群に比較して、VEGF 分泌の有意な減少が認められた (Fig.6)。

さらに、このことがロット間に共通であるか確認するために、ロット C および H でも検討した。その結果、両ロットで低酸素条件下において、ネガティブコントロール群に比較して、

VSR6 遺伝子の発現抑制後は VEGF 分泌の有意な増加が認められ、VSR7 遺伝子の発現抑制後は VEGF 分泌の有意な減少が認められた (Fig. 7 および 8)。

C-2 hMSC の VEGF 分泌における VSR6、7 遺伝子の制御メカニズム

hMSC の虚血応答性 VEGF 分泌に VSR6、7 遺伝子がどのように関与しているか解明する目的で、VSR6、7 遺伝子を発現抑制後、HIF1 α 感受性遺伝子発現量の変化を検討した。

まず VEGF 遺伝子では、ロット A のネガティブコントロール群を比較すると、これまで多くの報告にある通り、通常条件に比べ、虚血条件では VEGF 遺伝子の発現量が上昇した。VSR6 遺伝子を RNAi で発現抑制することにより、虚血条件下での VEGF 遺伝子発現量は、ネガティブコントロールに比べ増加した。一方 VSR7 遺伝子を発現抑制すると、虚血条件下での VEGF 遺伝子発現量は、ネガティブコントロールに比べ減少した (Fig.9)。同様の結果がロット H でも見られた (Fig.10)。

次に SERPINE 遺伝子の発現量を検討する。ロット A のネガティブコントロール群を比較すると、通常条件に比べ、虚血条件では SERPINE 遺伝子の発現量が上昇した。従って SERPINE 遺伝子も虚血感受性を持つ遺伝子であることが示唆される。そして虚血条件においては、ネガティブコントロールに比べ、VSR6 遺伝子を発現抑制することにより、SERPINE 遺伝子発現量は増加した。一方 VSR7 遺伝子を発現抑制すると、虚血条件下での SERPINE 遺伝子発現量は、ネガティブコントロールに比べ減少した (Fig.11)。同様の結果がロット H でも見られた (Fig.12)。

さらに PDGF β 遺伝子の発現量を検討する。同じくロット A のネガティブコントロール群を比較すると、通常条件に比べ、虚血条件では

PDGF β 遺伝子発現量が上昇した。従って PDGF β 遺伝子も虚血に感受性を持つ遺伝子であることが示唆される。虚血条件においては、ネガティブコントロールに比べ、VSR6 遺伝子を発現抑制することにより、PDGF β 遺伝子発現量は増加し、一方、VSR7 遺伝子を発現抑制すると、ネガティブコントロールに比べ、PDGF β 遺伝子発現量は減少した (Fig.13)。また、ロット H でも同様の結果が得られた (Fig.14)。

残る 3 種類の遺伝子 (ERO、TF、EDN1) については、ERO、TF はロット A、H 共に発現が見られなかったため、除外した。EDN1 は、ネガティブコントロールを比較した際、通常条件に比べ、虚血条件で発現量の減少が見られた。従って少なくとも本研究の条件下では、hMSC においては虚血 (ないし HIF1 α) 感受性遺伝子とは言えないため除外した。

D. 考察

D-1 低酸素条件下での hMSC の VEGF 分泌における VSR6、7 遺伝子の影響

今回着目した VSR6、7 遺伝子は以下のことが報告されている。

- i) VSR6 [endoplasmic reticulum aminopeptidase 2] は、アミノペプチダーゼをコードする遺伝子であり、小胞体内腔画分に可溶性タンパク質として存在することが報告されている。インターフェロンのによって誘発されていることが知られており、小胞体において抗原性のペプチド生成過程に関与していることが示唆されている。

VSR6 と同じファミリーに属する他のアミノペプチダーゼに関して、血管内皮前駆細胞を VEGF で刺激した際に発現が上昇することや、発現低下時に

においては VEGF 刺激による血管新生が阻害されることなどが報告されており、VSR6 についても VEGF 分泌に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

- ii) VSR7 [family with sequence similarity 101, member B] の機能についてはほとんど知られていない。しかし最近、この遺伝子の産物であるレフィリン B (refilin B) がフィラミン A (filamin A) に結合して核周囲のアクチンネットワーク形成に関与し、核の形状を制御することが報告されている。また、レフィリン B (VSR7 遺伝子産物) が結合するとされるフィラミン A のタンパク質発現は、肺がん組織において VEGF のタンパク質発現量と正の相関を示すことが別の報告で明らかにされている。

通常酸素濃度に比べ、低酸素濃度で hMSC を培養すると、一般に VEGF の分泌量は増加することが知られている。今回の実験においても、それぞれの細胞で同様な結果が得られた。そして RNAi を用いて VSR6 遺伝子を発現抑制すると、低酸素刺激による VEGF 分泌の有意な増加が見られた。一方、VSR7 遺伝子を発現抑制すると、低酸素刺激による VEGF 分泌の有意な減少が見られた。これらの結果は検証した 3 ロット全てで見られ、ロット間に共通することも確認された。VSR7 遺伝子に関しては、虚血条件下での VEGF 分泌の変化と同様の挙動を示した。従って、VSR7 遺伝子は虚血応答性 VEGF 分泌のみならず、低酸素応答性 VEGF 分泌にも関与していることが示唆される。さらに、虚血時と低酸素時で VSR7 遺伝子は同じ働きをしている可能性が高い。一方 VSR6 遺伝子については、低酸素応答性 VEGF

にむしろ抑制的であることが示唆される。
VSR6 遺伝子は、虚血条件下での VEGF 分泌の変化と逆の挙動を示し、虚血時と低酸素時では作用メカニズムが異なると考えられる。

そこで次に、hMSC の VEGF 分泌における VSR6、7 遺伝子の制御メカニズムについて検討した。

D-2 hMSC の VEGF 分泌における VSR6、7 遺伝子の制御メカニズム

HIF1 は細胞中で低酸素時に誘導される転写因子である。HIF1 α はその中の一つで、HIF1 β とヘテロ二量体を形成している。ヒトにおいては通常酸素状況下では、HIF1 α はプロリル 4 ヒドロキシダーゼによって、アミノ基末端側から 402 番目と 564 番目のプロリン残基がヒドロキシ化され、プロテアソーム分解される。つまり HIF1 α は通常酸素状況下でも産生されているが、速やかに分解されてしまうため、結果として発現量が少ない状態となる。一方、細胞が低酸素に陥るとプロテアソーム分解がされにくくなり、発現量が上昇する。上昇した HIF1 α は核内に移行し、HIF1 β と二量体を形成し、HIF1 結合配列 5'-(A/G)CGTG-3' を含む酸素応答性領域 (HRE : Hypoxia Responsive Element) に結合し、各種遺伝子の転写が促進される。

HIF1 α は直接あるいは間接的に様々な遺伝子の制御を行っており、その数は全体の 2% に及ぶと言われている。今回使用した 6 つの遺伝子についても、この HIF1 α によって転写制御されている遺伝子であることが知られている。HIF1 α 感受性遺伝子の各々の性質は以下の通りである。

- i) VEGF [vascular endothelial growth factor] は、胚形成や骨格の成長における生理的血管新生の調節因子として、

重要な役割を果たすことが知られている。また腫瘍、眼内血管新生性疾患などの病的血管新生にも関与し、薬の標的としても注目されている。

- ii) SERPINE [serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1] は、フィブリンを分解するプラスミンの生成に関係する組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) を阻害する働きがある。主に血管内皮細胞において産生され、血中へ分泌される。トロンビンやフィブリン塊、ヒスタミン、エンドトキシンに加え、インターロイキン-1、アンギオテンシン-II、血小板由来の成長因子などが、SERPINE の合成・分泌刺激因子であると報告されている。さらに、SERPINE 遺伝子の多型と冠動脈疾患の関連についても注目されている。
- iii) PDGF β [platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog)] は、A 鎖および B 鎖のジスルフィド結合より成る二量体分子であり、血管新生や胚形成、癌細胞の成長や進行に欠かせないタンパク質である。4 種類のアイソフォームが存在し、間葉系細胞の遊走、増殖において重要な制御因子となる。さらに、血管や繊維芽細胞では炎症、創傷治癒の過程において PDGF β の発現が上昇することが報告されている。また、アテローム性動脈硬化症や肺、腎の繊維増殖性疾患において PDGF やその受容体の過剰発現が確認され、密接な関係があると言われている。
- iv) EDN1 [endothelin 1] は、血管内皮細胞で合成、分泌される 21 残基ペプチド

であり、強力な血管収縮作用を有することが知られている。また心筋虚血時に分泌が増強され、癌原遺伝子やプロテインキナーゼ活性の増強、心筋における変力性、肥大の誘導などにも影響を与えることが示唆されている。

- v) EPO [erthropoietin] は糖タンパク質ホルモンであり、また産生において、唯一虚血による制御を受ける造血性増殖因子である。骨髓において赤血球前駆細胞の生存、増殖、分化を通して赤血球細胞の産生を調節する役割を持つ。
- vi) TF [transferrin] は血漿中に含まれるタンパク質の一種で、生物に必須の微量元素である鉄の輸送を行うことが知られている。鉄は、トランスフェリンと結合することで、細胞表面に発現しているトランスフェリン受容体からエンドサイトーシスにより細胞内に輸送される。

虚血条件下において、RNAi を用いて VSR7 遺伝子の発現抑制を行うと、ネガティブコントロールに比べ、SERPINE や PDGF β といった HIF1 α 感受性遺伝子発現量は減少した。また VEGF 遺伝子発現量も減少した。本研究の結果より、VSR7 遺伝子の発現抑制によって虚血応答性 VEGF 分泌、さらに低酸素応答性 VEGF 分泌が減少することが示されている。以上より、VSR7 遺伝子は、HIF の作用または発現を制御していると考えられる。つまり VSR7 遺伝子による VEGF (タンパク質) 分泌上昇のメカニズムは以下の通りであると予測できる。VSR7 遺伝子は、虚血および低酸素下において HIF の作用または発現を誘導し、それによって VEGF 遺伝子の転写が促進され、VEGF (タンパク質) 分泌が上昇する。また VSR7 遺伝子を発現抑制することで、HIF 誘導

が抑制され、VEGF 遺伝子の発現も減少し、虚血および低酸素下での VEGF (タンパク質) 分泌量が減少したと考えられる (Fig. 15)。

虚血条件下において RNAi を用いて VSR6 遺伝子の発現抑制を行うと、ネガティブコントロールに比べ、SERPINE や PDGF β といった HIF1 α 感受性遺伝子発現量は増加した。また VEGF 遺伝子発現量も増加した。しかし緒言に記載したように、VSR6 遺伝子を発現抑制することで虚血条件下における VEGF 分泌量は減少し、VSR6 遺伝子は虚血応答性 VEGF 分泌を誘導することが示唆されている。これらの結果から、HIF 発現により VEGF 遺伝子の転写が誘導され、その後 VEGF (タンパク質) が合成、分泌されるまでの過程において、虚血時における VSR6 遺伝子の優位な作用点は、1)VEGF 遺伝子転写以降、すなわち VEGF (タンパク質) の合成、あるいはその後の放出までの段階と、2)HIF である可能性が高い。つまり、VSR6 遺伝子は 1)VEGF 遺伝子転写以降の過程に対しては、誘導する働きを持ち、2)HIF に対しては、抑制的に働くと考えられる。そのため VSR6 遺伝子を発現抑制すると、1)VSR6 遺伝子による VEGF 遺伝子転写以降の誘導が抑制され、VEGF (タンパク質) 分泌量が減少する。また 2)上流の VEGF 遺伝子発現については、VSR6 遺伝子による HIF 発現の抑制がなくなるため、HIF の発現が増加し、VEGF 遺伝子の発現が増加すると考えられる (Fig. 15)。

一方、低酸素時においては、本研究の結果より VSR6 遺伝子を発現抑制すると、VEGF 分泌量は増加することが示されている。従って、低酸素時の VSR6 遺伝子の働きは、HIF に対する抑制のみである可能性が高い。そのため VSR6 遺伝子を発現抑制すると、HIF 発現の抑制がなくなり、HIF の発現量が増加し、それに伴って VEGF (タンパク質) の分泌も増加

すると考えられる (Fig. 15)。

E. 結論

医療の進歩が著しい現代においても、ライフスタイルの変化、高齢化などにより、依然として高血圧や冠動脈疾患の罹患率が高い。心血管疾患では、末期に心不全に陥る確率が高く、また予後が不良である。現在では、薬により、心室のリモデリングや心機能の低下を起こすことなく症状の改善を図ることが可能になり、治療は飛躍的に向上している。しかし、一部の患者は不可逆的な重症心不全へと移行する。幹細胞は様々な成熟細胞の起源細胞であり、自己複製能や多分化能を持つ。その幹細胞を心臓に移植し、心筋修復を図る再生医療が注目され、重症心不全の新たな治療法として確立されることが期待されている。

幹細胞の一つである MSC もまた多分化能を有し、組織修復、再生医療における重要な候補と考えられている。MSC は、虚血状態においても数日間生存可能であることが知られ、さらに虚血性心疾患に対してパラクリン効果により血管新生を行い、修復作用を示すことが報告されている。

これまでの研究により、MSC における心筋修復効果に VEGF が大きな役割を果たしていることが示唆され、また VEGF 分泌と正の相関を示し、MSC の VEGF 分泌能予測マーカーとなる遺伝子 (VSR6、7 遺伝子) が特定された。

本研究では、VSR 遺伝子の VEGF 分泌への関与は虚血条件のうち低酸素という条件に関与するのか、飢餓 (グルコース無添加) という条件に関与するのかを明らかにする目的で、RNAi を用いて VSR6、7 遺伝子を各々発現抑制後、酸素濃度 1%、グルコースありの低酸素条件下で hMSC を培養し、放出された VEGF 量を通常条件下と比較することで、低酸素条件

における VSR6、7 遺伝子の VEGF 分泌への影響を検討した。VEGF 分泌量は ELISA を用いて測定した。その結果、低酸素時の VEGF 分泌量は、VSR6 遺伝子を発現抑制することで有意に増加し、VSR7 遺伝子を発現抑制することで有意に減少することが明らかとなった。VSR7 遺伝子は、虚血応答性 VEGF 分泌だけでなく、低酸素応答性 VEGF 分泌にも影響を与えることが示唆された。

さらに、VSR6、7 遺伝子を発現抑制した細胞を用い、虚血 (低酸素) 時に誘導される HIF1 α に感受性を示す遺伝子の発現量を測定することで、VEGF 分泌に対する VSR6、7 遺伝子の制御機構を検討した。今回、遺伝子発現量が虚血 (低酸素) により上昇した HIF1 α 感受性遺伝子は VEGF、SERPINE、PEGF β の 3 つである。これらの遺伝子発現量は、VSR6 遺伝子を発現抑制することで増加し、VSR7 遺伝子を発現抑制することで減少する結果となった。以上より VSR6 遺伝子は、虚血時において、VEGF の合成、あるいはその後の VEGF 放出までの過程を誘導する働きと、HIF 抑制作用があり、低酸素時には、HIF 抑制作用のみであることが示唆された。そして VSR7 遺伝子は、HIF の作用または発現を促進することが示唆された。

本研究により、hMSC の虚血応答性 VEGF 分泌における VSR6、7 遺伝子の制御機構の一部が解明された。しかしまだ確証には至らず、今後さらに検討する必要がある。また今回 VSR7 遺伝子については、虚血応答性に加え、低酸素応答性 VEGF 分泌も誘導する働きを持つことが明らかとなった。しかし、VSR6 遺伝子については低酸素条件下での VEGF 分泌は、虚血条件下での VEGF 分泌と逆の挙動を示した。低酸素条件と虚血条件の違いは、グルコースの有無であり、グルコースが VSR6 遺伝子の VEGF 分泌制御に何かしら関与している可

能性が考えられる。高グルコースは、VEGF 産生や増加に影響を与えないとの報告があるが³⁴⁾、今後低グルコースと VSR6 遺伝子の関係についても検討する必要がある。

現在、VEGF や幹細胞を用いた臨床試験が、急性および慢性心不全を始め多くの心臓病で活発に行われている。また、MSC による臨床試験も進んでおり、将来心臓移植に代わる治療法となることが期待されている。しかし MSC による治療効果が、VEGF を単独投与するときに比べ、少量で現れるとの報告があり、同時に分泌される生理活性物質との相乗効果によることが示唆されているが、具体的な解明には至っておらず、今後検討が必要である。さらに、VEGF 分泌能の低い hMSC に対して分泌能を高める方法の確立、MSC の最適な投与方法、治療効果を得るために必要な細胞数の確保など課題は多い。これらの課題が一日も早く解決され、新たな治療法として確立されることが望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. 佐藤陽治, 黒田拓也 ヒト多能性幹細胞を使った再生医療・細胞治療における造腫瘍性試験の現状 *医学のあゆみ* 2011; 239:1460-5.
2. Nishioka K, Nishida M, Ariyoshi M, Jian Z, Saiki S, Hirano M, Nakaya M, Sato Y, Kita S, Iwamoto T, Hirano K, Inoue R, Kurose H. Cilostazol Suppresses Angiotensin II-induced Vasoconstriction via Protein Kinase A-mediated phosphorylation of TRPC6 channel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31:2278-86.
3. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する指針整備と主なポイント *再生医療* 2011; 10:206-10.
4. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト(自己)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案) —総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について— *再生医療* 2011; 10:211-8.
5. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案) —総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について— *再生医療* 2011; 10:219-26.
6. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト(自己) iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案) —総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について— *再生医療* 2011; 10:227-37.
7. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト(同種) iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案) —総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について— *再生医療* 2011; 10:238-48.
8. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案) —総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について— *再生医療* 2011; 10:249-60.
9. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案) —ヒト体性幹細胞, iPS(様)細胞又は ES 細胞を加工して製造される医薬品等(ヒト幹細胞加工医薬品等)の最終製品の品質管理— *再生医療* 2011; 10:261-6.
10. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案) —ヒト体性幹細胞, iPS(様)細胞又は ES 細胞を加工して製造される医薬品等(ヒト幹細胞加工医薬品等)の非臨床試験及び臨床試験について— *再生医療* 2011; 10:267-72.
11. Yasuda S, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Watanabe K, Ono K, Shimizu S, Hayakawa T, Yamaguchi T, Suzuki K, Sato Y. AW551984: a novel regulator of cardiomyogenesis from pluripotent embryonic cells. *Biochem J.* 2011;437:345-55.
12. Kitajima N, Watanabe K, Morimoto S, Sato Y, Kiyonaka S, Hoshijima M, Ikeda Y, Nakaya M, Ide T, Mori Y, Kurose H, Nishida M. TRPC3-mediated Ca^{2+} influx contributes to Rac1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;409:108-13.

G-2 学会発表

1. Kuramochi T, Satoh M, Atsuki H, Yasuda S, Hayakawa T, Suzuki K, Sato Y. Modes of action of genes facilitating ischemia-induced VEGF secretion in human mesenchymal stem cells. 第 85 回日本薬理学会年会, 京都 (2012 年 3 月 14-16 日)
2. 佐藤陽治 細胞治療・再生医療の規制の国際比較 第 12 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム, 東京 (2012 年 2 月 4 日)
3. Sato Y. Update on the Regulation and Development of Cell/Tissue-Based Products in Japan. 2011 International Convention of the Pharmaceutical Society of Korea, 仁川, 韓国 (2011 年 11 月 8 日)
4. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human stem cells. World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany (2011 年 11 月 2-4 日)
5. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human somatic stem cells. World Stem Cell Summit 2011, Pasadena, USA (2011 年 11 月 3-5 日)
6. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human pluripotent stem cells. World Stem Cell Summit 2011, Pasadena, USA (2011 年 11 月 3-5 日)
7. 佐藤陽治 ヒト iPS (様) 細胞を加工して製造される分化細胞の品質 第 1 回レギュラトリーサイエンス学会学術大会, 東京 (2011 年 9 月 3 日)
8. Sato Y, Atsuki H, Satoh M, Tanabe S, Yamaguchi T, Hayakawa T, Suzuki K. Identification of genes that regulate cardiomyogenesis in mouse embryonic cells. The 10th Annual Meeting of the International

Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011 年 6 月 15-18 日)

9. Yasuda S, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Yamaguchi T, Suzuki K, Sato Y. Genes associated with ischemia-induced VEGF secretion of human bone marrow mesenchymal stem cells. The 10th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011 年 6 月 15-18 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得 なし

H-2. 実用新案登録 なし

H-3. その他 特記事項なし

Table 1 本研究に用いられた hMSC のロット情報

ロット番号		年齢	性別	人種
in house	製造元			
A	4F1127	23	男	アフリカ系
C	5F0138	19	男	アフリカ系
H	4F0760	25	女	コーカサス系

Table 2 Stelth RNAi の配列

Gene	Name	Context	Strand
VSR6	HSS127432	GGGACCAACUCAUUACACAGCUGAA	Sense
		UUCAGCUGUGUAAUGAGUUGGUCCC	Antisense
VSR7	NM_182705_stelth_96	CCGAGCUCGUGGACGCGAAGAAGAA	Sense
		UUCUUCUUCGCGUCCACGAGCUCGG	Antisense

Table 3 TaqMan Gene Expression Assay の Assay ID

Gene	Product	Sequence or Assay ID
VSR6	TaqMan Gene Expression Assay	Hs01073633_m1
VSR7	TaqMan Gene Expression Assay	Hs00823804_m1
EEF1A1	TaqMan Gene Expression Assay	Hs00265885_g1

Table 4 VSR 遺伝子および EEF1A1 の RT-PCR 溶液調整方法

順序	試薬	最終濃度	1 反応あたりの試薬の用量
1	DEPC 処理済蒸留水		7.2 μ L
2	20 $\times$ TaqMan Gene Expression Assay	1 $\times$	1.5 μ L
3	2 $\times$ QuantiTect RT-PCR Master Mix	1 $\times$	15 μ L
4	2 $\times$ QuantiTect RT Mix	1 $\times$	0.30 μ L
Total (Mix Solution)			24 μ L/tube

Table 5 サーマルサイクラーの条件

	反応温度	反応時間	サイクル数
ステージ 1	50 $^{\circ}$ C	30min	1Cycle
ステージ 2	95 $^{\circ}$ C	15min	1Cycle
ステージ 3	94 $^{\circ}$ C	15sec	40Cycle
	60 $^{\circ}$ C	1min	

Table 6 HIF1 α 感受性遺伝子および TaqMan Gene Expression Assay の Assay ID

Gene	Product	Sequence or Assay ID
VEGF	TaqMan Gene Expression Assay	Hs00900055_m1
SERPINE	TaqMan Gene Expression Assay	Hs01126604_m1
PDGF β	TaqMan Gene Expression Assay	Hs00966522_m1
EDN1	TaqMan Gene Expression Assay	Hs00174961_m1
EPO	TaqMan Gene Expression Assay	Hs01071097_m1
TF	TaqMan Gene Expression Assay	Hs00169070_m1

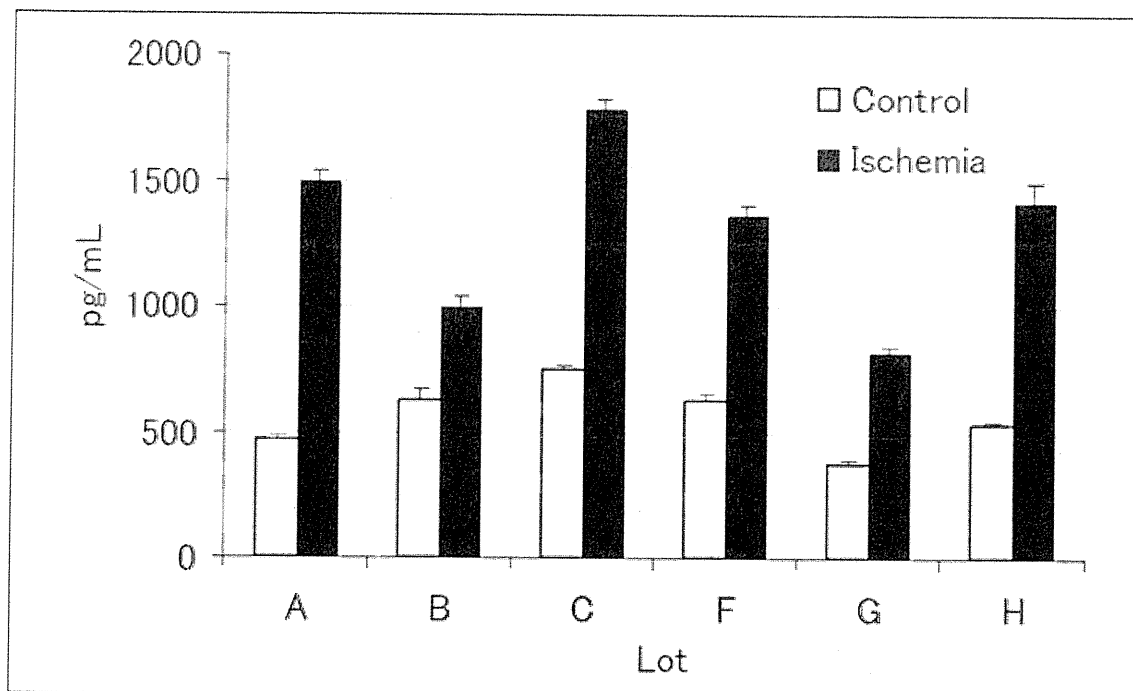


Fig.1 虚血後における hMSC の VEGF 分泌量変化

通常条件または擬似的虚血条件にて 24 時間培養し、回収した培養上清を用いて VEGF 分泌を検討した。縦軸は VEGF 濃度を示しており、横軸はロットを示している。two-way ANOVA によれば、VEGF 分泌量は、hMSC のロット間で有意な差が認められた ($p(\text{Lot}) < 0.05$)。また、虚血による有意な VEGF 分泌増加が認められた ($p(\text{Ischemia}) < 0.05$)。虚血とロットとの相互作用についても有意な差が認められ ($p(\text{Lot} \times \text{Ischemia}) < 0.05$)、虚血後の VEGF 分泌量にはロット間の差がみられたと同時に、6 ロット各々において虚血による VEGF 分泌量の有意な増加が認められた ($p < 0.05$, Student-Newman-Keul test)。[平均値 $\pm$ S.E.M. (n=5)] * $p < 0.05$ vs. Control group of each lot

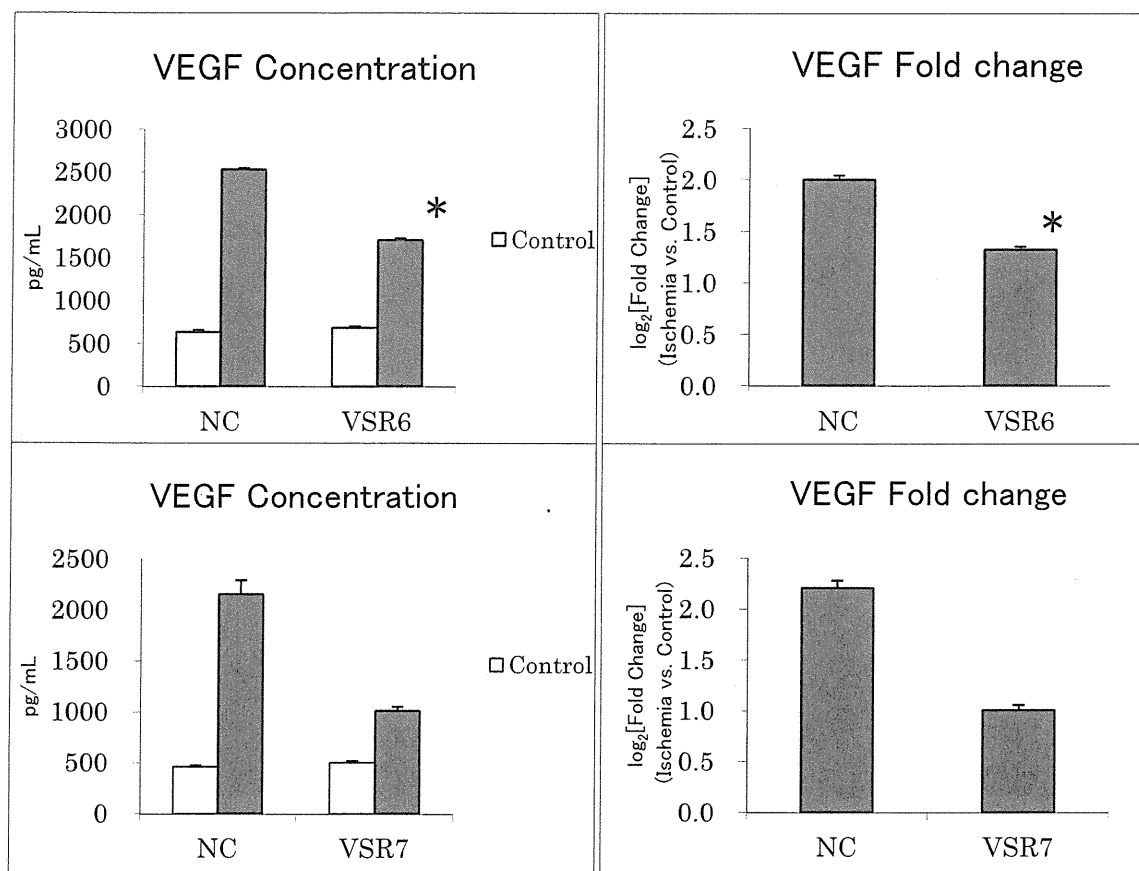


Fig.2 ロット A における VSR 遺伝子阻害後の VEGF 分泌変化

RNAi 24 時間後に継代した細胞を、通常条件または擬似的虚血条件にてさらに 24 時間培養し、回収した培養上清を用いて VEGF 分泌を検討した。縦軸は VEGF 濃度（左図）またはネガティブコントロール（NC）群の VEGF 濃度に対する RNAi 群の比率の対数（右図）を示しており、横軸は遺伝子を示している。VSR6 および VSR7 発現抑制後において、虚血後における VEGF 分泌量および分泌変化率の双方に有意な減少が認められた。〔平均値±SEM (n=5)〕 * $p < 0.05$ vs. NC-Ischemia (left panels) or NC (right panels)

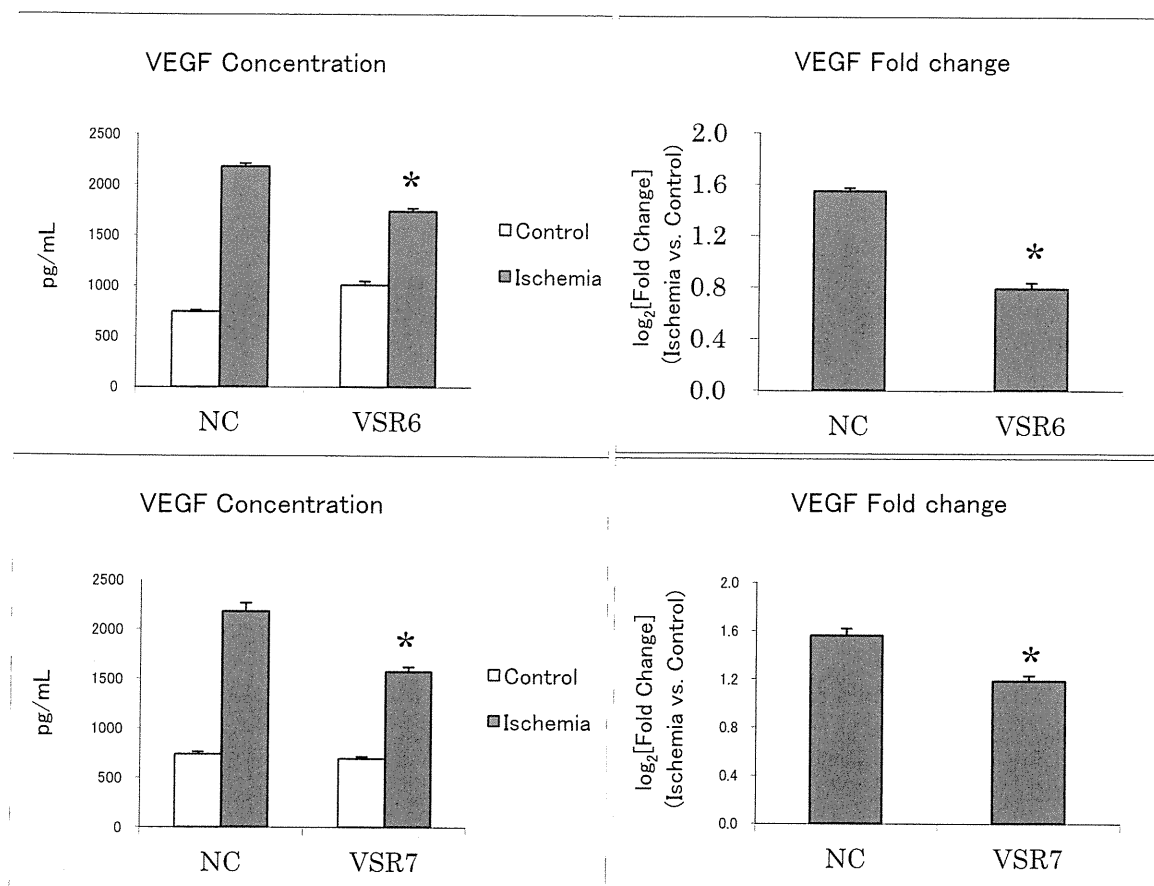


Fig.3 ロット C における VSR 遺伝子阻害後の VEGF 分泌変化

RNAi 24 時間後に継代した細胞を、通常条件または擬似的虚血条件にてさらに 24 時間培養し、回収した培養上清を用いて VEGF 分泌を検討した。

縦軸は VEGF 濃度（左図）またはネガティブコントロール（NC）群の VEGF 濃度に対する RNAi 群の比率の対数（右図）を示しており、横軸は遺伝子を示している。VSR6 および VSR7 発現抑制後において、虚血後における VEGF 分泌量および分泌変化率の双方に有意な減少が認められた。[平均値±SEM (n=5)] * $p < 0.05$ vs. NC-Ischemia (left panels) or NC (right panels)

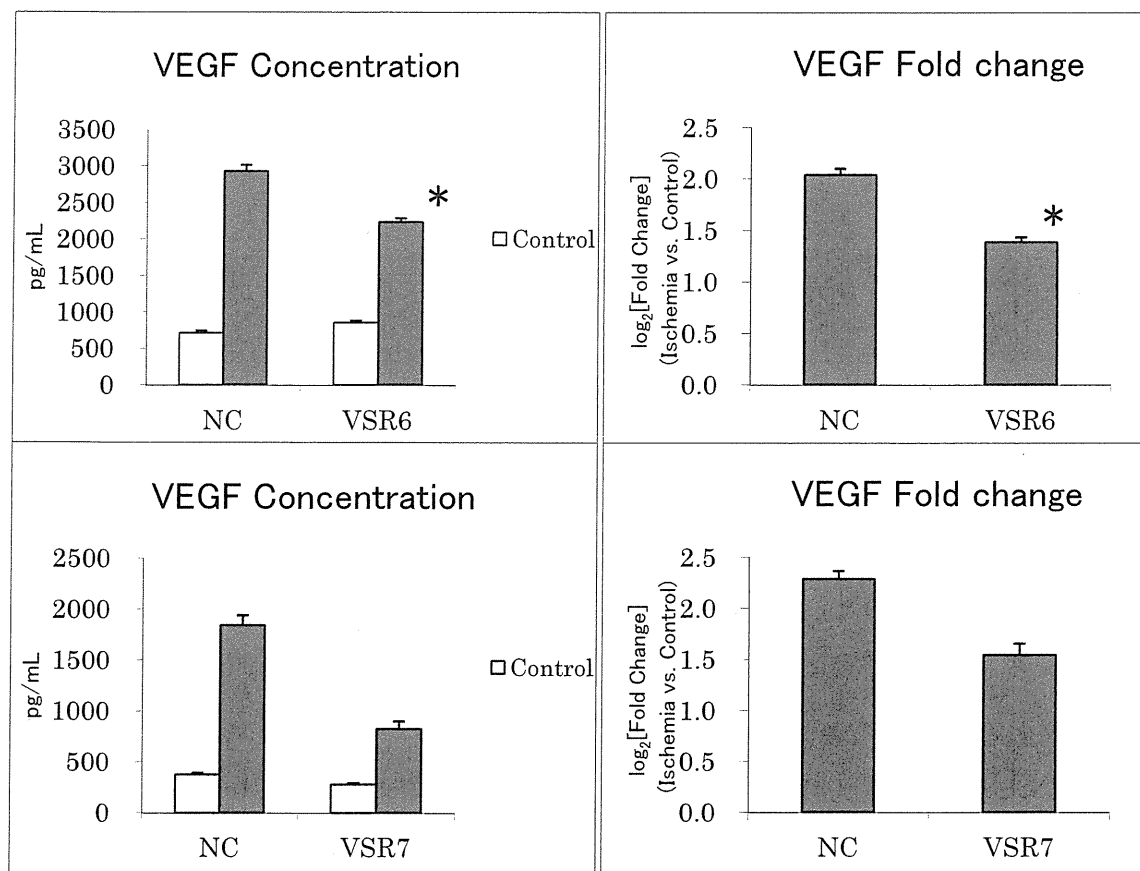


Fig.4 ロット H における VSR 遺伝子阻害後の VEGF 分泌変化

RNAi 24 時間後に継代した細胞を、通常条件または擬似的虚血条件にてさらに 24 時間培養し、回収した培養上清を用いて VEGF 分泌を検討した。

縦軸は VEGF 濃度（左図）またはネガティブコントロール（NC）群の VEGF 濃度に対する RNAi 群の比率の対数（右図）を示しており、横軸は遺伝子を示している。

VSR6 および VSR7 発現抑制後において、虚血後における VEGF 分泌量および分泌変化率の双方に有意な減少が認められた。〔平均値±SEM (n=5)〕

* $p < 0.05$ vs. NC-Ischemia (left panels) or NC (right panels)

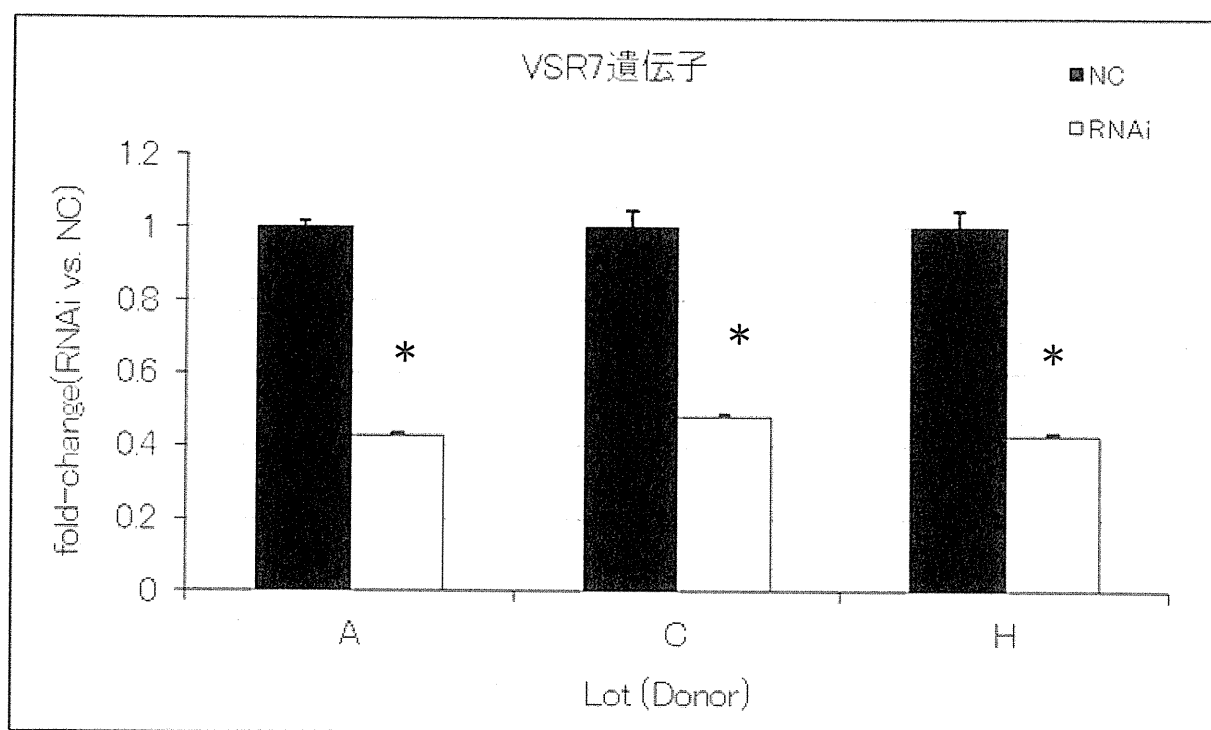
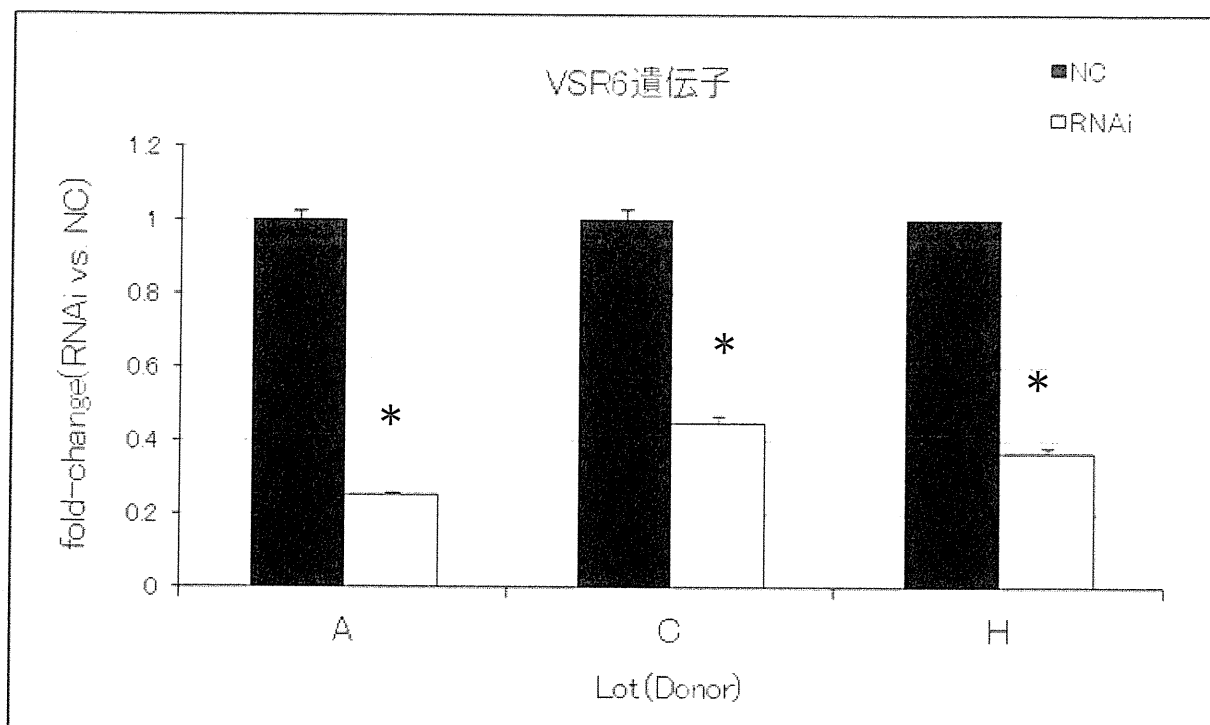


Fig.5 各ロットにおける VSR6、7 遺伝子のノックダウン効率

RNAi 24 時間後に回収した細胞より抽出した Total RNA を用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸は各ロットのネガティブコントロール (NC) 群の遺伝子発現量に対する RNAi 群の比率を示しており、横軸はロットを示している。3 ロット全てで有意な発現の抑制が見られた。[平均値±SEM (n=3)] * $p < 0.05$ vs. NC

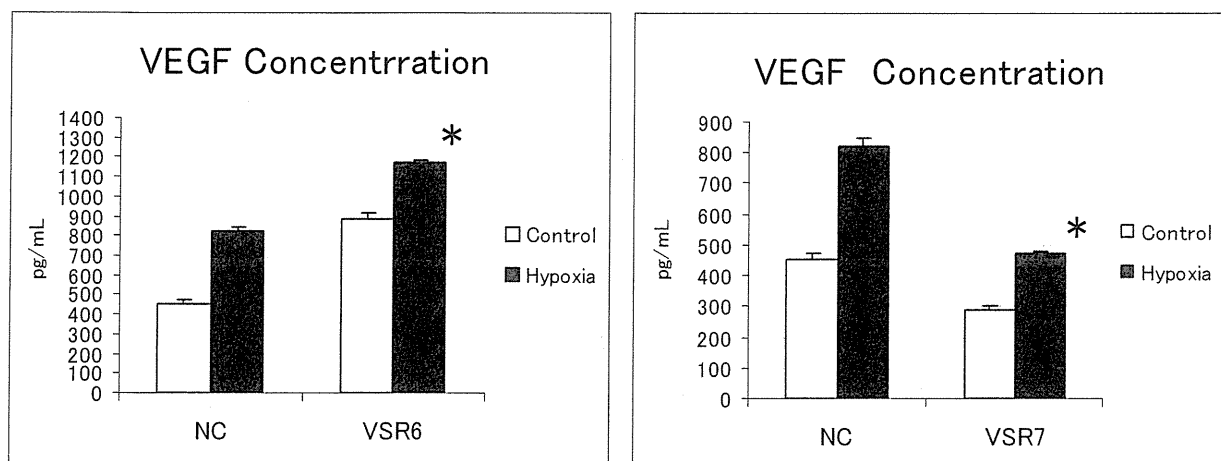


Fig.6 ロット A における VSR 遺伝子阻害後の VEGF 分泌量の変化

RNAi 24 時間後に継代した細胞を、通常条件または低酸素条件にてさらに 24 時間培養し、回収した培養上清を用いて VEGF 分泌を検討した。

縦軸は VEGF 濃度を示しており、横軸は遺伝子を示している。

VSR6 遺伝子発現抑制によって低酸素下での VEGF 分泌量は有意な増加が見られ、VSR7 遺伝子発現抑制によって低酸素下での VEGF 分泌量は有意な減少が見られた。〔平均値±SEM (n=5)〕

* $p < 0.05$ vs. NC-Hypoxia

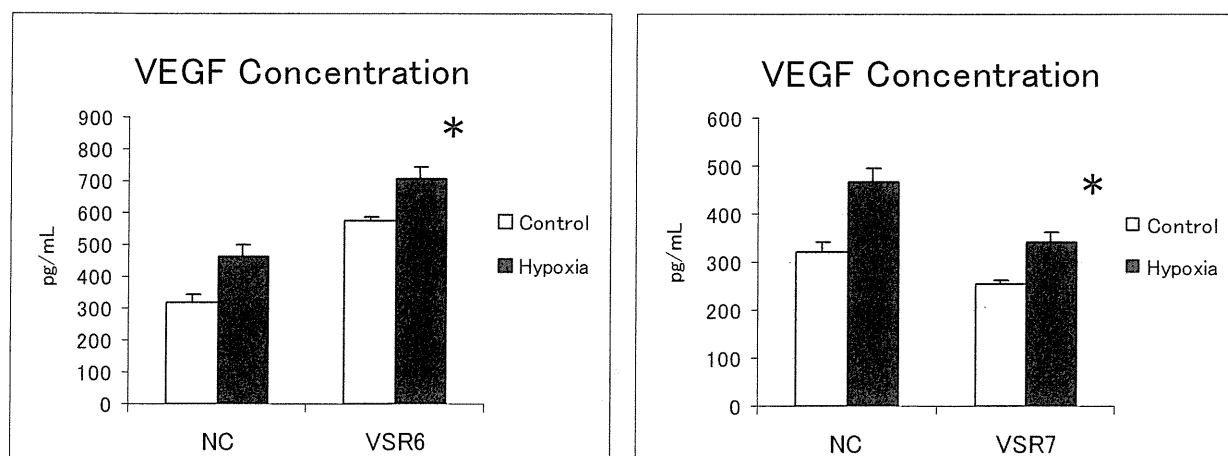


Fig.7 ロット C における VSR 遺伝子阻害後の VEGF 分泌量の変化

RNAi 24 時間後に継代した細胞を、通常条件または低酸素条件にてさらに 24 時間培養し、回収した培養上清を用いて VEGF 分泌を検討した。

縦軸は VEGF 濃度を示しており、横軸は遺伝子を示している。

VSR6 遺伝子発現抑制によって低酸素下での VEGF 分泌量は有意な増加が見られ、VSR7 遺伝子発現抑制によって低酸素下での VEGF 分泌量は有意な減少が見られた。〔平均値±SEM (n=5)〕

* $p < 0.05$ vs. NC-Hypoxia