

論文の内容の要旨

論文題目 Impaired development and dysfunction of endothelial progenitor cells in type 2 diabetic mice, assessed using a new mouse endothelial progenitor cell colony-forming assay

(新規マウス血管内皮前駆細胞コロニーフォーミングアッセイを用いた
2型糖尿病マウスにおける血管内皮前駆細胞の分化能及び機能解析)

氏名 塚田 信津

【序論】

血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC) は骨髄において造血幹細胞から分化・増殖後、末梢血中を循環し、障害組織に遊走・定着することで、血管形成や虚血組織の修復に重要な役割を担っている。EPC には様々な分化段階が存在し、血管形成や虚血組織の修復には EPC の数のみならずコロニー形成能が重要であることから、異なる分化段階にある EPC のコロニー形成能を評価することができる評価系が求められている。そこで本研究では、異なる分化段階にある EPC のコロニー形成能を評価することができるコロニーフォーミングアッセイ法をマウス EPC において確立し、下肢虚血モデルマウスを用いて、異なる分化段階にある EPC の *in vivo* における役割を明確にすることを目的とした。

また、様々な虚血性疾患において EPC の関与が報告されており、下肢虚血疾患や難治性潰瘍などの患者の虚血組織に自家 EPC を移植する細胞治療が臨床応用されている。しかし、老化や糖尿病等の基礎疾患により患者の EPC 量及び質が低下し、移植後に十分な治療効果が得られない問題もある。特に、糖尿病患者では健常人に比べて末梢血中を循環する EPC の数及び機能が低下しており、細小血管障害の悪化に関与しているとの報告がなされているものの、実際の EPC の状態、分化能及び機能低下メカニズムが解明されていない。そこで、本研究では、EPC コロニーフォーミングアッセイを用いて、2型糖尿病マウスにおける骨髄細胞の特性解析及び EPC への分化能や機能を評価することを第二の目的とした。また、糖尿病合併症の悪化にはマクロファージの機能変化を含む炎症反応の増大が関与していることから、2型糖尿病マウスにおける骨髄細胞から顆粒球マクロファージへの分化能も同時に評価した。

【方法・結果・考察】

1. マウス EPC コロニーフォーミングアッセイ法の確立

EPC コロニーフォーミングアッセイ法の検討では、C57BL/6J マウス (雄、8-10 週齢) から末梢血単核球、骨髓単核球及び骨髓細胞 KSL 画分 (c-Kit+/Sca-1+ lineage negative 画分) を単離し、メチルセルロース培地 MethoCult SF M3236 (SCF、VEGF、IL-3、bFGF、EGFR、IGF-1、heparin、10% FBS を含む) で培養した。培養 8 日後、各種細胞は分化して、形態的に異なる細胞から構成された 2 種類の EPC コロニーフォーミングユニットを形成し、紡錘形細胞群を large-EPC-colony forming unit (CFU)、円形細胞群を small-EPC-CFU と定義した (図 1 A-C)。両 EPC-CFU は酸化 LDL の取り込み及びレクチンによる染色から、EPC であることが確認された (図 1 D)。評価方法として、培養後に顕微鏡下で各 EPC-CFU を形態的に判別して計測することで、EPC の分化能及びコロニー形成能を評価することが可能となった。次に、

large-EPC 及び small-EPC の機能の違いを検討するため、それぞれを単離して解析を行った。RT-PCR により血管内皮細胞のマーカー遺伝子の発現を評価したところ、eNOS、Flk-1 及び

VE-cadherin の発現が確認され、large-EPC 及び small-EPC は血管内皮細胞の分化系列であることが示された。また、BrdU 取り込みによる増殖能評価と接着能評価及び内皮細胞との共培養による管腔形成能評価を行ったところ、large-EPC と small-EPC は異なる性質を有していた。large-EPC は small-EPC に比べて増殖能は低いものの、接着能及び管腔形成能が高いことから機能的な EPC であることが示された。一方、small-EPC は増殖能が高く、2 次培養により large-EPC へと分化したことから、分化初期の EPC であることが示された。さらに、large-EPC と small-EPC の *in vivo* における機能を明らかにするため、下肢虚血マウスを用いて評価を行った。下肢虚血処置後のマウスから末梢血単核球及び骨髓細胞を採取し、EPC コロニーフォーミングアッセイを行ったところ、下肢虚血刺激により末梢血単核球及び骨髓細胞から large-EPC-CFU への分化が促進された。この結果から、*in vivo* における下肢虚血刺激は EPC への分化を促進することが明らかとなり、large-EPC は虚血に対する修復機構に即効的に必要とされる機能的 EPC であることが示唆された。また、下肢虚血マウスの下肢虚血

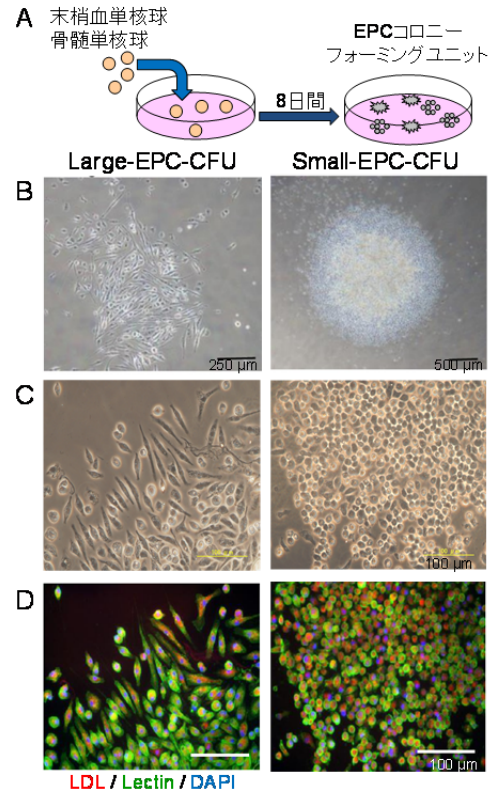


図 1. EPC コロニーフォーミングユニット
A. EPC コロニーフォーミングアッセイの概図。
B-C. EPC コロニーフォーミングユニットの透過像。
D. EPC コロニーフォーミングユニットの蛍光像。

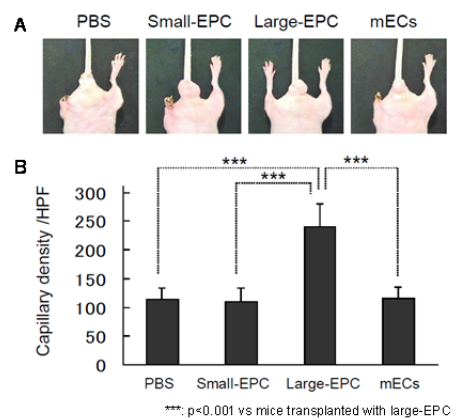


図 2. Small-EPC 及び large-EPC の下肢虚血マウスへの移植効果

A. 移植 28 日後の下肢虚血マウスの下肢の状態。 B. 移植マウスの下肢筋組織中の血管密度。

部位に large-EPC 又は small-EPC を移植すると、対照群及び small-EPC 移植群では変化がなかったのに対し、large-EPC 移植群では血流改善及び下肢筋組織中の血管数増加が示され、虚血組織の修復作用が認められた (図 2)。以上の結果から、マウス EPC コロニーフォーミングアッセイにおいて分化段階の異なる EPC のコロニー形成能を評価することが可能となり、本評価系で培養される large-EPC は分化後期の機能的 EPC であり、虚血性疾患における虚血組織の回復に重要な役割を担っていることが示された。(図 3)

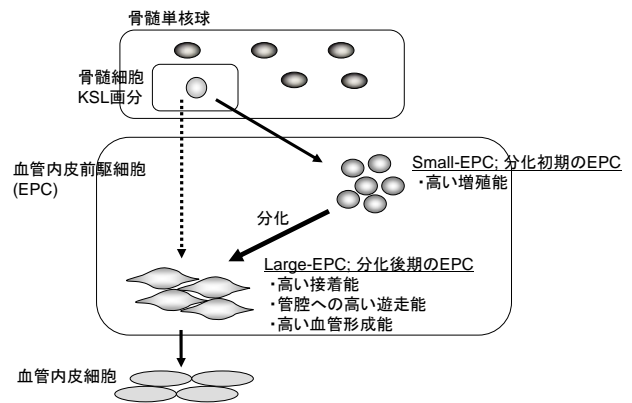


図 3. EPC コロニーフォーミングアッセイにおける EPC 分化の概図
EPC は分化段階の異なる 2 種類の EPC に分類された。Small-EPC は large-EPC へと分化しうる分化初期の EPC。Large-EPC は接着能及び管腔形成能をもつ分化後期の機能的 EPC。

2. 2 型糖尿病マウスにおける EPC の分化能及び機能解析

上記で確立した EPC コロニーフォーミングアッセイを用いて、2 型糖尿病モデルマウス (*db/db* マウス及び *KKAy* マウス) における EPC の分化能及び機能解析を行った。2 型糖尿病マウスの骨髓細胞について、幹細胞 (KSL 画分: *c-Kit*+/*Sca-1*+ lineage negative) の割合及び BrdU 取り込みによる増殖能をフローサイトメトリーを用いて評価したところ、2 型糖尿病マウスでは幹細胞である KSL 画分の増殖能が低下しており、骨髓細胞中の KSL 画分の割合が減少した。EPC コロニーフォーミングアッセイにおいて分化能を評価したところ、2 型糖尿病マウスの骨髓細胞 KSL 画分では分化後期の機能的 EPC である large-EPC-CFU への分化能が低下した (図 4 A)。末梢血単核球の分化能についても同様の結果が得られた。また、EPC への分化能が高い画分である CD34 陽性細胞の割合をフローサイトメトリーを用いて評価したところ、2 型糖尿病マウスの骨髓細胞 KSL 画分において、CD34 陽性細胞の割合が減少した。この結果から、2 型糖尿病マウスにおける骨髓細胞 KSL 画分から large-EPC-CFU への分化能低下の 1 つの原因として、KSL 画分における CD34 陽性細胞の減少が示唆された。さらに、骨髓細胞 KSL 画分は EPC や造血細胞などの様々な系列の細胞に分化することができる幹細胞であることから、糖尿病マウスにおける幹細胞の分化傾向を明らかに

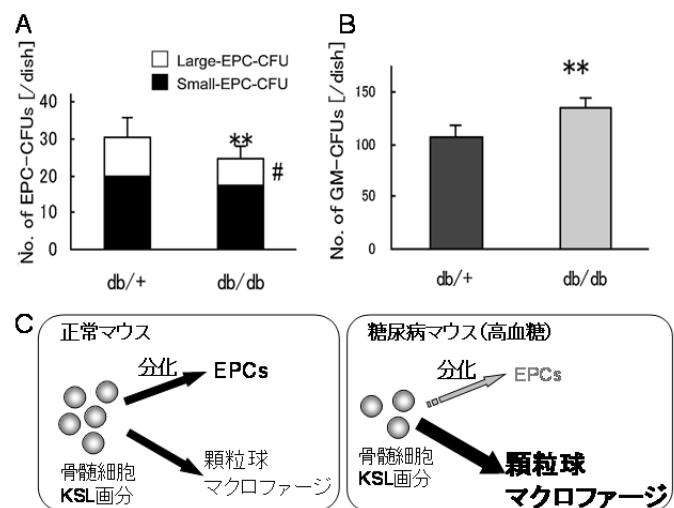


図 4. 2 型糖尿病マウスの骨髓細胞 KSL 画分における EPC 及び顆粒球マクロファージのコロニー形成能
A. EPC コロニーフォーミングアッセイにおける EPC-CFU 形成数。B. 造血前駆細胞コロニーフォーミングアッセイにおける顆粒球マクロファージコロニー形成数。C. 糖尿病マウスにおける骨髓細胞 KSL 画分から EPC 及び顆粒球マクロファージへの分化制御機構の概図。

かにするため、EPC コロニーフォーミングアッセイと同時に造血前駆細胞コロニーフォーミングアッセイを行った。その結果、2型糖尿病マウスの骨髄細胞 KSL 画分において顆粒球マクロファージへの分化能が亢進していることが示された (図 4 B)。以上の結果から、2型糖尿病マウスでは、骨髄細胞の KSL 画分が減少することに加え、EPC への分化能が低下する一方で、顆粒球マクロファージへの分化能が亢進していることが示された。2型糖尿病では EPC や顆粒球マクロファージへの分化に関して抑制と促進という逆の制御があることが示唆された (図 4 C)。

【結語】

本研究において、分化段階の異なる EPC のコロニー形成能を評価できるマウス EPC コロニーフォーミングアッセイ法を確立した。また、本評価系において形成される large-EPC-CFU は small-EPC-CFU に比べてより成熟した機能的 EPC であり、虚血性疾患における虚血組織の回復に重要な役割を担っていることが示された。本評価系を用いて分化初期の EPC (small-EPC-CFU) から分化後期の機能的 EPC (large-EPC-CFU) への EPC 分化の分子メカニズムが解明されることにより、EPC を用いた細胞治療における質的・量的課題を解決することが可能になると考えられた。さらに、本評価系を用いて、2型糖尿病マウスでは分化後期 EPC のコロニー形成能が低下することが明らかとなり、骨髄細胞 KSL 画分から EPC や顆粒球マクロファージへの分化に関して抑制と促進という逆の制御があることが示唆された。本研究の成果は、血管障害及び虚血性疾患の患者における EPC 機能低下のメカニズムの解明や、骨髄細胞及び EPC の機能を回復させる治療薬の開発に有用な知見となると考えられた。