

審査の結果の要旨

氏名 塚田信津

論文題目: 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

【背景と目的】

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 が関与することが報告されており、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の臨床応用が行われている。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法を用いて、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】

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、骨髄細胞単核球及び骨髄細胞 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 (SCF、VEGF、IL-3、bFGF、EGFR、IGF-1、heparin、10% FBS を含む) で培養した。培養 8 日後、各種細胞は形態的に異なる 2 種類の EPC コロニーフォーミングユニット (紡錘形細胞群: large-EPC-colony forming unit (CFU) 及び円形細胞群: small-EPC-CFU) を形成し、それぞれを単離した。large-EPC 及び small-EPC について、EPC のマーカーによる染色、血管内皮細胞のマーカー遺伝子の発現評価、EPC の分化能、接着能及び BrdU 取り込みによる増殖能評価を行った。さらに、下肢虚血モデルマウスを用いて下肢虚血刺激による *in vitro* での EPC 分化能評価、及び下肢虚血部位へ各 EPC を移植することによる *in vivo* 機能評価を行った。また、2 型糖尿病における骨髄細胞の特性解析及び EPC への分化

能評価では、2 型糖尿病モデルマウスである *db/db* マウス及び *KKAy* マウスを用いた。フローサイトメトリー解析による骨髓細胞の幹細胞比率 (c-Kit+/Sca-1+ lineage negative 及び CD34+) や BrdU 取り込みによる増殖能評価、EPC コロニーフォーミングアッセイによる EPC 分化能評価、さらに造血前駆細胞コロニーフォーミングアッセイによる顆粒球マクロファージへの分化能評価を行った。

【結果と考察】

マウス EPC コロニーフォーミングアッセイにおいて、末梢血単核球、骨髓細胞単核球及び骨髓細胞 KSL 画分は分化して 2 種類の EPC コロニーフォーミングユニット (large-EPC-CFU 及び small-EPC-CFU) を形成した。large-EPC-CFU と small-EPC-CFU はそれぞれ紡錘形の細胞と円形の細胞から構成され、酸化 LDL の取り込み及び lectin による染色から、共に EPC であることが確認された。また、2 種類の EPC は血管内皮細胞のマーカである eNOS や Flk-1 及び VE-cadherin を発現した。large-EPC と small-EPC の機能を解析したところ、large-EPC は small-EPC に比べて増殖能は低い、接着能が高く、内皮細胞の管腔形成を促進した。一方、small-EPC はより未分化な細胞群である KSL 画分の割合が高く、2 次培養により large-EPC へと分化したことから、small-EPC は分化初期の EPC であり、large-EPC は分化後期のより成熟した EPC であることが示された。下肢虚血モデルマウスを用いた実験において、下肢虚血刺激により末梢血単核球及び骨髓細胞の large-EPC-CFU への分化が促進された。また、下肢虚血モデルマウスの下肢虚血部位に large-EPC 又は small-EPC を移植すると、large-EPC 移植群でのみ血流が改善し血管形成が促進された。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 small-EPC 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。(図1)

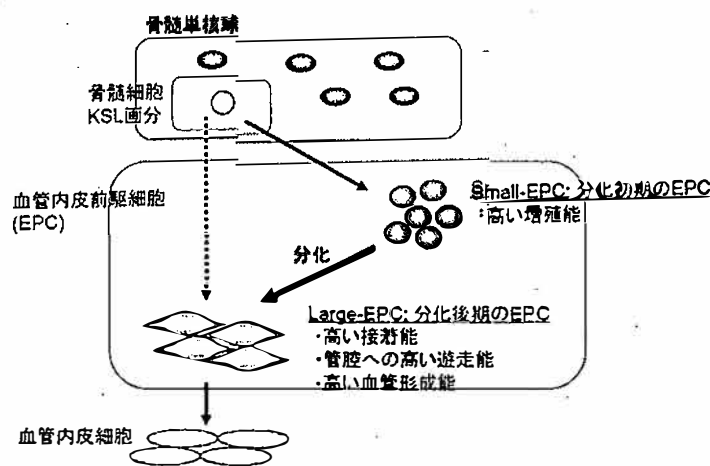


図1 EPC コロニーフォーミングアッセイにおけるEPC 分化の概図

次に、2 型糖尿病モデルマウス (*db/db* マウス及び *KKAy* マウス) における骨髓細胞の特性解析

及びEPC や顆粒球マクロファージへの分化能評価を行った。2 型糖尿病マウスの骨髄細胞において EPC の幹細胞となる KSL 画分の増殖能が低下しており、KSL 画分の減少が示された。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髄細胞 KSL 画分では成熟した機能的 EPC である large- EPC- CFU への分化能が低下した。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、2 型糖尿病マウスの骨髄細胞 KSL 画分において CD34 陽性細胞の割合が減少した。CD34 陽性細胞は EPC への分化能が高いことから、2 型糖尿病マウスにおける骨髄細胞 KSL 画分から large-EPC- CFU への分化能低下の原因の 1 つとして KSL 画分における CD34 陽性細胞の減少が示唆された。さらに、造血前駆細胞コロニーフォーミングアッセイにおける解析から、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。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。

【結語】

本研究では、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、本アッセイ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いて質的・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 EPC のコロニー形成能が低下することが明らかとなり、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。以上より、本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。