

## 論文の内容の要旨

論文題目 機械的血管傷害後の新生内膜形成における  
骨髄由来前駆細胞の関与の多様性

指導教員 永井 良三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月 1 日 入学

医学博士課程

循環器内科学専攻

氏名 田中 君枝

### 背景

虚血性心疾患は主要な致命的疾患のひとつである。虚血性心疾患は主に動脈硬化が原因となり発症する。動脈硬化においては、粥腫とよばれる隆起物が血管の内腔を狭窄する。粥腫の中心部は脂質コアと呼ばれ、macrophage や泡沫細胞、cholesterol の沈着が認められる。その周辺には、平滑筋細胞が存在し、細胞外基質や cytokine を合成、放出して動脈硬化の病態生理に重要な役割を担っている。カテーテル治療やバイパス手術など、虚血性心疾患に対する治療は、血行再建後の再狭窄が問題となることが多い。再狭窄の原因は合成型平滑筋細胞の過形成による内腔狭窄と考えられる。この平滑筋細胞の起源については不明であるが、現在は Ross の仮説が広く受け入れられており、血管中膜の平滑筋細胞の遊走および増殖が、新生内膜の平滑筋細胞の由来であると考えられている。しかし、この仮説のみでは説明できない点もある。

近年、成人の組織中に、様々な細胞に分化する能力を持つ多能性幹細胞が存在すると報告された。佐田らは、骨髄由来前駆細胞が傷害血管の新生内膜形成に関与することを報告し、他グループからも、グラフト再狭窄、血管形成術後再狭窄、高脂血症関連動脈硬化病変などの動物モデルにおいて、骨髄由来前駆細胞の関与を認めたとする多数の論文が発表された。

一方、成人の幹細胞の、生理的な状況下の生体内での多能性を疑問視する意見も認められ、新生内膜形成においても、骨髄由来前駆細胞は関与しないという内容の論文が複数報告された。このような論文を検討したところ、それぞれの論文で様々な血管傷害モデルを用いており、それが相反する結果をもたらす一因になっているのではないかと考えられた。

そこで本研究では、血管傷害モデルの相違により、骨髄由来前駆細胞の新生内膜形成への関与に相違があるかどうかを検討した。

#### 実験方法

骨髄移植により、野生型マウスまたは ApoE knockout mouse(ApoE<sup>-/-</sup>マウス)の骨髄細胞を、全組織に LacZ 蛋白 ( $\beta$ -galactosidase) や緑色蛍光蛋白(green fluorescent protein, GFP)など marker となる蛋白を発現する遺伝子改変マウス (LacZ マウス、GFP マウス)の骨髄細胞で置換した。この骨髄移植マウスの、同一マウス中の3ヵ所の血管に、3種類の血管傷害モデルを作成した。左大腿動脈には、ワイヤーを挿入し、内皮剥離と血管過拡張による傷害モデル (ワイヤー傷害) を作成した。右大腿動脈には、血管周囲にポリエチレンチューブを留置する傷害モデル (カフ傷害) を作成した。左総頸動脈は内頸動脈と外頸動脈の分岐部直前を結紮して、血流遮断による傷害モデルを作成した。傷害作成後4週間で血管を摘出し、免疫組織化学的解析及び電子顕微鏡による観察を施行した。

#### 結果

傷害モデルを作成した血管では、3種類の傷害すべてにおいて、新生内膜の形成を認めた。GFP マウスの骨髄を野生型マウスに移植したモデル(BMT<sup>GFP→ApoE<sup>-/-</sup></sup>)において、ワイヤー傷害では、新生内膜と中膜に多数の GFP 細胞を認めた。(新生内膜の全細胞の 38.9±5.8%、中膜の全細胞の 61.4±5.8%、n=4) これらの GFP 細胞のうち多数 (新生内膜: 26.6±6.4%、中膜: 35.4±9.6%)が血管平滑筋の marker である  $\alpha$ - smooth muscle actin( $\alpha$ -SMA) を発現していた。

カフ傷害にも大部分平滑筋細胞からなる新生内膜が形成された。しかし、GFP 細胞は少数であった。(新生内膜: 7.0±2.1%、中膜: 15.1±2.2%) GFP 細胞の中には、 $\alpha$ -SMA を発現している細胞も認められた。血流遮断による傷害でも、 $\alpha$ -SMA 陽性細胞からなる新生内膜を認め、病変には GFP 細胞を認めた (新生内膜: 24.1±5.3%、中膜: 33.1±2.2%) が、 $\alpha$ -SMA を発現している細胞はごく少数であった。

LacZ マウスの骨髄細胞を野生型マウスに移植したモデル(BMT<sup>LacZ→Wild</sup>)においても同様に、ワイヤー傷害では、多数の LacZ 細胞(新生内膜: 56.3±7.8%、中膜: 54.3±8.0%)を認めた。(n=5) LacZ 細胞のうち多数の細胞は  $\alpha$ -SMA を発現していた。カフ傷害では、新生内膜には LacZ 細胞はあまり認められなかったが、外膜に集積した多数の炎症細胞は LacZ を発現していた。血流遮断による傷害では、LacZ 細胞は新生内膜にごく少数のみ認められた。

ワイヤー傷害後の新生内膜に認められた骨髄由来細胞の性質を、BMT<sup>GFP→ApoE<sup>-/-</sup></sup>マウスおよび BMT<sup>LacZ→Wild</sup>マウスを用いて検討した。新生内膜の管腔側にある骨髄由来細胞は、血管内皮細胞 marker( BS-lectin, CD31, VWF)を発現しており、内皮細胞様に分化していると考えられた。BMT<sup>GFP→ApoE<sup>-/-</sup></sup>マウスでは、VWF 陽性細胞のうち 42.9±8.5%が GFP 陽性であった。また新生内膜では、大多数の骨髄由来細胞が  $\alpha$ -SMA を発現していた。また、電子顕微鏡による観察において

も、BMT<sup>LacZ→Wild</sup>マウスの新生内膜において、平滑筋細胞様の形態をとる LacZ 細胞が確認できた。これらの結果より、骨髄由来前駆細胞は、ワイヤー傷害後の新生内膜形成において、血管を構成する細胞に分化している可能性が示唆された。

次に骨髄由来  $\alpha$ -SMA 陽性細胞の特徴をさらに検討した。BMT<sup>LacZ→Wild</sup>マウスのワイヤー傷害において、半数以上の骨髄由来細胞は  $\alpha$ -SMA を発現するが、分化型血管平滑筋細胞の marker である血管平滑筋 myosin を発現する細胞はほとんど認められなかった。これより、新生内膜中の  $\alpha$ -SMA 陽性骨髄由来細胞は、成熟な平滑筋細胞にまでは分化していないものと考えられる。

さらに、傷害の違いによる骨髄由来前駆細胞の新生内膜形成に対する関与の相違のメカニズムを解明するため、傷害後の血管壁の変化を観察した(n=3)。野生型マウスの3ヵ所の血管に3種類の傷害を作成し6時間後に摘出して paraffin 包埋後薄切し、TUNEL 染色にて apoptosis を観察した。ワイヤー傷害では、内皮細胞剥離と中膜の著明な拡張を認め、中膜細胞の広範囲な apoptosis が観察された。ほとんどの  $\alpha$ -SMA 陽性平滑筋細胞は傷害により消失していた。カフ傷害では、中膜細胞の  $39.1 \pm 9.9\%$  が apoptosis を起こしていた。しかし、中膜の壁厚は保たれており、中膜の管腔側には、内皮細胞層が残存していた。血流遮断による傷害では、内皮細胞層と中膜はほぼ保たれており、わずかな apoptosis 細胞しか認められなかった( $0.3 \pm 0.3\%$ )。

また、血管傷害後の炎症細胞の集積も観察した。BMT<sup>LacZ→Wild</sup>マウスに血管傷害作成後4週間の血管に、抗 macrophage 抗体を用いて免疫染色を施行した(n=4)。Macrophage の集積は3つの血管傷害モデルのいずれでも認められたが、特に、カフ傷害の外膜に多数の集積を認めた。ワイヤー傷害や血流遮断による傷害では、集積した macrophage は少数であった。

ワイヤー傷害1週間後に chemokine、cytokine の発現を観察したところ、MCP-1、SDF-1、VEGF の発現を認めた。カフ傷害では、これらの発現を外膜にのみ認め、血流遮断による傷害では、中膜管腔側にわずかに認められた。

## 考察

この研究では、GFP や LacZ など marker となる蛋白を発現する細胞で骨髄を置換したマウスに、3種類の異なる機械的血管傷害を作成して、骨髄由来前駆細胞の傷害血管への関与の相違を検討した。ワイヤー傷害は、ヒトの冠動脈形成術後を最もよく再現するモデルであると考えられる。カフ傷害、血流遮断による傷害は、内皮細胞や中膜に直接には傷害を与えない、緩徐な傷害である。

ワイヤー傷害では、多数の骨髄由来前駆細胞が新生内膜や中膜に認められたが、カフ傷害ではほとんど認められなかった。血流遮断による傷害では、新生内膜と中膜に少数のみ認められた。このように、血管傷害後の新生内膜形成における骨髄由来前駆細胞の関与は、傷害モデルにより異なっていた。

このような相違を認める原因を検索するために、傷害後の血管壁の変化を観察した。ワイヤー傷害では、カフ傷害、血流遮断による傷害に比べ、傷害作成後急性期に血管内皮細胞層の剥離、中膜の広範な apoptosis による中膜平滑筋細胞の消失を認めた。また、cytokine や chemokine の発現も認めた。

このように、ワイヤー傷害では血管壁に大きな変化が生じ、多数の骨髄由来前駆細胞が新生内膜形成に関与するが、血管壁にあまり変化を与えない傷害モデルにおいては、新生内膜形成に対する骨髄由来前駆細胞の関与はあまり認められなかった。また、炎症細胞の集積は、カフ傷害血管の外膜に最も認めたが、カフ傷害後の新生内膜には骨髄由来前駆細胞をほとんど認めないことから、炎症反応のみでは病変に骨髄由来前駆細胞は動員できないと考えられた。ワイヤー傷害のような強い血管傷害は、血管壁の cytokine、chemokine の発現を誘導し、

これらが骨髄由来前駆細胞を病変に誘導するのに重要であると考えられる。

以上の研究結果から、骨髄由来前駆細胞の新生内膜形成に対する関与は、血管傷害モデルの相違により大きく異なることが示された。マウスを用いて血管傷害による新生内膜形成の機序を検討する実験を施行する場合には、血管傷害モデルの相違による、病変を形成する細胞の起源や病変形成の機序の相違を十分考慮する必要がある。