

論文の内容の要旨

論文題目：流れずり応力による内皮前駆細胞の分化誘導に関する研究

小尾正太郎

最近、出生後の血管新生に関与する血管内皮前駆細胞 (Endothelial Progenitor Cell: EPC) が、成人の末梢血から分離された。EPC は骨髄から末梢血に動員され、既存の血管の内皮細胞に接着し、内皮層を通り抜けて組織に遊走した後、増殖・分化して新たな血管を構築する。この過程において EPC は血流や組織液の流れに起因する力学的刺激であるずり応力 (剪断応力) を受けると考えられる。EPC がずり応力にどのように反応するかについての最初の報告は東大の山本らによって行われた。ヒトの末梢血由来の EPC に流れ負荷装置で定量的なずり応力を作用させる実験により、EPC がずり応力に反応して形が類円形から細長く変わり、その長軸を流れの方向に向けて配列することや細胞増殖能が促進されることが示された。また、EPC が成熟型の血管内皮細胞へ分化する過程がずり応力により格段に加速されることやコラーゲンゲル内での管腔形成が促進されることも判明した。その後、ずり応力に対する EPC の力学応答に関する多くの研究が行われ、ずり応力が EPC の一酸化窒素やプロスタグランジン F1 α などの血管拡張物質の産生や抗血栓活性を有するトロンボモデュリンの発現を増加することや、線溶作用のある組織型プラスミノゲン・アクチベータの放出や活性酸素の消去に関わるスーパーオキシドディスムターゼの活性と遺伝子発現を増加させることなどが明らかにされた。しかし、ずり応力により EPC が成熟内皮細胞へ分化が誘導されるとき動脈内皮に分化するのか、あるいは静脈内皮に分化するのかについてはまだ解明されていない。そこで、本研究ではヒト末梢血由来 EPC の動静脈分化に対するずり応力の効果について解析した。さらに、近年、細胞治療や再生医療に使う細胞ソースとなるヒト臍帯血中に存在する EPC が末梢血 EPC と同様にずり応力に反応するかどうかについても検討を加えた。

1) 末梢血 EPC の動静脈分化に及ぼす流れずり応力の効果に関する検討。

ヒト末梢血から密度勾配遠心法により単核球を精製し、内皮用培地で培養して接着した細胞を EPC として使用した。EPC を回転円盤型流れ負荷装置に入れ定量的な流れずり応力 (1.25 dynes/cm²) を 6 時間あるいは 24 時間負荷し、動脈内皮マーカーである ephrinB2、Notch1/3、Hey1/2、ALK1 と静脈内皮マーカーである EphB4、NRP2 の mRNA レベルの変化をリアルタイム PCR で解析した。その結果、動脈内皮マーカーの mRNA 発現レベルは反応の大きさに違いは見られるが、全て増加すること、一方、静脈内皮マーカーは逆に減少することが示された。ephrinB2 蛋白の発現変化をウェスタンブロットで解析したところ、ephrinB2 の蛋白レベルはずり応力開始 12 時間後に増加し始め、流れ負荷 24 時間後にはコントロールの約 3 倍に増加した。

流れ負荷で見られた ephrinB2 と EphB4 の遺伝子発現の変化が力学的刺激であるずり応力に依存している否かを確認するため、EPC に異なる粘度を持つ 2 種類の培養液による流れ負荷を行った。

ずり速度の増加に伴って ephrinB2 の mRNA レベルは増加し、逆に EphB4 の mRNA レベルは減少したが、粘度の高い培養液と低い培養液で反応の大きさが異なった。同じずり速度では常に粘度の高い培養液による負荷、すなわちより高いずり応力が作用した場合に反応が大きかった。他方、同じずり応力では粘度の高い培養液と低い培養液による反応の大きさの違いは見られなかった。このことは流れ負荷による ephrinB2 および EphB4 の遺伝子応答はずり速度ではなく流れずり応力に依存することを示している。

次にずり応力による ephrinB2 の遺伝子の発現増加が転写調節なのか転写後調節なのかについて検討した。ランオンアッセイを行ったところ、ずり応力が ephrinB2 の転写を有意に促進することが示された。一方、アクチノマイシン D 処理後の ephrinB2 の mRNA レベルの変化を競合的 PCR で測定したところ、ずり応力は ephrinB2 の mRNA の安定化に影響しないことが分かった。さらに転写調節に関わる遺伝子のずり応力応答配列を明らかにするため、クローニングして得たヒト ephrinB2 DNA のプロモータを使ったルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、ずり応力を負荷するとルシフェラーゼ活性が静的条件より明らかに上昇することが示された。また、プロモータの長さを転写開始点よりも上流 106 塩基まで短くすると、ずり応力による転写促進効果が消失した。これらの結果から、ずり応力は転写を亢進して ephrinB2 の遺伝子発現を増加させることと、この反応に関わるずり応力応答配列は転写開始点から上流 106 塩基間に存在することが分かった。

その範囲の塩基配列は既知の転写因子 Sp1 が結合するモチーフを含むことから、これがずり応力応答配列として働いているかどうかを探るためゲルシフトアッセイを行なった。静的条件あるいは流れずり応力を負荷した細胞から得た核蛋白と放射性同位元素で標識した Sp1 結合モチーフを含むオリゴヌクレオチドを反応させたところ、ずり応力負荷で明瞭な蛋白-DNA 複合体が形成された。この蛋白-DNA 複合体は Sp1 の結合モチーフの塩基配列に変異を入れると形成されなくなり、Sp1 の抗体でバンドシフトを示した。また、流れずり応力を 24 時間負荷した EPC の染色体 DNA から Sp1 で免疫沈降したものをテンプレートとして Sp1 結合モチーフの塩基配列に対応したプライマーを使って PCR 増幅するクロマチン免疫沈降法を行なったところ、Sp1 が結合している部位は ephrinB2 プロモータにある Sp1 結合モチーフであることが確認された。これらの所見からずり応力が Sp1 を活性化し、それが ephrinB2 遺伝子の Sp1 結合モチーフに結合することで ephrinB2 の転写が促進を受けると考えられた。

以上より、流れずり応力は末梢血 EPC を静脈内皮より動脈内皮に分化を誘導することと、流れずり応力による動脈のマーカー ephrinB2 遺伝子の発現増加は転写因子 Sp1 の活性化による転写亢進を介していることが明らかとなった。

2) 臍帯血 EPC に対する流れずり応力の効果に関する検討

末梢血由来 EPC より未分化なヒト臍帯血由来 CD133 陽性細胞を EPC として流れ負荷実験を行った。この EPC に回転円盤型流れ負荷装置で定量的なずり応力 (2.5 dynes/cm^2) を作用させたところ、様々な応答を起こすことが判明した。ディッシュへの接着性に関しては、静的条件下に置いた細胞と比較し、ずり応力が作用した細胞では接着数が有意に増加した。Boyden chamber を用いた測定で流れずり応力が EPC の遊走能を亢進することが示された。また、ずり応力は EPC の増殖を促進する一方、アポトーシスを抑制する作用のあることが、 H_2O_2 処理後の断片 DNA 量を

ELISA で測定する実験で示された。さらに EPC をコラーゲンゲルに播種して顕微鏡観察するアッセイでは、ずり応力が作用した EPC では明らかに管腔形成が亢進することが示された。

EPC の分化に関しては内皮マーカーの細胞表面蛋白の発現変化をフローサイトメトリーで測定した。その結果、内皮細胞マーカーである KDR、Flt1、VE-cadherin、Tie2 の蛋白発現がずり応力で著明に増加することが示された。遺伝子の発現に関してリアルタイム PCR で検討したところ、ずり応力により KDR、Flt1、VE-cadherin、Tie2 の mRNA レベルがいずれも有意に増加するのが観察された。また、EPC に異なるレベルのずり応力 (0.25 から 2.5 dynes/cm²) を 48 時間負荷して KDR、Flt1、VE-cadherin、Tie2 の蛋白発現の変化を測定したところ、蛋白の発現増加は流れずり応力の強さに依存していることが分かった。これらの結果から、ずり応力が末梢血 EPC と同様に臍帯血 EPC を成熟内皮細胞へ分化誘導すると考えられた。

以上より、臍帯血 EPC はずり応力に反応して接着、遊走、増殖、脈管形成、抗アポトーシスといった細胞機能が亢進することが示された。また、ずり応力は末梢血 EPC と同様に臍帯血 EPC を成熟内皮細胞へ分化を誘導する作用のあることが明らかになった。

今後、EPC がどの様にずり応力を認識し、その情報を細胞内部に伝達し細胞応答を起こすのかといった力学刺激のセンシング機構が明らかになると、生体における EPC を介した血管新生や血管リモデリングの分子機構の理解がさらに深まると思われる。また、今回の結果は EPC などの未分化な細胞を使う再生医療において、ずり応力などの力学的刺激を細胞の分化を制御するツールとして応用できることを示している。