

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

Bone marrow-derived late-outgrowth endothelial progenitor cells: Characterization and evaluation of real therapeutic efficacy to vascular endothelial repair in the setting of pulmonary arterial hypertension and arterial neointimal formation

(骨髄由来後期血管内皮前駆細胞 その特性と、肺動脈性肺高血圧における傷害肺動脈および体血圧系動脈の内皮損傷に対する血管内皮修復機能の評価)

氏名 生富 公康

### Introduction

血管の内側を覆っている内皮細胞は、多くの機能を有し、脈管系のホメオスタシス維持にとって中心的な役割を果たしている。血管内皮機能の障害は様々な血管病の原因となり、その内皮機能を再生することは治療や予防につながると考えられている。骨髄より流血中に動員される血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC) は、虚血組織や血管損傷部位に集積し、血管新生・内皮修復に寄与するとされ、EPC を用いた虚血性疾患や血管障害の再生治療が注目されている。体血管の動脈内皮傷害が引き起こす代表的な病態として、動脈硬化症や血管形成術後 (PCI, CABG) に生じる新生内膜形成があげられる。また肺循環における内皮機能障害が原因となる疾患としては肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension: PAH) があげられる。肺高血圧症は未だ病態メカニズムが不明な疾患であるが、肺微小血管内皮機能障害が一つの引き金となり、肺血管リモデリングから肺血管抵抗と肺動脈圧の進行性の上昇を引き起こし、最終的に右心不全に至ると考えられている。新生内膜形成や PAH において、EPC を用いた再生治療は魅力的かつ有効な戦略と考えられるが、その有効性については各実験により相違があり、一定の結論を得ていない。報告による結果の相違の要因として、本来 heterogeneity な集団である EPC の定義の問題があげられる。従来、内皮系表面抗原や幹細胞マーカーなどにより EPC を定義してきたが、これらの形質は単球系細胞にもあり、両者はオーバーラップしていることが分かっている。特に近年の研究より、これまで「EPC」として最も研究されてきた集団は、単核球分離後 5 日弱で colony を作り、CD34+/CD45+である「early EPC」であるが、この集団の大部分が単球系に由来し、増殖能と成熟血管内皮細胞への分化能に乏しいことがわかってきた。一方単核球分離後 1 週間以上してから血管内皮細胞に特徴的な「cobblestone appearance」を呈しながら colony を形成する細胞群は「late outgrowth cells (LOC)」とよばれ、増殖能や NO 産生能に富み、単核球マーカーを発現せず、厳密な定義上の EPC に近いと考えられている。EPC のソースとなる単核球の抽出部位としては末梢血、骨髄や脾臓などがあげられる。過去にヒト末梢血単核球由来 EPC を用いた実験においては、early EPC、LOC といった EPC の集団における機能の違いが報告されているが、骨髄

単核球由来 EPC 培養において EPC の集団による機能の相違があるかは不明である。また PAH や新生内膜形成といった血管内皮障害において、骨髄由来 EPC が真にどのような血管修復能を有するのかは不明である。

今回我々は、ラット骨髄単核球を用いて EPC の培養を行った。培養期間およびコロニー外観により、骨髄由来 EPC を early EPC、LOC、very late outgrowth cells (VLOC) の 3 群に分類し、機能および特性を *in vitro* で比較検討した。さらに「モノクロタリン (monocrotaline: MCT) による肺動脈傷害モデル(肺高血圧モデル)」と「大腿動脈ワイヤー挿入による機械的動脈内皮傷害モデル」という肺体血管同時傷害モデルラットを作成、3 群の EPC 投与を経静脈的に投与し、モデル間および EPC 間での血管修復能を比較検討した。

## Result & Method

ラット大腿骨より骨髄単核球を比重遠心にて分離、endothelial basal medium を用いて EPC 培養を行った。Early EPC は day 3-6 に fibronectin-coating plate に接着した小円形の細胞集団として出現、その後急速に減少し消失。次に day 7-10 にかけて内皮系細胞に特徴的な cobblestone appearance を呈する colony が出現、この LOC 型 colony は急速に増大し、2-3 週間の間 well 上に confluent となった。LOC 型 colony の中で培養時間経過に伴った形質変化の有無を調べるために、LOC 型 colony 出現後早期 (day 8-14) に harvest とした「LOC」と、LOC 型 colony 出現後期 (day 15-21) に harvest した「VLOC」の二つに細分化。early EPC と合わせて全 3 群で比較を行った。古典的に EPC 特定法として用いられてきた acetylated LDL と lectin binding 能の二重染色において、いずれの EPC も同様に二重陽性となった。しかし免疫染色・flow cytometry による表面抗原解析においては、[early EPC]  $CD31^+CD45^+CD34^{high}Flk1^{low}$ , [LOC]  $CD31^+CD45^+CD34^{low}Flk-1^{high}$ , [VLOC]  $CD31^+CD45^+CD34^+Flk-1^{low}$  と各 EPC は全く異なる表現形質を呈しており、特に LOC は高い内皮系形質 (CD31, Flk-1) を呈していた。eNOS 蛋白発現能 (Western-blot)、増殖能 (MTS assay) および管腔構造形成能 (Matrigel tube-formation assay) の全ての解析において、LOC は他の EPC に比べて有意に高い機能を示し、*in vitro* の検証において最も強い angiogenic property をもつ EPC 集団であると推測された。

次に肺体血管同時傷害モデルラットを作成、各々の EPC を投与し血管修復への効果を比較検討した。8 週齢 wild F344 rat に対して、右大腿動脈より 0.46mm の血管造影用ワイヤーを挿入、血管内皮を機械的に損傷し、片側大腿動脈傷害モデルを作成した。さらに同ラットに MCT 60mg/kg を腹腔内投与し、肺動脈内皮傷害に伴う PAH モデルを作成した。この同時傷害モデルラットを 4 群 (vehicle, early EPC, LOC, VLOC 群) に分類、さらに別に用意した sham 群とあわせ、全 5 群での比較を行った (各群 n=8)。GFP transgenic F344 rat の骨髄単核球より EPC を培養し、 $1 \times 10^6$  cell の各 EPC もしくは PBS (vehicle 群) を day 0, 1, 3, 5, 7, 9 の計 6 回に分けて尾静脈より投与。4 週後に右室圧をカテーテル挿入にて測定した後、肺・心臓・両側大腿動脈の組織採取を行った。4 週後のカテーテル測定にて、右室圧は MCT 投与群全てにおいて同様に上昇みとめた。また、右室リモデリング指標となる右室/左室重量比 (RV/LV ratio) や、肺動脈リモデリング指標となる肺

動脈肥厚化比(percent pulmonary arterial musclarization)も、MCT 投与群で同様に上昇をみとめた。しかし、いずれの PAH 変化のパラメータにおいても各群による差異はみられず、EPC 投与による治療効果はみられなかった。蛍光顕微鏡下に GFP で標識された移植 EPC をくまなく検索したが、いずれの群においても肺動脈への EPC 生着は一切みとめなかった。

次に、ワイヤー障害後の大腿動脈の組織評価を行った。機械的に傷害された大腿動脈には、4 週間後に顕著な新生内膜形成をみとめた。各群での新生内膜量の定量比較を行ったところ、LOC 投与群でのみ有意な新生内膜の減少がみられた。蛍光顕微鏡観察において、多くの GFP<sup>+</sup> LOC が大腿動脈傷害部へ集積し、一部の LOC は実際に内皮化し直接的に血管修復に寄与している像が確認された (replacement ratio= 12.7%)。投与 LOC の homing は大腿動脈のワイヤー傷害部分にのみ局限し、非傷害側には一切みとめなかった。また他 EPC 投与群(early EPC/VLOC 群)においては新生内膜抑制効果や GFP 標識細胞の局在は一切みられなかった。

最後に EPC 投与の傷害組織での paracrine effect を検証するため、real-time RT-PCR を用いて肺と大腿動脈での mRNA 発現を定量比較した。肺および大腿動脈では、共にモデル傷害に伴って炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$ 、MCP1、IL6 など)の発現上昇がみられた。肺においては各 MCT 投与群でのサイトカイン発現上昇に差はなかったのに対し、大腿動脈においては LOC 投与群傷害側でのみサイトカイン発現上昇が有意に抑制されていた。同効果は early EPC/VLOC 群ではみられず、LOC は直接的な内皮化のみでなく paracrine effect としても、血管修復に寄与するものと考えられた。

## Conclusion

ラット骨髄由来の EPC 培養において、cobblestone colony を呈する LOC は高い angiogenic potential および内皮細胞形質を有することが *in vitro* の検証で確認された。しかしこの cobblestone colony を有する LOC も培養が長期に及ぶことにより(VLOC 化することにより)、EPC としての機能が低下することが明らかとなった。ワイヤーによる機械的動脈内皮損傷において、経静脈的に投与された LOC は傷害血管に遊走集積し、新生内膜形成抑制効果を有した。この血管修復には、直接的な内皮化と、paracrine effect による抗炎症効果という、二つの効果がみられた。一方で EPC 投与は、たとえ LOC であっても、MCT による肺高血圧に対しては治療効果を一切みとめなかった。同時傷害モデルにおける、二つの傷害での LOC の治療効果の相違には、血管リモデリングの病態メカニズムの違いが関与していると考えられた。