

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名: 骨髄由来血管前駆細胞の同定と機能解析

### 2 研究者氏名: 佐田 政隆

研究員: 白川 伊吹 (研究期間: H16.4.1 ~ H17.3.31)

### 3 研究の狙い:

動脈硬化や血管形成術後再狭窄、移植後血管障害といった血管病では、平滑筋細胞の蓄積が主要要因である。この原因として、中膜平滑筋細胞が血管内皮下へ遊走し増殖するという「Ross の仮説」が長年受け入れられてきた。そして、中膜平滑筋細胞を標的とした治療法が検討されてきたが、未だ有効な方法は確立していない。研究開始時、研究者は心臓移植後動脈硬化モデルにおいて、「新生内膜の大部分はドナー中膜平滑筋由来でなくレシピエントの流血細胞由来である」ことを報告した。本研究では、各種血管病変における平滑筋細胞ならびに内皮細胞の起源を明らかにすることを目指した。また、その平滑筋ならびに内皮前駆細胞の「骨髄からの動員」「傷害血管への定着」「血管細胞への分化」「増殖」の過程を分子レベルで明かし、血管リモデリングの新しい概念の確立を図ることを目的とした。

### 4 研究成果:

以下のモデルを用いて、骨髄由来細胞の血管病理への関与を検討した。

#### (1) マーカー遺伝子発現マウスを用いた心臓移植

野生型のマウスの心臓を LacZ マウスに移植した。野生型のグラフト冠動脈にヒトと同様の求心性の動脈硬化が生じた。この新生内膜の9割以上は LacZ 陽性であった。つまりグラフト上の冠動脈の中膜を起源としたものでなく、レシピエントの血流中の細胞を起源としていることが明らかとなった。この逆に、LacZ マウスの心臓を野生型マウスに移植した場合は、LacZ 陽性の中膜平滑筋細胞は中膜に留まり、新生内膜はレシピエント由来の細胞で構成されていた。同様の現象は、性不一致個体間心臓移植後の動脈硬化病変においても、Y 染色体をマーカーとした *in situ* hybridization によって確認された。この新生内膜は、平滑筋細胞に特異的なミオシン重鎖、カルボニン、h-カルデスモン、アクチンを発現していた。以上の実験結果により流血中の前駆細胞が付着することで病変が形成されることが明らかとなった。

レシピエント中の平滑筋前駆細胞の起源を同定するために、野生型マウスの骨髄を致死量 X 線で照射し LacZ マウスもしくは GFP マウス (全身に蛍光物質 GFP (green fluorescent protein, 緑色蛍光蛋白質) を発現するトランスジェニックマウス) の骨髄を移植した。骨髄、脾臓、胸腺などでは移植骨髄細胞が同定されたが、無処置の血管には骨髄細胞は定着していなかった。この骨髄移植マウスに野生型マウスの心臓を移植したところ、グラフト動脈硬化病変の 8 割以上の細胞は骨髄由来であった。

#### (2) マーカー遺伝子発現マウスの骨髄移植とバレーニング血管傷害モデル

野生型マウスの骨髄を LacZ マウスの骨髄で置換したのち、大腿動脈にワイヤーを挿入し、内皮の剥離と血管の拡張を行った。傷害後4週目に形成された新生内膜の大部分と中膜の一部は骨髄由来の LacZ 陽性細胞で構成されていた。注目すべきことには再内皮化された内皮細胞も骨髄由来のものが大部分をしめていた。以上より、流血中に骨髄由来「血管前駆細胞」が存在し、血管形成術後の再狭窄部の平滑筋細胞や再内皮化内皮細胞へも分化していることが明らかになった。

### (3) 粥状動脈硬化病変でみられる平滑筋細胞の起源に関する検討

自然発症動脈硬化(粥状動脈硬化)巢における平滑筋細胞の起源について探索した。アポE欠損マウスでは著明な高脂血症をきたしヒトと同様の動脈硬化が生じる。動脈硬化の生じていない8週齢において、アポE欠損マウスの骨髄をLacZマウスもしくはGFPマウスのもものと置換した。20週齢で大動脈に形成された粥腫の周辺部には平滑筋細胞が認められたが、その半数は移植された骨髄細胞由来のものであった。この骨髄由来平滑筋細胞は、各種の平滑筋細胞のマーカー陽性であり、電子顕微鏡による形態観察では、「合成型」平滑筋細胞に特異的な分泌顆粒の存在と筋線維成分の減少を認めた。

### (4) Parabiosis モデルを用いての検討

皮下組織の結合によって、従来から知られているように液性因子が交流するばかりでなく、末梢血、骨髄細胞も二マウス間を交流していた。すなわち、GFPマウスと野生型マウスを結合すると、7-10日には野生型マウスの末梢血の約50%がGFP陽性になっていた。3-4ヶ月後には、骨髄においてもほぼ50%のキメリズムが確認された。片方のマウスの血管にワイヤー傷害を加えると、パートナー由来の細胞が新生内膜形成に関与していた。以上より、非照射下においても、循環している前駆細胞が血管の修復に関与しうることが明らかとなった。

### (5) 末梢血から血管前駆細胞の分離

マウス、ラビット、ヒトの末梢血単核球を培養すると、炎症性マクロファージのみならず平滑筋様細胞もしくは内皮様細胞に分化させることができた。高脂血症、加齢によって平滑筋前駆細胞数は増加した。アンジオテンシンIIの持続注入によって血管前駆細胞数は増加し病変進行は加速した。また、動脈瘤形成も認められた。ApoE欠損マウスにカンデサルタンもしくはスタチンを投与すると、末梢血中の前駆細胞が減少し病変進行が抑制された。

### (6) 考察

以上の結果から、免疫学的、機械的、液性(サイトカインや酸化脂質)傷害が血管に加わると骨髄などの遠隔臓器から未分化細胞が動員され、平滑筋ないし内皮細胞に分化し血管の修復とリモデリングに関与することが明らかとなった。

## 5 自己評価:

さきがけ研究で提案した「血管病変で増殖する細胞の起源は血中の前駆細胞にある」という仮説を種々の動物実験を用いて証明することができた。この過程で、ポスドクに加藤は動物実験、鷲田は細胞実験、FACSなど、白川は組織学的検討で中心的役割を果たした。この新しい概念はその後世界で広く受け入れられ、研究者の実験を追試する研究が次々と報告されている。このことは、いくつものReview Articleや招待講演を依頼されていることも明らかである。さきがけ研究によって、動脈硬化研究にブレークスルーをもたらすことができた。

## 6 研究総括の見解:

研究は順調に推移している。臨床医学分野に対しても、波及効果の高い成果が挙げられつつある。特に、新しいコンセプトをもたらし、それが認められつつあることは注目に値する。幹細胞の特定方法(マーカー等)のブラッシュアップ、ニッチへの定着メカニズムの解明等を含めて、今後の展開に期待したい。

## 7 主な論文等:

### 論文

1. Sata, M., Saiura, A., Kunisato, A., Tojo, A., Okada, S., Tokuhisa, T., Hirai, H., Makuuchi, M., Hirata,

- Y., Nagai, R.  
Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis.  
*Nature Medicine*. 2002. 8: 403-409.
- 2 . Shindo, T., Manabe, I., Fukushima Y, Tobe, K., Aizawa, K., Miyamoto S, Kawai-Kowase K, Moriyama N, Imai Y, Kawakami H, Nishimatsu H, Ishikawa T, Suzuki T, Morita H, Maemura, K., Sata, M., Hirata, Y., Komukai, M., Kagechika, H., Kadowaki, T., Kurabayashi, M., Nagai, R  
Ruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling.  
*Nature Medicine*. 2002. 8: 856-863.
- 3 . Sata, M., Nagai, R.  
Phosphatidylinositol 3-kinase. A key regulator of vascular tone?  
*Circ. Res.* 2002. 91: 273-275.
- 4 . Sata, M.  
Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling and lesion formation.  
*Trends Cardiovasc Med*. 2003. 13: 249-253.
- 5 . Tanaka, K., Sata, M., Hirata, Y., Nagai, R.  
Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries.  
*Circ Res*. 2003. 93: 783-790.
- 6 . Natori, T., Sata, M., Washida, M., Hirata, Y., Nagai, R., Makuuchi, M.  
Nicotine enhances neovascularization and promotes tumor growth.  
*Mol Cells*. 2003. 16: 143-146.
- 7 . Sata, M.  
Molecular strategies to treat vascular diseases; Circulating vascular progenitor cell as a potential target for prophylactic treatment of atherosclerosis.  
*Circ J*. 2003. 67: 983-991.
- 8 . Kumano, K., Chiba, S., Kunisato, A., Sata, M., Saito, T., Nakagami-Yamaguchi, E., Yamaguchi, T., Masuda, S., Shimizu, K., Takahashi, T., Ogawa, S., Hamada, Y., Hirai, H.  
Notch1 but not notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells.  
*Immunity* 2003. 18: 699-711.
- 9 . Sata, M., Nishimatsu, H., Osuga, J.I., Tanaka, K., Ishizaka, N., Ishibashi, S., Hirata, Y., Nagai, R.  
Statins augment collateral growth in response to ischemia but they do not promote cancer and atherosclerosis.  
*Hypertension*. 2004. 43: 1214-1220.
- 10 . Fukuda, D., Sata, M., Tanaka, K., Nagai, R.  
Potent inhibitory effect of sirolimus on circulating vascular progenitor cells.  
*Circulation*. 2005. 111: 926-931.

他 14 件

## 受賞

平成 13 年 日本心臓病学会 Young Investigator's Award 最優秀賞

平成 14 年 日本循環器学会八木賞

平成 14 年 The Japanese Vascular Biology Organization Young Investigator's Award

平成 15 年 日本循環器学会佐藤賞

平成 15 年 日本炎症・再生医学会第 9 回奨励賞

### 招待講演等

1 . Masataka Sata

"Bone marrow-derived progenitor cells contribute to vascular repair and atherosclerosis."  
Annual Spring Conference of the Korean Society of Circulation. Cheju, Korea, April 17<sup>th</sup>, 2003.

2 . Masataka Sata

"Bone marrow-derived progenitor cells participate in the pathogenesis of atherosclerosis." 1<sup>st</sup>  
Euregio-Symposium Workshop on Atherosclerosis-Molecular Basis of an Inflammatory Disease.  
Vaals, Netherlands, September 27<sup>th</sup>, 2003.

3 . Masataka Sata

"Circulating progenitors contribute to vascular repair and remodeling"  
4<sup>th</sup> Taipei vascular molecular biology symposium, Taipei, September 11<sup>th</sup>, 2004.

4 . Masataka Sata

"Potential Roles of Circulating Vascular Progenitor Cells in Progression and Remodeling of  
Atherosclerotic Lesions"  
The 48<sup>th</sup> Annual Scientific Session of Korean Society of Circulation. Seoul, Korea, October 14<sup>th</sup>,  
2004.