

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007 -2008
 課題番号：19390275
 研究課題名（和文） 血管内皮前駆細胞異常に注目した強皮症の病態解析と新規治療法の開発
 研究課題名（英文） Analysis of pathogenesis of systemic sclerosis based on dysfunctional endothelial progenitor cells and its application to novel therapeutic interventions
 研究代表者
 桑名 正隆（KUWANA MASATAKA）
 慶應義塾大学・医学部・准教授
 研究者番号：50245479

研究成果の概要：

本研究ではヒト血管内皮前駆細胞（EPC）として知られている循環血管内皮前駆細胞（CEP）と単球系 EPC の強皮症病態との関連を追究した。強皮症患者では CEP の減少と分化障害があり、それを代償するために動員された MEP が局所の MCP-1 濃度を高めることで線維化を促進する機序が明らかにされた。本研究結果により EPC の機能異常が強皮症特有の血管病変と線維化病態の両者を誘導することが証明され、EPC を標的とした手法が強皮症に対する新たな治療となることが示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：強皮症、血管内皮前駆細胞、血管新生、脈管形成、線維化、ケモカイン、単球

1. 研究開始当初の背景

強皮症は皮膚や内臓諸臓器の過剰な線維化と末梢循環障害を主体とする難治性の結合組織疾患である。強皮症に伴う皮膚、肺などの線維化、難治性潰瘍などの末梢循環障害に対して有効性が証明された治療法はなく、10年生存率は現状でも70%に満たない。これまでの強皮症の病因・病態解析により線維化病態における TGF- β シグナルの重要性が報告されてきたが、主要徴候である線維化病態と末梢循環障害を一元的に結びつける機序は依然不明である。

成人における血管形成や損傷血管の修復は既存の血管内皮細胞が増殖、遊走する血管新生（angiogenesis）によると考えられてき

たが、その過程で流血中の骨髓由来前駆細胞による脈管形成（vasculogenesis）も重要な役割を果たすことが近年明らかにされた。そこで、申請者は強皮症患者にみられる細動脈レベルでの血管壁肥厚に伴う内腔狭窄が脈管形成の異常による可能性を着想した。この仮説を検証するため、ヒト血管内皮前駆細胞（EPC）の一つで、CD34+VEGFR2+CD133+のフェノタイプを有する循環血管内皮前駆細胞（CEP）の定量と成熟血管内皮への分化能を評価するアッセイ系を確立し、強皮症患者で CEP の定量および機能解析を行った。その結果、強皮症患者において CEP 数の著減と成熟血管内皮への分化障害を見出し、CEP 異常に基づく脈管形成異常が強皮症の血管病変の

原因のひとつであることを世界に先駆けて証明した。しかし、異なる解析法を用いた海外からの報告の中には、強皮症患者で CEP 数減少がみられないことを示すものがあり、その検証が必要である。さらに、申請者はスタチン系薬剤を強皮症患者に投与する前向きオープン試験を行い、末梢血 CEP 数が約 3 倍に増加し、それに伴って末梢循環障害指標の改善と血管傷害マーカーの減少を報告した。この研究成果は CEP 異常が強皮症における末梢循環障害機序のひとつであることを支持すると同時に、その是正が強皮症に対する新規治療法となる可能性を示す。

一方、強皮症患者では虚血組織における脈管形成不全により、組織や循環血中の血管新生因子や線維芽細胞の増殖と活性化を誘導する成長因子(TGF- β 、PDGF など)が増加し、それらを介して血管壁のみならず周囲組織の線維化にも貢献する可能性がある。また、CEP と異なるヒト EPC サブセットとして CD45+CD14+ の単球フェノタイプを持つ単球系 EPC (MEP) の存在が最近明らかにされた。申請者は末梢血より MEP を効率よく分離する方法を確立し、それらは血管内皮のみならず、骨芽細胞、軟骨細胞、線維芽細胞など間葉系細胞への分化能を有することを明らかにした。したがって、MEP は線維化病態の促進に働く可能性があるが、これまで強皮症病態におけるその役割は明らかでない。これらの点を踏まえ、EPC 異常により強皮症に特徴的な末梢循環障害だけでなく線維化病態も一義的に説明できることが想定される。

2. 研究の目的

本研究テーマは『EPC 異常により強皮症の線維化・血管病変が一義的に説明できる』という新しい概念の検証を進め、その成果を強皮症に対する新規治療法の開発につなげることを目的とする。そのために以下の 4 つのサブテーマを設定した。

- (1) CEP 定量法の検証と強皮症での再解析
- (2) MEP の分化能を規定する因子の同定
- (3) 強皮症における MEP の定量と分化能解析
- (4) 強皮症における MEP の遺伝子発現解析

3. 研究の方法

(1) CEP 定量法の検証

強皮症患者における CEP 数を解析した複数の研究成果に不一致がみられることから、2008 年にヨーロッパの強皮症研究グループ EUSTAR により CEP 測定の Recommendation が提唱された (Ann Rheum Dis 2009;68:163)。その妥当性を検討するため、強皮症、健康人の末梢血を用いて従来の我々の方法 (MACS 法) とフランスの研究グループによる方法 (ロゼット法) を比較した。

MACS 法 末梢血 20ml より単核球を分離し、

MACS ビーズ (Miltenyi Biotech) を用いて enrich した CD34+細胞を CD34、VEGFR2、CD133 に対するモノクローナル抗体を用いて三重染色した。CD34+VEGFR2+CD133+細胞の割合をフローサイトメトリーにより求め、FlowCount マイクロビーズ (Beckman-Coulter) を用いて定量化した。CEP 数は末梢血 1 ml あたりの絶対数で表した。なお、一部の検討では死細胞を除くために 7AAD 染色を行った。

ロゼット法 臍帯血分離用 ResetteSep (StemCell Technologies) を用いて末梢血 10ml から Lin-細胞分画を得た。CD34、VEGFR2、CD133 に対する抗体を用いて Lin-細胞分画を三重染色し、フローサイトメトリーにより 7AAD-CD34+VEGFR2+CD133+細胞を同定し、その割合を 10^6 個の Lin-細胞あたりの数として表した。また、MACS 法との比較のため、マイクロビーズを用いた定量も同時に行い、末梢血 1 ml あたりの絶対数で表した。

(2) MEP の分化能を規定する因子の同定

予備実験の結果から MEP が血管内皮を含めた多分化能を維持するためには、マトリックス蛋白との結合と血小板由来の可溶性因子の存在が必要なが示されている。そこで、以下の 2 つのアプローチを用いて MEP の分化能を規定する因子の同定を行った。

マトリックス蛋白とその受容体の解析 従来の MEP 分離方法は、末梢血単球に血小板を加えてフィブロネクチン上で培養するものであった。そこで、マトリックス蛋白としてフィブロネクチン、I 型コラーゲン、ラミニンおよびそれらのペプチド断片を用いて MEP 分離効率に与える影響を調べた。また、単球上のマトリックス蛋白の受容体として知られている各種 1 インテグリンに対するブロッキング抗体や競合ペプチドを用いた検討も行った。

血小板由来液性因子の解析 血小板をフィブロネクチン上で 24 時間培養した上清 (血小板上清) 中で末梢血単球を培養すると効率よく MEP を回収できる。そこで、イオン交換カラムを用いて血小板上清を分画し、その中で MEP 誘導活性を有する分画を抽出する網羅的蛋白分析を行った。また、通常培地に既知の血小板から放出される因子を添加することで血小板上清と同様に MEP 誘導ができるかを調べた。さらに、候補となった血小板由来因子の単球上の受容体の発現レベルと MEP 分離効率との関係を検討した。

(3) MEP の定量と分化能の解析

MACS ビーズを用いて血小板を除去した末梢血単核球 (3×10^6 /well) をフィブロネクチン固相化プレートに自己血小板 (3×10^7 /well) とともに 10 日間培養した。紡錘形の形態を示した付着細胞を MEP として数え、

20ml 血液に含まれる数を算出した。MEP の *in vitro* での血管形成能を調べるため、得られた培養 MEP を Matrigel® プレート (BD Biosciences) 中でヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) とともに血管新生因子含有培地で 24 時間培養し、形成された全管腔構造の長さを計測した。また、MEP と HUVEC を異なる蛍光色素で標識し、管腔構造に取り込まれた MEP 数を計測した。さらに、*in vivo* での血管形成能を調べるため、マウス大腸がん細胞株 CT-26 を MEP と混合し、重症免疫不全マウスの背部皮下に移植した。10 日後に形成された腫瘍の大きさを求め、一部はホルマリン固定後パラフィン切片として HE 染色で血管腔を観察した。また、免疫染色では、抗マウス CD31 抗体、抗ヒト CD31 抗体を用いてヒトとマウス由来の血管内皮細胞を異なる蛍光色素によって区別した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて血管腔数をカウントし、1 視野あたりの平均血管数を算出した。さらにマウス由来の血管構造に取り込まれたヒト MEP 由来血管内皮細胞数を計測し、総血管数との比率により MEP の取り込み効率を求めた。

(4) MEP の遺伝子発現解析

発症 3 年以内の diffuse 型強皮症 10 例および健常人 10 例を用いて、末梢 CD14+ 単球の遺伝子発現プロフィールを網羅的に比較した。分離精製した RNA から cRNA を合成し、3 種の Oligo GEArray アレイ (SuperArray) - Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecule (113 遺伝子)、Human Endothelial Cell Biology (113 遺伝子)、Human Chemokine and Receptors (112 遺伝子) - を用いて遺伝子発現を検出した。各遺伝子の発現量は GAPDH 発現量で補正し、強皮症と健常人の間で発現比が 1.5 倍以上異なる遺伝子を候補遺伝子として抽出した。候補遺伝子は、デンシトメトリーによる半定量的 PCR、TaqMan システムによる定量的 real-time PCR 法により遺伝子発現量を検証した。再現性の得られた遺伝子は、末梢血単球における蛋白発現レベルを調べた。また、単球における蛋白発現部位を免疫染色により調べた。あわせて、(2) で同定された MEP の分化能を規定する因子の発現を強皮症と健常人で比較した。

Versican のケモカイン結合能を評価するため、Chondroitin Sulfate (CS) 鎖をコートしたプレートを MCP-1 と反応させ、末梢血単球の遊走活性を調べた。一部の試験では、MCP-1 に対する中和抗体を添加して、その効果を確認した。また、(2) で同定された MEP の分化能を規定する因子の発現を強皮症と健常人で比較した。

4. 研究成果

(1) CEP 定量法の検証

健常人 10 名を対象に CEP を MACS 法とロゼット法で同時に測定した。まず、従来の MACS 法において EUSTAR の Recommendation に合致しなかった唯一の項目であった死細胞の除去を満たすため、7AAD 染色を組み合わせた。7AAD 処理なしと 7AAD 細胞分画としてゲートをかけた測定結果を比較すると、7AAD 処理をすることで CEP 数は平均 9.5% 減少したが、7AAD 処理の有無で得られた数は強く相関した ($r=0.97$, $P<0.001$)。したがって、7AAD 処理により死細胞混入をある程度防ぐことができたが、得られる結果は従来法と相関した。一方、ロゼット法で原著に従って 10^6 個の Lin 細胞あたりの数として求めた結果とマイクロビーズによる定量化により末梢血 1ml あたりの数として求めた結果の間には全く相関がみられなかった。7AAD 処理をした MACS 法とロゼット法により得られた CEP 数を比べると、マイクロビーズによる定量化を組み合わせて 1ml 中の数として求めると相関を示したが ($r=0.63$, $P=0.01$) (図 1)、原著にしたがって 10^6 個の Lin 細胞における割合とすると、両者に相関はなかった ($r=0.26$)。ロゼット法により得られた Lin 細胞分画に含まれる細胞成分を検討したところ、90% 以上は混入した CD41+ 血小板と glycopholin A+ 赤血球であり、真の Lin 細胞は 5% 以下であった。

これら結果に基づき、7AAD 処理をした MACS 法とビーズで定量化したロゼット法により強皮症患者検体を解析したところ、両者においても健常人に比べて強皮症で CEP 数は少なかった。したがって、過去の報告間の不一致の原因として死細胞の混入と定量性の不正確さが明らかとなった。したがって、7AAD による死細胞除去による非特異的反応の抑制とビーズによる定量化を組み合わせれば、MACS 法とロゼット法のいずれを用いても CEP 数の正確な評価が可能と考えられた。また、これら最適化された手法を用いることで、強皮症患者で CEP が減少していることが再確認された。

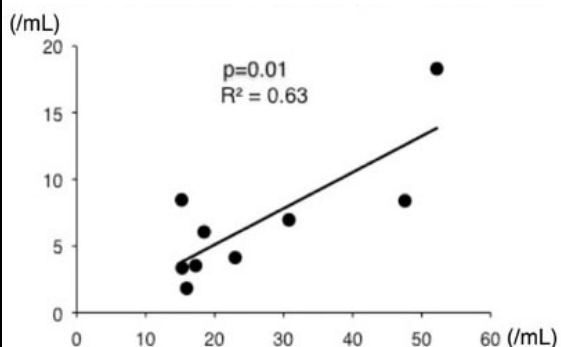


図 1. 7AAD 処理をした MACS 法とロゼット法により得られた CEP 数の相関

(2) MEP の分化能を規定する因子の同定

MEP の分離にはフィブロネクチンが必要であり、I 型コラーゲンやラミニン存在下での MEP 分離は困難であった。さらに、インテグリンに対するブロッキング抗体や競合ペプチドを用いた検討により、MEP の分化能を維持するためには単球上に発現している $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンを介したフィブロネクチンの RGD ドメインとの結合が必要であることを明らかにした。

血小板由来因子のスクリーニングのため、まず多孔フィルターを用いた遠心操作により血小板上清を蛋白分子量により分画し、MEP 誘導活性を検討した。健康人 60 検体を用いて検討し、MEP 誘導活性は 30kDa 以下の低分子領域に存在することが判明した。さらにその活性は熱処理 (80°C、5 分) により失活することから蛋白またはペプチドと考えられた。血小板培養上清由来の 30kDa 以下の低分子蛋白分画を逆相クロマトグラフィーを用いてさらに細分画したが、いずれの分画でも活性が維持できず、特定の蛋白の同定には至らなかった。そこで、血小板活性化により放出される既知の 30kDa 以下の分子 (PF4、RANTES、MIP-1 α 、MCP-3、NAP-2、IL-8、GRO- α 、ENA-78、TARC、IL-7、EGF、bFGF、TGF- β 1、PDGF) を候補とし、それらの MEP 誘導活性をスクリーニングした。その結果、SDF-1 を添加した培養において濃度依存性に MEP 分離効率が上昇した (図 2)。さらに、その作用は SDF-1 受容体 (CXCR4) アンタゴニスト AMD3100 の添加で抑制された。一方、SDF-1 の受容体である CXCR4 の発現レベルが低い末梢血単球 (CXCR4^{low} 細胞) と CXCR4 の発現レベルの高い単球 (CXCR4^{high} 細胞) をフローサイトメトリーでソートして MEP 誘導効率を比較検討したところ CXCR4^{high} 細胞に MEP が多く含まれることが明らかとなった。

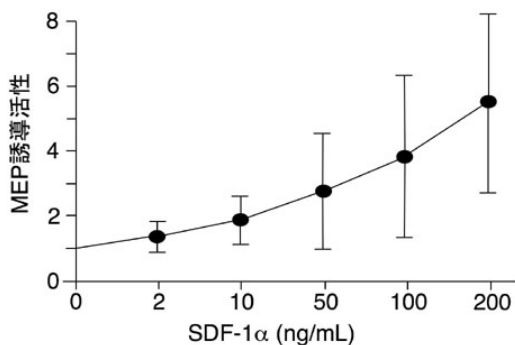


図 2. SDF-1 添加により濃度依存性に上昇する MEP 誘導活性

(3) MEP の定量と分化能の解析

強皮症、関節リウマチ、健康人における末梢血 MEP 数を比べると、強皮症で有意に増加していた ($P=0.01$) (図 3)。Matrigel® culture

を用いた *in vitro* での管腔構造形成能の評価したところ、強皮症由来の MEP は健康人由来の MEP に比較して管腔構造の伸張率が有意に高かった ($P=0.0007$)。一方、MEP が HUVEC の管腔構造に取り込まれる効率を検討すると、強皮症 MEP 自身が血管内皮に分化する能力は健康人 MEP に比較して有意に低かった ($P=0.01$)。SCID マウスを用いた *in vivo* での腫瘍血管新生モデルでは、CT-26 とともに強皮症 MEP を移植すると、健康人 MEP を用いた場合に比べて腫瘍サイズが有意に増大した ($P=0.05$)。腫瘍切片の HE 染色、免疫染色の検討では、強皮症 MEP を移植した切片では、健康人に比較して血管腔数が有意に増加していた ($P=0.03$)。一方で、マウス CD31 陽性の管腔構造に取り込まれるヒト CD31 陽性 MEP 由来血管内皮細胞数をカウントすると、強皮症では健康人に比較して有意に低下していた ($P=0.03$)。

したがって、強皮症患者では MEP は増加し、それらの血管形成促進能が亢進していた。しかし、それ自身が血管内皮に分化する能力は低下していることから、CEP 同様に十分に血管修復を行えないことが判明した。

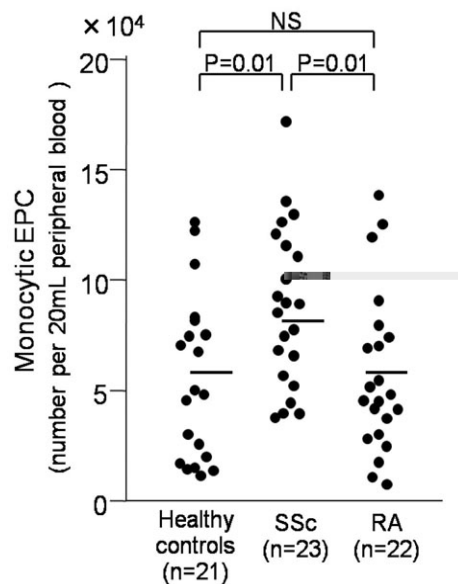


図 3. 強皮症、関節リウマチ、健康人における MEP

(4) MEP の遺伝子発現解析

cDNA アレイを用いて健康人および強皮症由来の末梢血単球の間で発現レベルに差のある遺伝子をスクリーニングした。その結果、8 種類の遺伝子が強皮症単球で発現レベルの高い候補として抽出された。それら遺伝子について、強皮症 34 例と健康人 32 例を対象に半定量および定量的 PCR により mRNA 発現レベルを比較し、強皮症単球で高発現する遺伝子として MCP-1 と Versican が同定された

(図4)。単球培養上清中の MCP-1 濃度を検討したところ、健常人に比較して強皮症で高い傾向にあったが有意差を認めなかった。一方、単球の培養上清中に分泌された Versican を免疫プロットで調べたところ、健常人に比較して強皮症で有意に高かった (P=0.01)。強皮症および健常人由来の末梢血単球中における MCP-1 および Versican の局在を免疫染色で検討したところ、両者ともゴルジ体中に偏在していた。また、単球上の $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンと CXCR4 の発現レベルを強皮症と健常人で比較したが、有意な差は得られなかった。さらに、versican の細胞遊走に与える影響を追究するため、CS 鎖をコートしたプレートに MCP-1 を添加し、CS 鎖に結合した MCP-1 が濃度勾配により MEP の遊走を誘導するかを検討した。その結果、CS 鎖は MCP-1 の拡散を防止することで単球の遊走を促進した。MCP-1 に対する中和抗体存在下で遊走活性が抑制された。また、CS 鎖による MEP 遊走促進作用はコートした CS 鎖の量に依存して増強した。

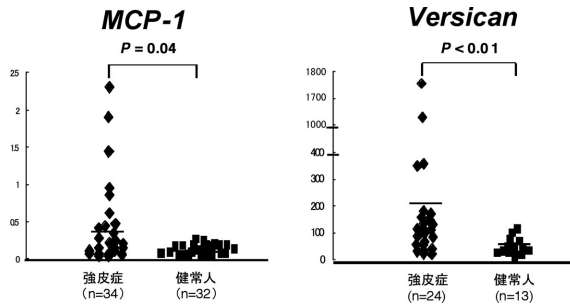


図4. 強皮症、健常人由来単球における MCP-1 と versican の mRNA 発現

(5) 結語

EPC サブセットである CEP と MEP 両者の機能異常が強皮症特有の血管病変と線維化病態を誘導することが明らかとなった。EPC が強皮症に対する新たな治療法の標的となることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- Hoshi M, Yasuoka H, Kuwana M. Estrogen receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2008; 26(5): 914-917. 査読有
- Kawai M, Masuda A, Kuwana M. A CD40-CD154 interaction in tissue fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(11): 3562-3573. 査読有
- Seta N, Okazaki Y, Kuwana M. Human circulating monocytes can express receptor activator of nuclear

factor κB ligand and differentiate into functional osteoclasts without exogenous stimulation. *Immunol. Cell Biol.* 2008; 86(5): 453-459. 査読有

- Seta N, Kuwana M. Human circulating monocytes as multipotential progenitors. *Keio J. Med.* 2007; 56(2): 41-47. 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

- 増田 絢子、安岡 秀剛、山口 由衣、岡崎 有佳、佐藤 隆司、桑名 正隆: 強皮症末梢血単球のフェノタイプ解析. 第 12 回強皮症研究会 (東京). 2009. 1. 17
- 増田 絢子、安岡 秀剛、山口 由衣、佐藤 隆司、桑名 正隆: Fibrogenic gene expression profiles in circulating monocytes from patients with systemic sclerosis (SSc). 第 38 回日本免疫学会総会 (京都). 2008. 12. 3.
- Hoshino K, Satoh T, Kuwana M: Hepatocyte growth factor promoter gene polymorphism controls severity of interstitial lung disease in patients with systemic sclerosis. The 72nd Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (San Francisco). 2008. 10. 27
- Kuwana M: Insufficient repair as a mechanism for scleroderma vasculopathy. 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (Yokohama). 2008. 9. 24
- Kuwana M: Circulating endothelial cell progenitors in scleroderma. The 10th International Workshop for Scleroderma Research (Cambridge). 2008. 8. 5
- 星野 香菜、佐藤 隆司、桑名 正隆: 強皮症における HGF 及びその受容体の一塩基多型解析. 第 52 回日本リウマチ学会総会 (札幌). 2008. 4. 22
- 増田 絢子、山口 由衣、岡崎 有佳、佐藤 隆司、桑名 正隆: 強皮症末梢血単球のフェノタイプ解析. 第 52 回日本リウマチ学会総会 (札幌). 2008. 4. 22
- 桑名 正隆、山口 由衣、増田 絢子、岡崎 有佳、高橋 一夫、池澤 善郎: 強皮症における単球系血管内皮前駆細胞 (MEP) の解析. 第 11 回強皮症研究会 (東京). 2008. 1. 19

9. 星野香菜、佐藤隆司、桑名正隆：強皮症における HGF およびその受容体の一塩基多型 (SNP) 解析. 第 11 回強皮症研究会 (東京). 2008. 1. 19
10. Yamaguchi Y, Okazaki Y, Seta N, Satoh T, Takahashi K, Ikezawa Z, Kuwana M: Paradoxical increase in monocytic progenitors for endothelial cells in patients with systemic sclerosis. The 71th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Boston). 2007. 11. 8
11. Kuwana M: Deficient vascular repair as a mechanism for scleroderma vascular disease. Professor E. Carwile LeRoy Memorial International Workshop on Scleroderma (Tokyo). 2007. 5. 19
12. Kuwana M, Kawai M, Furuya Y: A critical role of the CD40-CD154 interaction in fibroblast activation. Professor E. Carwile LeRoy Memorial International Workshop on Scleroderma (Tokyo). 2007. 5. 18
13. Hoshino K, Satoh T, Kuwana M: Hepatocyte growth factor gene polymorphism can predict end stage lung disease in patients with systemic sclerosis. Professor E. Carwile LeRoy Memorial International Workshop on Scleroderma (Tokyo). 2007. 5. 18

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：単球由来多能性細胞 (MOMC) の効率的な作製法

発明者：桑名正隆、加藤尚志、瀬田範行、宮崎洋

権利者：学校法人 慶應義塾

番号：特許出願 2007-275461

出願年月日：2007 年 10 月 23 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑名 正隆 (KUWANA MASATAKA)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：50245479

(2) 研究分担者

瀬田 範行 (SETA NORIYUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40338372

佐藤 隆司 (SATOH TAKASHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90407114

金子 祐子 (KANEKO YUKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60317112

井上 有美子 (INOUE YUMIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60348638

(3) 連携研究者

なし