

平成 22 年 6 月 14 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790540

研究課題名（和文） 循環血液中 fibrocyte の心血管組織リモデリングでの役割の解明

研究課題名（英文） The role of circulating fibrocytes for cardiovascular remodeling

研究代表者

天野 克也 (AMANO KATSUYA)

京都府立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：70468263

研究成果の概要（和文）：循環血液中の骨髄由来 fibrocyte が線維芽細胞や、筋線維芽細胞に分化し、創傷の治癒にかかわっていることが報告されている。この研究課題において心筋リモデリングや動脈硬化など線維化をともなう病態において Fibrocyte がどのように影響するかをマウスモデルを用いて検討したが循環器疾患における Fibrocyte の繊維化における役割は少ないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The human peripheral blood contains fibrocytes that can differentiate into other mesenchymal cells, such as myofibroblasts and adipocytes . In this study, we examined the role of fibrocytes in cardiovascular disease. We suggest that fibrocytes are not the critical role in cardiovascular disease such as infarcted myocardium, over pressure load and ischemic limb disease in a mouse model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子血管病態学

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患、高血圧性心疾患などにおける心筋組織のリモデリングや、動脈硬化層や血管内皮細胞障害後の新生内膜肥厚などの血管リモデリングは、病変局所での線維化がその中心的な病態である。臓器の線維化はコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックス (ECM) が、組織に沈着した病態であり、その ECM を産生しているのが線維芽細胞や筋線維芽細胞であり、これら細胞の病変局所への動員・増殖と Collagen 線維産生が、組織線維化リモデリングをもたらす。このメカニズムを解明し、制御法を開発することは、心血管疾患の新たな創薬につながる。

従来、Collagen 線維を産生する線維芽細胞は、障害組織において活性化、増殖し、線維成分を産生すると考えられてきた。ところが、近年、循環血液中に、骨髄由来の線維芽細胞の前駆細胞として位置づけられる fibrocyte が存在し、それが創傷部位に遊走、組織内に浸潤し、線維芽細胞や、筋線維芽細胞に分化し、創傷の治癒にかかわっていることが報告され、解析が進められている (Quan et al., Int. J. of Biochem. & Cell Biol. 2004. 598-606 Review)。

今回、骨髄由来の循環血液中 Fibrocyte が、心血管病変局所に動員され、線維化リモデリング促進作用を持つことを明らかにする。

2. 研究の目的

今回、骨髄由来の循環血液中 fibrocyte が、心血管病変局所に動員され、線維化リモデリング促進作用を持つことを明らかにするために心筋虚血、心筋圧負荷、下肢虚血 (ASO) モデルにおいて、循環血液中および、病変局所で、骨髄由来の fibrocyte がどの程度存在

するか調べる。また、それらの線維化リモデリングでの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

1) GFP 過剰発現マウス由来骨髄細胞置換マウス作成

GFP過剰発現マウス由来の骨髄細胞で骨髄を置換したマウスを作成する。方法は、recipient のC57Bl/6 マウスに 9.5Gyの放射線照射を行い、GFP-トランスジェニックマウス (同系C57Bl/6) の骨髄細胞、 2.5×10^7 乗個を尾静脈から移植する。その後骨髄が再建されるまで、S P F 環境のもと 3 週間抗生剤投与を行う。骨髄の再構築がなされる 4~6 週後に、下記の如く心筋梗塞モデル、圧負荷モデル、ASOモデルを作成する。

心筋梗塞モデル:

マウスに気管内挿管し全身麻酔をおこなう。その後胸骨左第 4 肋間を開胸し、左冠動脈前下降枝を結紮し心筋梗塞モデルを作成する。

圧負荷モデルマウス:

マウスにペントバルビタールを腹腔内に投与し全身麻酔をかける。その後左側腹部を切開し腸管をよけながら腹部大動脈を露出する。その後 16G 針を腹部大動脈にあてがいナイロン糸で結紮し圧負荷モデルを作成する。

下肢虚血 (ASO) モデル:

マウスにペントバルビタールを腹腔内に投与し全身麻酔をかける。右鼠径部を切開し大腿動脈、静脈、神経を露出する。その後神経を傷つけないように動脈、静脈から剥離する。その後、鼠径靭帯レベル、膝レベルで動脈、静脈を結紮、さらに膝上からの側腹血管も結

繋しその後切除し ASO モデルを作成した。

2) フローサイトメトリー

モデル作成後、Day0、1、3、14、28 日目にマウス尾静脈より採血を行いフローサイトメトリーにて細胞表面マーカーの解析を行う。染色は CD34、CD11b、CD31、CD45、CXCR4+、CD45RO+、collagen type1 を行う。機械は FACS caliber を使用する。

3) 組織免疫染色

モデル作成後、Day0、1、3、14、28 日目に組織を採取し凍結切片を作成する。その後 CD34、CD11b、CD31、CD45、Vimentin、 α -smooth muscle Actin、 α -sarcomeric Actin、vWF で組織免疫染色を行い共焦点顕微鏡 (Olympus 社 FV1000) を用いて観察する。

4. 研究成果

まず末梢血液サンプルで、CD34 陽性/collagen type1 陽性 fibrocyte の増加の有無を検討した。さらに、同細胞において CD11b 陽性 / collagen type1 陽性/CXCR4 陽性/CD45 陰性の既知の fibrocyte のマーカーの検討も行った。結果 CD34 陽性/collagen type1 陽性細胞は心筋梗塞モデル、圧負荷モデル、ASO モデルにおいてコントロール群で $0.03 \pm 0.012\%$ 、モデル作成群で $0.01 \pm 0.018\%$ の範囲であった。さらに、同細胞において CD34 陽性/CD11b 陽性、collagen type1 陽性/CD45 陰性細胞の検討をおこなったところ我々の検討では CD34+/CD11b+細胞が $0.01 \pm 0.011\%$ であった。collagen type1 陽性/CD45 陰性細胞は $0.00 \pm 0.014\%$ であった。よってコントロール群と比較し各モデルにおいて有意な増加は確認できなかった。また組織免疫染色を行い、共焦点顕微鏡を用いて、CD34、CD11b、CD31、

CD45、vimentin、 α -smooth muscle actin、 α -sarcomeric actin、vWF、染色を行った。心筋梗塞モデル、ASO モデルで vWF、CD31 染色陽性細胞はコントロール群と比べ心筋梗塞モデルで marginal zone を中心に最大 1.15、ASO モデルでは虚血障害部位に 1.28 倍増加しており同モデルにおいて血管新生が起こっていることが確認された。 α -smooth muscle actin 染色、 α -sarcomeric actin 染色の増加は各モデルで確認できなかった。vimentin 染色は各モデルで陽性細胞の増加が確認された。また GFP 陽性 fibrocyte が、これらのうちの細胞に分化しているかを 2 重染色で評価した。まずすべてのコントロール群で GFP 陽性細胞は認められなかった。心筋梗塞モデル、ASO モデルの Day14、28 で GFP 陽性細胞が少数 ($1 \pm 1/5000$ 細胞) 確認された。圧負荷モデルでは GFP 陽性細胞は認めなかった。ただ前述の表面マーカー (vimentin、 α -smooth muscle actin、 α -sarcomeric actin、vWF、CD31 染色) と GFP の Double Positive 細胞は確認できず、結果から in vivo において fibrocyte の fibroblast、血管内皮細胞、平滑筋細胞、心筋細胞への分化については確認できなかった。また T 細胞の集積を確認するために CD8 染色を行ったところ心筋梗塞モデル、ASO モデルではモデル作成初期に梗塞部位とその周辺に多く集積されていた。さらに GFP+細胞が無いか検討したところ Double Positive 細胞は確認されなかった。それぞれ CD8 陽性、GFP 陽性の存在部位に関しては GFP 陽性細胞が非常に僅少で評価はむずかしいが CD8 陽性細胞が多く認められる部位に GFP 陽性細胞が一部確認された。一方圧負荷モデルにおいては CD8 陽性細胞する細胞は vWF 陽性細胞周辺に多く観察され血管周囲に細胞が集積されていることが確認された。GFP 陽性細胞は確認できなかった。

以上より fibrocyte の心筋梗塞モデル、ASO モデルではわずかながら病変部に fibrocyte の認めが 心筋、骨格筋線維化に影響した程度は低いと思われ今回おこなったモデルでは骨髄由来の fibroicyte が線維化に寄与している可能性は少ないと考えられる結果となった。これらのことから今回検討した循環器疾患においては骨髄からの影響よりむしろ臓器内組織での線維化の検討がリモデリングメカニズムの解明においては有効であると考えられた。

研究者番号：

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/med2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野 克也 (AMANO KATSUYA)

京都府立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：70468263

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()