

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390300

研究課題名(和文) 膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症の病態における骨髄由来細胞の役割の
解明研究課題名(英文) Roles of bone marrow-derived cells in pathogenesis of pulmonary
arterial hypertension associated with connective tissue diseases

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(和文):

強皮症に伴う肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は予後不良の難治性病態であるが、その詳細なメカニズムは明らかでない。そこで、血管修復過程で重要な働きを担う血管内皮前駆細胞 (EPC) の異常が PAH 病態に關与する仮説を検証した。その結果、強皮症患者では EPC の血管修復能が低下し、一方で線維化を促進する活性が高かった。これらの傾向は PAH 例で特に顕著で、さらに PAH 例では EPC の組織への浸潤活性が高かった。以上より、EPC が強皮症の PAH を含む血管病変に対する新たな治療標的となることが明らかにされた。

研究成果の概要(英文):

Pulmonary arterial hypertension (PAH) associated with systemic sclerosis (SSc) is one of intractable conditions with poor prognosis, but its pathogenic process is largely unknown. We have examined potential roles of endothelial progenitor cells (EPCs), which are involved in vascular repair, in the pathogenesis of PAH associated with SSc. As a result, EPCs in patients with SSc exhibited impaired vascular repair machinery, but had enhanced pro-fibrotic capacity. These EPC properties are the most prominent in SSc patients with PAH, and invasion capacity is augmented in EPCs derived from such patients. In summary, aberrant circulating EPC is a novel therapeutic target in PAH associated with SSc.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

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・アレルギー内科学

キーワード：膠原病学

1. 研究開始当初の背景

近年の新規治療薬の導入や合併症対策により膠原病の予後は改善したが、難治性病態として残されている病変のひとつが強皮症や混合性結合組織病 (MCTD) に伴う肺動脈性肺高血圧症 (PAH) である。PAH は無治療だと

診断後 3 年以内に 70%以上が死亡する予後不良病態である。最近導入された肺血管拡張薬は自覚症状を改善するだけでなく、ある程度の延命効果も実証されている。しかし、これら薬剤には進行した血管リモデリングを元

に戻す効果は期待できない。したがって、病態形成機序に基づいた根治的治療の開発が切望される。

PAHの基本病態は肺動脈の内腔狭窄で、血管平滑筋、内皮細胞の増殖と線維化から構成される。これまでPAHの病態解明のために様々なアプローチが試されてきたが、いまだ病変形成の詳細なメカニズムは明らかでない。一方、PAHを高率に伴う強皮症やMCTDはレイノー現象、手指潰瘍などの末梢循環障害を有する。末梢動脈の病理組織はPAHにみられる肺動脈の病理像に酷似することから、末梢と肺動脈に共通する病態形成メカニズムの存在が想定される。そこで、膠原病患者にみられる末梢と肺動脈病変を一元的に説明する機序として、循環血中の骨髄由来細胞の関与を想定した。

申請者は強皮症の末梢動脈病変の形成機序として、血管内皮前駆細胞(EPC)の異常に起因する血管リモデリング不全によるという新たな病態概念を世界に先駆けて提唱した(*Lancet* 2004;364:603)。EPCは骨髄由来の循環細胞で、成人における損傷血管内皮の修復や脈管形成の過程で血管壁にホーミングし、成熟血管内皮へと分化する。EPCは多様な細胞群であることが明らかにされており、CD34⁺CD133⁺VEGFR2⁺で血管内皮に限定した分化能を有する未分化EPC(iEPC)と、単球分画に含まれる単球系EPC(mEPC)の少なくとも2つの異なるサブセットを含む。申請者は強皮症患者でiEPCの著減と血管内皮への分化障害を報告している。一方、mEPCが骨格筋、平滑筋、線維芽細胞など間葉系細胞への分化能を有することを世界に先駆けて報告し(*J Leukoc Biol* 2003;74:833)強皮症患者でのmEPCの増加を見出している。これらEPCの質的・機能的異常により血管リモデリング過程が障害され、強皮症に特有な内腔狭窄病変が形成される可能性を想定し、「EPCの量的かつ質的異常が末梢循環障害のみならずPAH病態を誘導する」仮説を提唱した。

2. 研究の目的

強皮症患者のPAH病態形成における骨髄由来細胞の関与を追究するため、iEPCとmEPCに注目して上記仮説を検証する。

3. 研究の方法

(1) 対象

アメリカリウマチ学会分類基準を満たす強皮症70例を対象とした。そのうち、24例がびまん皮膚硬化型(dcSSc)、46例が限局皮膚硬化型(lcSSc)であった。8例が心臓カテ

ーテル検査で安静時肺動脈圧が25mmHg以上、かつ肺毛細血管楔入圧が15mmHg未満、高度の間質性肺疾患(%FVCが70%以下)・肺血栓塞栓症がなく、PAHを併発していた。対照として、性、年齢を一致させた健常人24例を用いた。本研究計画は学内の倫理委員会で承認されており、全ての提供者には文書を用いて説明し、文書による同意を取得した。

(2) iEPCの定量

末梢血単核球から磁気ビーズを用いてCD34⁺細胞を濃縮し、フローサイトメトリーによりCD34⁺CD133⁺VEGFR2⁺細胞を検出した。蛍光標識ビーズを用いて末梢血1mLあたりの実数として定量化した。

(3) iEPCの分化能評価

末梢血単核球から磁気ビーズを用いてCD133⁺細胞を分離し、マウス大腸癌細胞株CT-26とともに免疫不全(SCID)マウスの皮下に投与した。10日後に皮下腫瘍を摘出し、その容積、単位面積あたりの新生血管数、ヒトCD133⁺細胞由来の血管内皮細胞を取り込んだ血管の割合を調べた。

(4) mEPCの定量法

末梢血単核球から磁気ビーズを用いてCD14⁺細胞を分離し、RPMI培地(10%胎児ウシ血清含有)に浮遊後、自己血小板とともにフィブロネクチン上で10日間培養した。ランダムな6視野における紡錘形をした付着細胞を数え、末梢血1mLあたりのmEPC数として定量した。

(5) mEPCの分化能評価

分離したmEPCの血管内皮細胞への分化能はMatrigel中でのヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)との共培養による管腔構造形成により評価した。また、CT-26とともにSCIDマウスへ移植する*in vivo*の解析も行った。線維芽細胞への分化能は型コラーゲン上での7日間の培養による型コラーゲン発現能により評価した。

(6) mEPCの遺伝子発現解析

末梢血CD14⁺細胞および10日間の培養により分離したmEPCよりRNAを精製し、遺伝子アレイ(SuperArray社製)による半網羅的な遺伝子発現比較を行った。SScもしくはPAHに特異的な発現変化を示す遺伝子を抽出し、定量的PCRおよび蛋白レベルでの発現差を確認した。

4. 研究成果

(1) PAHにおけるiEPC数

強皮症におけるiEPCに関する従来の報告結果は一致しておらず、強皮症で増加、減少両者が混在していた。そこで、各種測定法を

比較することで定量法の標準化を行った。その上で強皮症 31 例（うち PAH8 例） 健常人 23 例を対象に iEPC 数を比較したところ、健常人に比べて強皮症で有意に少なく、特に PAH 例では減少が顕著であった（図 1）。

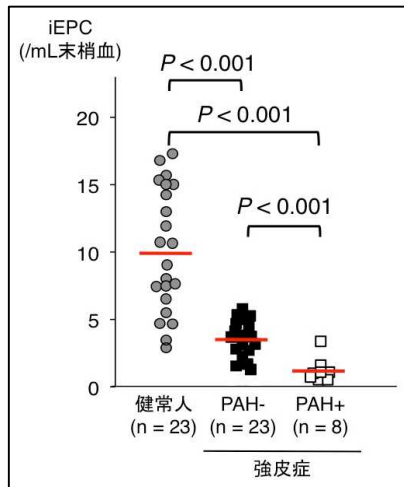


図 1. 末梢血 iEPC 数

(2) PAH における iEPC 機能

iEPC の脈管形成能を調べるために CD133⁺ 細胞を大腸癌細胞株とともに SCID マウス皮下に移植したところ、強皮症由来細胞は健常人由来細胞に比べて有意に腫瘍増大活性が低かった ($P = 0.004$)。腫瘍内の新生血管の密度を比較すると、強皮症で有意に低く、特に PAH 例における血管密度は健常人の約 1/3 にすぎなかった（図 2）。さらに、ヒトとマウス由来の血管内皮細胞を種特異的な抗 CD31 抗体で染め分けると、ヒト iEPC から分化した血管内皮を取り込んだ新生血管数は強皮症で健常人に比べて有意に少なかった ($P < 0.001$)。PAH 例では血管内皮に分化した iEPC がほとんど検出されなかった。

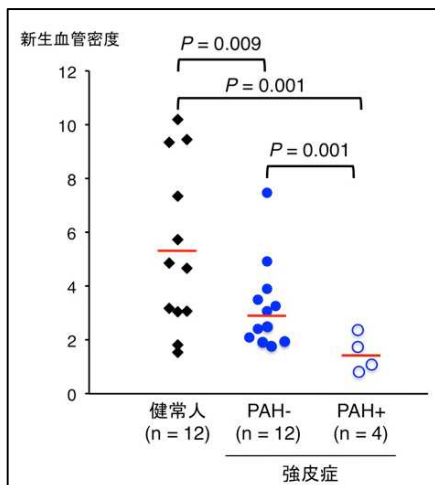


図 2. iEPC の血管新生能

(3) PAH における mEPC 数

mEPC をフィブロネクチンへの接着により分離し、その数を求めた（図 3）。その結果、iEPC と異なり強皮症で健常人に比べて有意に増加していた。特に PAH 例では顕著な増加を示した。分離された mEPC のフェノタイプをフローサイトメトリーと免疫染色により検討したところ、強皮症、健常人ともに $CD14^+CD45^+CD34^+CD31^+CD144^+VEGFR1^+$ で明らかな差を認めなかった。

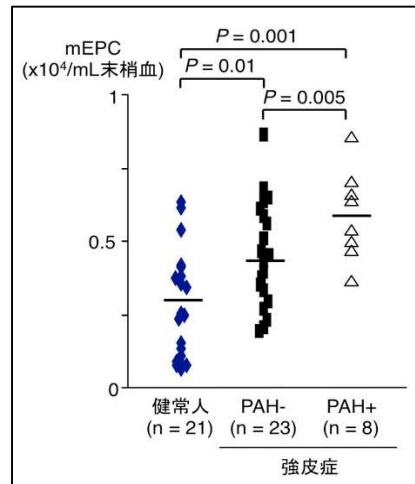


図 3. 末梢血 mEPC 数

(4) PAH における mEPC の分化能

分離した mEPC を HUVEC とともに Matrigel 中で培養したところ管腔構造が形成された。単位面積あたりの管腔の長さを比較すると、強皮症由来細胞で健常人由来細胞に比べて有意に管腔形成能が亢進していた ($P < 0.001$)。この活性は mEPC の培養上清を HUVEC 単独の培養に加えてもみられたことから、mEPC が産生する液性因子が関与することが明らかとなった。培養上清中の管腔形成促進活性も強皮症で健常人に比べて高かった ($P = 0.04$)。

さらに、mEPC を大腸癌細胞株とともに SCID マウスへ移植すると、強皮症由来 mEPC の方が健常人由来 mEPC よりも腫瘍形成促進活性は高く ($P = 0.03$) 新生血管密度も高かった（図 4）。ただし、ヒト mEPC から分化した血管内皮を取り込んだ新生血管数は強皮症で健常人に比べて有意に少なかった。したがって、強皮症由来 mEPC は液性因子産生を介して血管新生を促進するが、それ自身が血管内皮に分化する能力は低いことが明らかとなった。

一方、mEPC の間葉系細胞への分化能を誘導培養で検討すると、強皮症由来細胞は健常人に比べて型コラーゲン mRNA の発現量が有意に高かった ($P = 0.01$)。ただし、PAH の

有無による発現量の差はなかった。

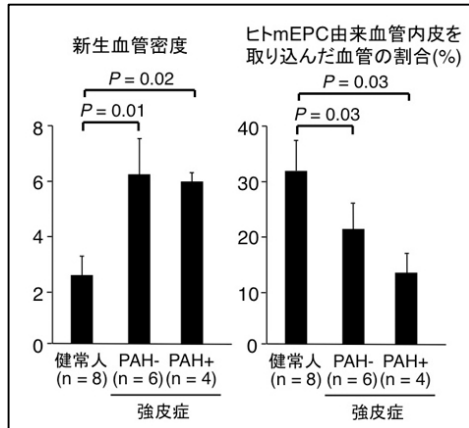


図 4. mEPC の血管新生能と血管内皮への分化能

(5) PAH 由来単球の遺伝子発現解析

末梢血中 mEPC における遺伝子発現プロファイルを強皮症と健康人で比較するため、CD14⁺単球における遺伝子発現を Oligo GEArray を用いて網羅的に検討した。その結果、強皮症で高発現する遺伝子の候補として型コラーゲン、versican/CSPG2、MCP-1、L selectin が抽出された。多数例を用いた定量的 PCR による検討の結果、versican と MCP-1 が強皮症に高発現する遺伝子として同定された。さらに、単球における蛋白レベルでの発現を検討したところ、両者ともに統計学的に有意に強皮症で発現が高かった(図 5)。ただし、PAH の有無で層別化しても差を認めなかった。Versican は MCP-1 や SDF-1 など線維化促進に働くケモカインを結合するリザーバとして機能を有する。

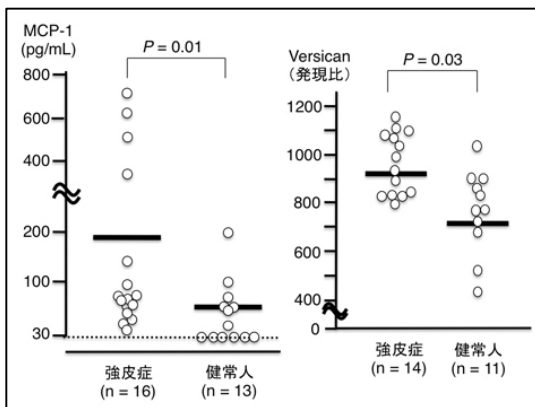


図 5. mEPC における MCP-1、versican の蛋白発現レベル

次に同様の遺伝子発現解析を、強皮症患者を対象として PAH の有無で比較した。その結果、PAH 例の末梢血 CD14⁺細胞で高発現する遺伝子として CCR6 と occludin が同定された。これら蛋白は mEPC の遊走、浸潤に関わるこ

とから、血管壁のリモデリングに關与する可能性が考えられた。

(6) 強皮症 PAH における EPC の役割

今回の研究成果から新たに得られた知見から、強皮症の PAH を含む血管病変形成における EPC の役割が明確にされた(図 6)。すなわち、iEPC 減少と機能不全により傷害された肺動脈の修復が十分に行われず、その代償として局所での VEGF や各種ケモカイン産生が亢進することで骨髄から mEPC が動員され、mEPC は血管内皮への分化能が障害され、むしろ線維芽細胞へと分化転換し、mEPC はさらに各種ケモカイン、線維化促進因子を産生することで局所の平滑筋細胞や線維芽細胞の増殖や活性化を誘導し、炎症性細胞浸潤、凝固能亢進と相まって PAH 病態形成を増幅する。さらに、mEPC の肺へのホーミング、浸潤活性が PAH 発症を規定していた。以上より、EPC 異常を是正する手法が強皮症の血管病変、さらには PAH に対する新たな治療法としてきわめて有用と考えられた。

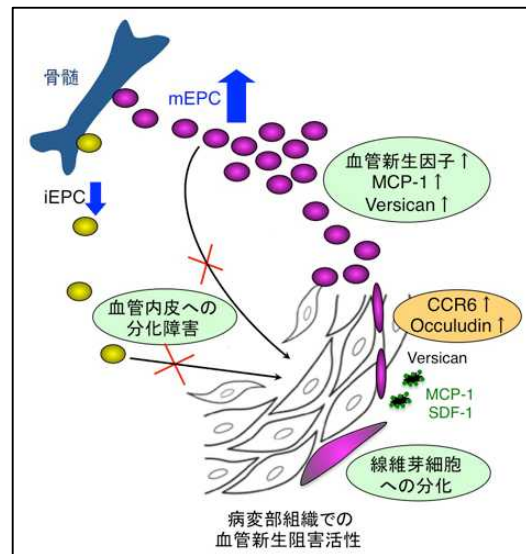


図 6. 強皮症の PAH を含む血管病変形成における EPC の役割

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Kuwana M, Okazaki Y. Quantification of circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: a direct comparison of protocols. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(4):617-20. 査読有
2. Hattori H, Suzuki S, Okazaki Y, Suzuki N, Kuwana M. Intracranial transplantation of monocyte derived multipotential cells enhances recovery after ischemic stroke in rats.

- J Neurosci Res.* 2012;90(2):479-88. 査読有
3. Hoshino K, Satoh T, Kawaguchi Y, Kuwana M. Association of *Hepatocyte Growth Factor* promoter polymorphism with severity of interstitial lung disease in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2011;63(8):2465-72. 査読有
 4. 桑名正隆: 膠原病 - 新たな治療戦略; 膠原病診療の実際: 全身性硬化症. 臨床と研究 2010;87(9):1209-13. 査読無
 5. Yamaguchi Y, Okazaki Y, Seta N, Satoh T, Takahashi K, Ikezawa Z, Kuwana M. Enhanced angiogenic potency of monocytic endothelial progenitor cells in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(6):R205. 査読有
 6. Furuya Y, Okazaki Y, Kaji K, Sato S, Takehara K, Kuwana M. Mobilization of endothelial progenitor cells by intravenous cyclophosphamide in patients with systemic sclerosis: potential association with efficacy for interstitial lung disease. *Rheumatology.* 2010;49(12):2375-80. 査読有
 7. Furuya Y, Satoh T, Kuwana M. Interleukin-6 as a potential therapeutic target for pulmonary arterial hypertension. *Int J Rheumatol.* 2010;2010:720305. 査読有
 8. Seta N, Kuwana M. Derivation of multipotent progenitors from human circulating CD14⁺ monocytes. *Exp Hematol.* 2010;38(7):557-63. 査読有

[学会発表](計10件)

1. Kuwana M: Angiogenesis and vasculogenesis in systemic sclerosis - review and gaps in the evidence. 2nd Systemic Sclerosis World Congress (Madrid). 2012.2.4.
2. Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, Takeuchi T: Impaired *in vivo* neovascularization capacity of endothelial progenitor cells in patients with systemic sclerosis. The 75th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Chicago). 2011.11.7.
3. 桑名正隆: カレントシンポジウム; 膠原

- 病の診療最前線; 強皮症. 第55回日本リウマチ学会総会(神戸). 2011.7.20.
4. Kuwana M: Organ involvement in early SSc. 4th International Systemic Sclerosis Forum - Combating Morbidity and Mortality (Barcelona). 2011.2.5.
 5. 佐藤隆司, 岡崎有佳, 白井悠一郎, 安岡秀剛, 竹内勤, 桑名正隆: 強皮症患者における VEGF および HIF-1 の一塩基多型解析. 第54回日本リウマチ学会総会(神戸). 2010.4.24. (ワークショップ: MCTD・強皮症1)
 6. 岡崎有佳, 佐藤隆司, 安岡秀剛, 竹内勤, 桑名正隆: 強皮症における循環血管内皮前駆細胞(EPC)数の再検討. 第54回日本リウマチ学会総会(神戸). 2010.4.24. (ワークショップ: MCTD・強皮症2)
 7. Yasuoka H, Masuda A, Yamaguchi Y, Satoh T, Kuwana M: Upregulated expression of versican in monocytes from patients with systemic sclerosis: role in amplification of MCP-1 activity at site of fibrosis. 1st Systemic Sclerosis World Congress (Florence). 2010.2.12.
 8. Satoh T, Hoshino K, Kuwana M: The gene polymorphism within hepatocyte growth factor promoter controls progression of systemic sclerosis associated interstitial lung disease. 1st Systemic Sclerosis World Congress (Florence). 2010.2.13.
 9. Shirai Y, Yasuoka H, Takeuchi T, Satoh T, Kuwana M: Clinical and immunological characteristics of Japanese patients with connective tissue disease and pulmonary arterial hypertension. 1st Systemic Sclerosis World Congress (Florence). 2010.2.13.
 10. Okazaki Y, Satoh T, Yasuoka H, Kuwana M: Quantification of circulating endothelial progenitor cells: verification of the EUSTAR recommendations. 1st Systemic Sclerosis World Congress (Florence). 2010.2.13.

[図書](計2件)

1. 桑名正隆: 強皮症. 最新内科学、西村書店、東京、印刷中.
2. 桑名正隆: 全身性硬化症(強皮症). 間質性肺疾患診療マニュアル、南江堂、pp228-233, 2010.

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)
北里大学・医療衛生学部・助教
研究者番号：90407114
(H21年度のみ)

古屋 善章 (FURUYA YOSHIAKI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：30424154
(H21年度のみ)

(3)連携研究者

なし