

## 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25年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590796

研究課題名（和文）血管内皮前駆細胞の起源、分化過程及びその血管生物学的機能特性の体系的解明

研究課題名（英文）Vascular Biological Profile on Endothelial Progenitor Cell Origin and Differentiation

研究代表者

増田 治史 (MASUDA HARUCHIKA)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：50278496

研究成果の概要（和文）：血管修復・再生能を有する血液中血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell = EPC) は虚血性疾患における診断及び治療的意義が見出されているが、その起源及び機能性分化過程は未解明である。本研究では、EPC分化動態解析法及び増幅分化培養法を独自に開発し、これらの手法を用いてEPC起源と分化過程を解明した。この結果は、機能的EPC分化動態を基盤とする虚血性疾患の診断法及びEPC移植血管再生療法の開発に繋がることと期待される。

研究成果の概要（英文）：Circulating endothelial progenitor cell (EPC) is known to possess vascular repair/regeneration ability. However, the origin and differentiation cascade has yet to be elucidated. Our established analytical assay system of EPC expansion and differentiation revealed the functional features of EPC origin and differentiation. The findings provide us the potent information to develop diagnostic and therapeutic strategies for cardiovascular diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2013年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：血管内皮前駆細胞、血管再生、分化、造血幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 血管内皮前駆細胞 (Endothelial progenitor cell = EPC) は、1997年に骨髄由来血液幹/前駆細胞 (CD34+ または CD133+ 細胞) 分画中の血管内皮系分化能を有する細胞としてその存在が証明され、以後、循環器領域において生体内動態が解析され、診断/治療的意義が判明している。すなわち心血管危険因子（糖尿病、喫煙、高血圧）群にお

ける EPC 動態低下が報告される一方、EPC が血管再生能を有することから虚血性疾患を対象として本細胞移植療法が臨床応用されている。

(2) 末梢血中 EPC は、末梢血単核球及びその培養により出現する接着性細胞の内皮細胞系細胞マーカーの FACS や免疫染色により同定されその数や機能が評価されている。しかし、正確な EPC 分化動態解析法がなく、解析

法が研究者により様々で、EPC 分化過程の解析が断片的であることは、EPC の診断/治療応用を目的としたトランスレーショナルリサーチにとって大きな弊害となっている。

## 2. 研究の目的

(1) EPC の起源、分化過程のプロファイリングを行い、その血管生物学的機能の相違を解明する。

(2) 臨床応用可能な機能的 EPC 分化過程の体系的/客観的標準化を行い、虚血性疾患における EPC の機能的分化動態解析を用いた診断法及び治療法の開発に繋げる。

## 3. 研究の方法

(1) EPC 分化動態解析法；

① 造血幹細胞 (CD34+細胞) の採取；臍帯血から Histopaque-1077 を用いた比重遠心法により単核球を採取し、AutoMACS (Miltenyi Biotec.) を用いた CD34 抗体ビーズ法により造血幹細胞 (CD34+細胞) を採取した。

② EPC 分化動態解析法 (EPC colony forming assay = EPC-CFA)；H4236 (Stem Cell Tec.) のメチルセルロース半固形培地に 30% FBS, ヒト遺伝子組み換え 100 ng/mL SCF, 50 ng/mL VEGF, 50 ng/mL IGF-1, 50 ng/mL EGF, 50 ng/mL basic FGF, 20ng/mL IL-3 及び 2IU/mL heparin を添加し 16~18 日間培養した (EPC コロニーアッセイ)。

③ 二次的 EPC-CFA；接着性の強弱を利用して、弱接着性の小細胞群コロニー及び強接着性大細胞群コロニーを採取し、二次的 EPC-CFA を行った。

④ EPC コロニー細胞の血管網形成能の評価；大細胞群、小細胞群 EPC を採取し、96 ウェルプレートに 50  $\mu$ L のマトリゲルを入れ、固相化後、各ウェルに  $1.5 \times 10^4$  個/50  $\mu$ L 5% FBS 含有 EGM-2 血管内皮用培地を播種し、4 日後に血管網形成能を算定した。

⑤ *in vivo* 下肢虚血ヌードマウスモデルを用いた EPC コロニー細胞の血管再生能の検討；BALB/c-nu マウスに下肢虚血モデルを作成し、採取した各 EPC コロニー細胞を移植し ( $2 \times 10^5$  個/匹)、ドップラー血流計による血流改善度測定及び isolectin B4-FITC による微小血管染色及びヒト特異的 CD31 抗体による移植細胞の組織内血管内皮細胞分化能を検討した。

(2) EPC 増幅分化培養法；

① EPC 増幅分化培養法 (Expansion 培養 = Ex 培養)；無血清 Stemspan 造血幹細胞増幅培地にヒト遺伝子組み換え 100 ng/mL SCF, 100 ng/mL Flt-3 ligand, 20ng/mL TPO, 20ng/mL IL-6, 50 ng/mL VEGF を添加し、(1)-① と同様に採取した CD34+細胞を 7 日間、24 ウェルプレートを用いて培養 ( $1 \times 10^4$  個/500  $\mu$ L/ウェル) した。経時的に EPC-CFA を用いて EPC 分

化能、増幅能を評価した (500 個/35 mm ディッシュ)。

② *in vivo* ヌードラット心筋梗塞モデルを用いた EPC 増幅分化培養細胞の移植による血管再生能の評価及び心機能改善効果の検討；F344/N-rnu ヌードラットの冠状動脈前下枝を結紮し、心筋梗塞モデルを作成した。虚血心筋近傍部位に、CD34+細胞または Ex 細胞を移植した ( $1 \times 10^5$  個または  $5 \times 10^5$  個/匹)。虚血作成及び細胞移植後、28 日目に、心臓超音波エコーを用いて算出した左室駆出率から、心機能改善能の評価を行った。屠殺後、isolectin B4 による組織学的解析により、虚血心筋内微小血管を算定し血管再生能を評価した。

(3) コロニー形成性 EPC の起源及び分化過程の解析；

① (1)-① と同様に採取した、CD34+細胞におけるコロニー産生性 EPC 分画の同定；CD34+細胞を X 抗体及び Y 抗体により染色した。FACS Aria (BD) を用いて F5 (X+/Y-), F6 (X+/Y 弱陽性), F7 (X-/Y 強陽性), F8 (X-/Y+) に分画し、4 つの細胞群を分取した。各分画の EPC コロニー形成能を EPC-CFA により検討した。

② さらに、Ex 培養により、各分画の EPC 分化増幅能を検討した。

## 4. 研究成果

(1) EPC 分化動態解析法の開発；

① 臍帯血由来 CD34+細胞における EPC コロニーの形状；形態の異なる 2 種類の EPC コロニーが出現した。すなわち、直径 20  $\mu$ m 程度の小卵円型細胞群からなるコロニー、長径 50  $\mu$ m ~ 200  $\mu$ m の大紡錘型細胞群からなるコロニーが出現した。二次的 EPC-CFA では、前者はコロニーを形成し、後者はコロニーを形成しなかった。一方、コロニー非形成性 EPC 培養アッセイにおいては、大細胞群コロニーにおいて接着性 EPC 数の増加が認められた。

② EPC コロニー細胞の血管網形成能；未分化型 EPC コロニーに比較して、分化型 EPC コロニーは、血管網形成能に優れていた (図 1)。

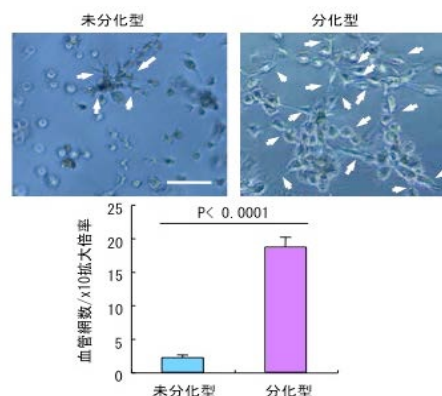


図 1. EPC コロニーの血管網形成能の比較。

x 10 視野 .

③ マウス下肢虚血部位における EPC のコロニー細胞移植による血管再生能の比較；各 EPC コロニー細胞を移植したところ、分化型 EPC コロニー細胞移植群は、未分化型 EPC コロニー細胞移植群に比較して、血流改善効果に優れていた。

さらに、虚血下肢筋肉内の微小血管密度についても、分化型 EPC コロニー移植マウスにおいて血管再生能が増強した (図 2)。

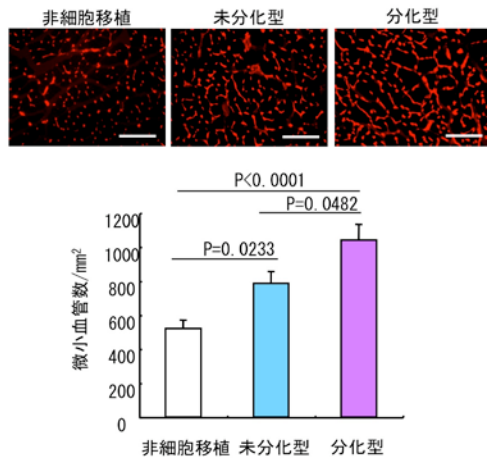


図 2. EPC コロニー移植 28 日後のマウス下肢虚血部位における血管再生能の比較. Alexa594-isolectin B4 (橙色)による微小血管の染色像. Scale bar= 200 μm.

④ 以上の知見により、小細胞 EPC コロニー、大細胞 EPC コロニーはそれぞれ未分化型、分化型 EPC コロニーであり、コロニー形成性 EPC は分化に伴って、非コロニー形成性 EPC に分化するとともに、血管再生能を獲得することが判明した。そして、EPC-CFA により、未分化型及び分化型コロニー数と比率の算出により EPC の分化、増幅動態の解析が可能となることを意味する (図 3)。

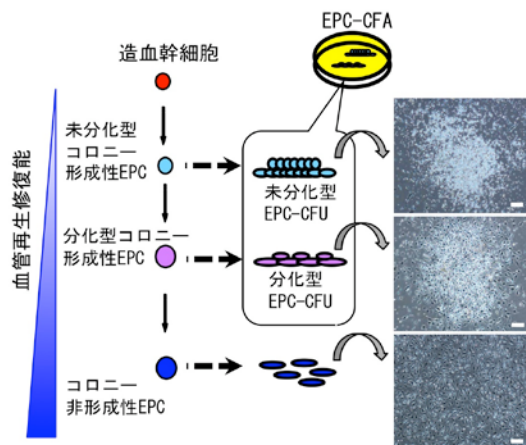


図 3. EPC 分化動態解析法概念図.

分化段階の異なる 2 種類の EPC コロニー。未分化型 EPC コロニー (EPC-CFU) は小卵円型細胞 (20 μm)、大紡錘型細胞 (50~200 μm) から構成される。EPC-CFU= EPC colony forming unit、EPC-CFA= EPC colony forming assay、Scale bar= 200 μm.

(2) EPC 増幅分化培養法 (Ex 培養法) の開発；

① Ex 培養法による CD34+細胞の EPC への増幅及び分化；Ex 培養により、CD34+細胞は経時的に分化が亢進し (EPC の質の向上)、特に分化型コロニー形成性 EPC の増幅 (EPC の量の向上) が認められた (図 4)。

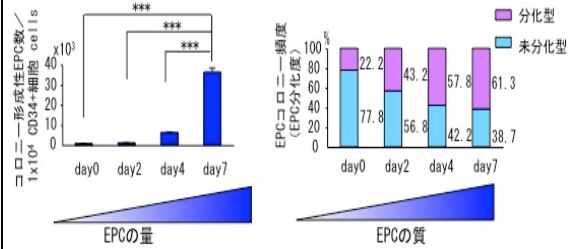


図 4. EPC 分化増幅培養法 (Ex 培養法) による、CD34+細胞から EPC への分化及び EPC 増幅. \*\*\*P < 0.001.

② in vivo ラット虚血心筋内への CD34+細胞および Ex 細胞移植による血管再生能の確認；ラット虚血心筋において、Ex 細胞移植群は、微小血管密度が、細胞数依存性上昇することが認められた (図 5)。

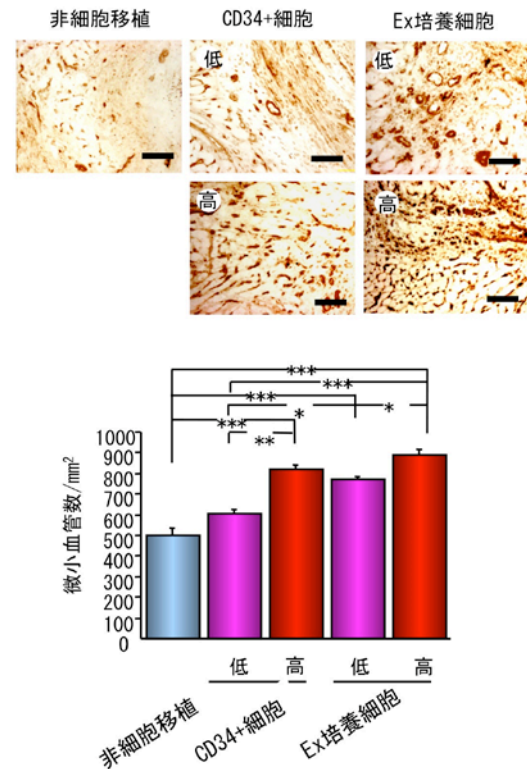


図 5. Ex 培養によるコロニー産生性 EPC 移植群及び非培養 CD34+細胞移植群の、ヌードラット心筋虚血部位における血管再生能の比

較.

低=  $1 \times 10^5$ 個/匹、高=  $5 \times 10^5$ 個/匹. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Scale bar=  $100 \mu\text{m}$ .

③ in vivo ラット虚血心筋内への CD34+お細胞よび Ex 細胞移植による心機能改善効果の確認；  
心臓エコーにおいて、左心室駆出率の改善効果が、移植細胞数依存性に認められた (図 6)。

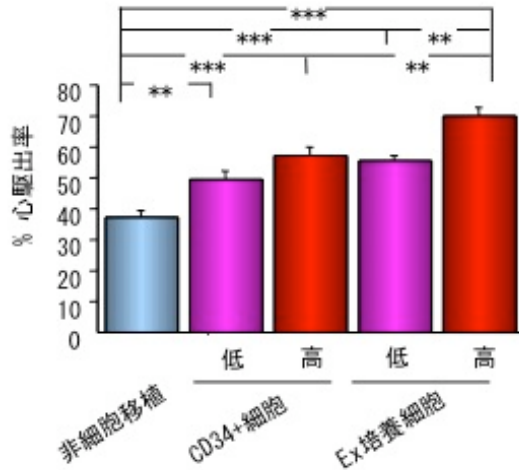


図 6. Ex培養によるコロニー産生性EPC移植細胞群及び非培養CD34+細胞移植群の、ヌードラット虚血心機能. 低=  $1 \times 10^5$ 個/匹、高=  $5 \times 10^5$ 個/匹. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

④ 以上の結果により、Ex 培養は、造血幹細胞 (CD34+細胞) の増幅及び分化を機能的に促進することが判明した (特許第 4964121 号)。独自に開発した EPC-CFA 及び Ex 培養法は、EPC の機能的な分化度及び増幅能を定量的に評価する手法として有用であることが判明した。さらに、EPC の分化度及び増幅能の評価を被検細胞に応用することにより、その細胞分画におけるコロニー形成性未分化 EPC の起源と、その起源からの EPC 分化過程の解明研究が可能となった。

(3)コロニー形成性未分化 EPC の起源と分化過程；

① CD34+細胞における F5 (X+/Y-), F6 (X+/Y弱陽性), F7 (X-/Y強陽性), F8 (X-/Y+) の 4 つの細胞分画では、F5 < F6 < F7 の順に上昇し、F8 分画 (X-/Y+) は EPC コロニーをほぼ産生しなかった (図 7)。

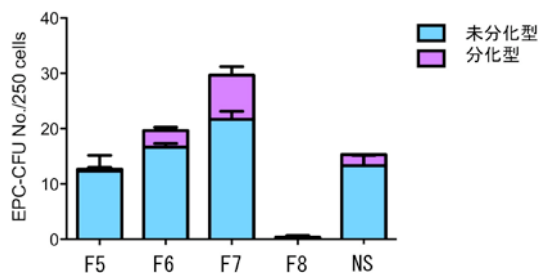


図 7. CD34+細胞分画中の EPC コロニー産生能. NS= 非選別 CD34+細胞.

② 各分画における Ex 培養細胞の幹細胞陽性率；  
F5, F6, F7 の各分画について、EX 培養を行い、FACS にて幹細胞陽性率を算出したところ、F5 > F6 > F7 の順に、幹細胞 (CD34+/X+) 陽性率が維持されていた (図 8)。

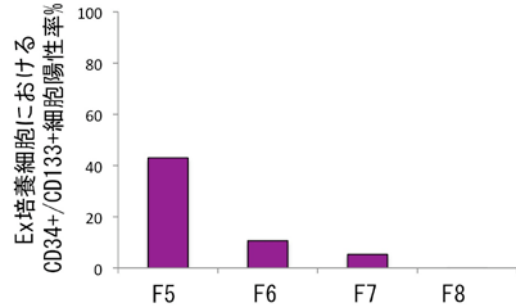


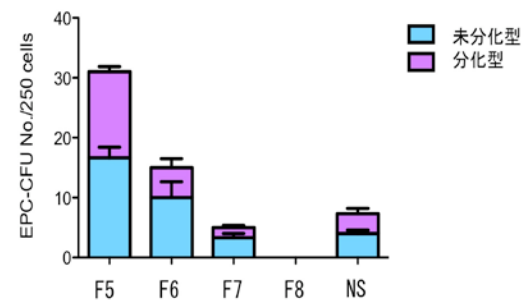
図 8. CD34+細胞における Ex 培養後の幹細胞陽性率.

③ 各分画における Ex 培養細胞の EPC コロニー形成能；

CD34+細胞各細胞分画の Ex 培養細胞の EPC-CFA において、Ex 培養前の EPC-CFA の結果とは反対に、F5 > F6 > F7 の順に EPC コロニー産生が認められた (図 9)。

これは、Ex 培養前では、細胞周期において F5 が休止期にあり、F6 < F7 の順に増幅期にある細胞が多く、Ex により、F5 のコロニー産生 EPC の増幅及び分化が促進されたこと、また増幅期にあった F6, F7 のコロニー産生性 EPC が分化誘導によりコロニー産生性 EPC からコロニー非産生性 EPC に分化したことが示唆された。

図 9. CD34+細胞各細胞分画における Ex 培養後の EPC コロニー産生. NS= 非選別 CD34+細胞.



胞.

(4) 考察；

以上の知見により、EPC の起源が CD34+/X+ 分画の Y-細胞分画に存在すること、Y 抗原の発現上昇に伴い、EPC の分化度が上昇することが判明した。

本研究において、世界で初めて独自開発した

手法による EPC 分化動態解明は、近年、血管再生医学、医療の基礎、臨床における重要性が認識されている EPC 細胞特性の本質的解明に迫るものである。また、本研究成果は、循環器領域の虚血性疾患における EPC の血管生物学的診断法及び EPC 移植による新規な治療法の開発研究への発展と応用が期待される。

#### 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 16 件)

- ① Tsukada S, Masuda H(8 人中 7 番目), Asahara T(8 人中 8 番目),. Identification of mouse colony-forming endothelial progenitor cells for postnatal neovascularization: A novel insight highlighted by new mouse colony-forming assay. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4:20, 査読有り, DOI:10.1186/scrt168
- ② Masuda H(2 人中 1 番目), Asahara T(2 人中 2 番目). Clonogenic assay of endothelial progenitor cells. *Trends Cardiovasc Med.* 2013;23:99-103, 査読有り, DOI:10.1016/j.tcm.2012.09.007
- ③ Kamei N, Masuda H(10 人中 6 番目), Asahara T(10 人中 10 番目). Ex-vivo expanded human blood-derived cd133(+) cells promote repair of injured spinal cord. *J Neurol Sci.* 2013;328:41-50, 査読有り, DOI:10.1016/j.jns.2013.02.013
- ④ Tanaka R, Masuda H(13 人中 2 番目), Asahara T(13 人中 12 番目), Miyasaka M. Autologous g-csf mobilized peripheral blood cd34(+) cell therapy for diabetic patients with chronic non-healing ulcer. *Cell Transplant.* 2012, 査読有り, DOI: 10.3727/096368912X658007
- ⑤ Ohtsubo S, Masuda H(10 人中 8 番目), Asahara T(10 人中 9 番目). The therapeutic potential of ex vivo expanded cd133+ cells derived from human peripheral blood for peripheral nerve injuries. *J Neurosurg.* 2012;117:787-794, 査読有り, DOI: 10.3171/2012.7.JNS111503
- ⑥ Obi S, Masuda H(8 人中 2 番目), Asahara T(8 人中 8 番目). Fluid shear stress induces differentiation of circulating phenotype endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012;303:C595-606, 査読有り, DOI: 10.1152/ajpcell.00133.2012
- ⑦ Masuda H(13 人中 1 番目), Asahara T(13 人中 13 番目). Development of serum-free quality and quantity control culture of colony-forming endothelial progenitor cell for vasculogenesis. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1:160-171, 査読有り, DOI: 10.5966/sctm.2011-0023
- ⑧ Kawakami Y, Masuda H(16 人中 9 番目), Asahara T(16 人中 16 番目). Local transplantation of ex vivo expanded bone marrow-derived cd34-positive cells accelerates fracture healing. *Cell Transplant.* 2012;21:2689-2709, 査読有り, DOI: 10.3727/096368912X654920
- ⑨ Jung SY, Masuda H(6 人中 4 番目), Asahara T(6 人中 5 番目). Decursin inhibits vasculogenesis in early tumor progression by suppression of endothelial progenitor cell differentiation and function. *J Cell Biochem.* 2012;113:1478-1487, 査読有り, DOI: 10.1002/jcb.24085
- ⑩ Alaiti MA, Ishikawa M, Masuda H(7 人中 3 番目), Asahara T(7 人中 6 番目). Up-regulation of mir-210 by vascular endothelial growth factor in ex vivo expanded cd34+ cells enhances cell-mediated angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2012;16:2413-2421, 査読有り, DOI: 10.1111/j.1582-4934.2012.01557.x
- ⑪ Yang J, Masuda H(10 人中 8 番目), Asahara T(10 人中 10 番目). Cd34+ cells represent highly functional endothelial progenitor cells in murine bone marrow. *PLoS One.* 2011;6:e20219, 査読有り, DOI: 10.1371/journal.pone.0020219
- ⑫ Shirakura K, Masuda H(9 人中 2 番目), Asahara T(9 人中 9 番目). Impaired function of bone marrow-derived endothelial progenitor cells in murine liver fibrosis. *Biosci Trends.* 2011;5:77-82, 査読有り, URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21572251
- ⑬ Nakagawa Y, Masuda H(10 人中 2 番目), Asahara T(10 人中 10 番目). Aberrant kinetics of bone marrow-derived endothelial progenitor cells in the murine oxygen-induced retinopathy model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:7835-7841, 査読有り, DOI: 10.1167/iovs.10-5880
- ⑭ Masuda H(16 人中 1 番目), Asahara T(16 人中 16 番目). Methodological development of a clonogenic assay to determine endothelial progenitor cell potential. *Circ Res.* 2011;109:20-37,

査読有り,  
DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.231837

- ⑮ Kwon SM, Masuda H(8人中5番目), Asahara T(8人中8番目). Differential activity of bone marrow hematopoietic stem cell subpopulations for epc development and ischemic neovascularization. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51:308-317, 査読有り, DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.04.007
- ⑯ Asahara T(3人中1番目), Masuda H(3人中3番目). Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells.* 2011;29:1650-1655, 査読有り, DOI: 10.1002/stem.745

[学会発表] (計3件)

- ① 増田治史, Development of Serum-Free Suspension Culture System of Peripheral Blood Mononuclear Cells to Potentiate Vascular Regeneration, アメリカ心臓病学会 2012、2012年11月7日、ロスアンジェルス Convention Center、米国
- ② 増田治史, Single cellによる造血幹細胞からの内皮系細胞系列決定、分化における細胞内情報伝達機構の解析、第10回日本再生医療学会総会、2012年3月1日、京王プラザホテル
- ③ 増田治史, Methodological Development of a Clonogenic Assay to Determine Endothelial Progenitor Cell Potential、第23回国際血栓止血学会、2011年7月26日、京都国際会議場

[図書] (計1件)

増田治史, 診断と治療社、血管再生治療、2012年、15頁

[産業財産権]

出願状況 (計1件)

名称: 血管内皮前駆細胞を含む細胞群の生体外増幅方法

発明者: 増田治史

権利者: 東海大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-218206

出願年月日: 2012年9月28日

国内外の別: 国内

取得状況 (計1件)

名称: 血管内皮前駆細胞の生体外増幅法

発明者: 増田治史

権利者: 東海大学

種類: 特許

番号: 特許第 4964121 号

取得年月日: 2012年4月6日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

増田 治史 (MASUDA HARUCHIKA)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号: 50278496

### (2) 連携研究者

浅原 孝之 (ASAHARA TAKAYUKI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 20246200

### (3) 研究協力者

志津野 朋子 (SHIZUNO TOMOKO)

東海大学・医学部・研究技術員

伊藤 理恵 (ITO RIE)

東海大学・医学部・研究技術員

伊東 丈夫 (ITOH JOHBU)

東海大学・医学部・研究技術員

伊東 良子 (ITOH YOSHIKO)

東海大学・医学部・研究技術員

神口 浩 (KAMIGUCHI HIROSHI)

東海大学・医学部・研究技術員

岡田 義則 (OKADA YOSHINORI)

東海大学・医学部・研究技術員

飯田 裕美 (IIDA YUMI)

東海大学・医学部・研究技術員