

平成21年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590850
 研究課題名（和文）骨髄由来単核球細胞の血管平滑筋細胞への分化調節機構の解明と新規治療法開発への応用
 研究課題名（英文）Clarification of molecular mechanism regulating differentiation of peripheral blood mononuclear cell into vascular smooth muscle cell and development of new strategy for clinical application
 研究代表者
 富田 智之（TOMITA TOMOYUKI）
 群馬大学・医学部・助教
 研究者番号：00400755

研究成果の概要：動脈硬化や血管形成術後再狭窄などの血管病では、血管平滑筋細胞は形質変換し、リモデリングを進めて病態形成の原因のひとつとなる。近年、骨髄細胞が血管前駆細胞として血中に動員され平滑筋細胞へ分化し、傷害後血管の修復と病態形成へ寄与することが知られてきている。本研究では、細胞分化の調節因子である Notch シグナルが末梢血単核球から血管平滑筋細胞への分化に関与することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、動脈硬化、血管平滑筋分化、末梢血単核球、Notch シグナル

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化や慢性的な運動不足、さらには高齢化にともなって、心血管イベントによる死亡率は悪性腫瘍と並んで我が国の死因の約 30% を占め、今日、血管病に対する有効な治療法・予防法を確立することが急務の課題となっている。動脈硬化や血管形成術後再狭窄などの血管病では、血管を構成する細胞成分や脂質の蓄積などによって血管壁構築が改変（リモデリング）されることが病態形成の主因となる。このとき血管平滑筋細胞は形質を変化（形質変換）させ、リモデリングを進める働きをする。正常血管の中膜に存在する収縮型の平滑筋細胞は、血流・血圧を制御し増殖能・遊走能をもたない。これに対し病的血管では、平滑筋細胞は収縮型から合成

型へと形質変換（脱分化）して、収縮蛋白発現が低下し増殖能・遊走能を有するだけでなく増殖因子や細胞外基質などを産生する能力も兼ね備えるようになる。このような血管平滑筋細胞の形質変換は、環境から与えられた刺激に応じて多数の遺伝子が協調的に発現変化することによってもたらされるものであり、血管病の病態形成に重要な役割を果たしている。また近年、骨髄細胞が血管前駆細胞として血中に動員され平滑筋細胞へ分化し、傷害後血管の修復と病変形成へ寄与することが知られてきている。以上より、血管病の病態形成のメカニズムを解明し、新たな治療戦略を開発するため、血管平滑筋細胞の形質変換および血管前駆細胞の平滑筋細胞分化機序を解明することが必要となる。

Notchシグナル系は、線虫からヒトにいたるまで進化的に保存された機構であり、局所的な細胞間相互作用を通して細胞の運命を決定するために機能する。従来、神経系や血球系の細胞分化を制御する経路として研究されてきたが、近年では、血管の発生・分化にも重要な役割を担っていることが分かってきた。古典的にはNotchシグナル系は細胞の分化を抑制することが知られていたが、近年では同じ細胞でも状況に応じてその分化を誘導的にも制御することがわかってきた。我々は最近、**Notch刺激は間葉系幹細胞において、平滑筋分化を促進する働きがあることを見いだした** (Doi et al. *J Biol Chem.* 2006 ;281(39):28555-64)。さらに、Notchシグナルの各因子(リガンド、レセプター)が動脈硬化巣で発現し、Notch刺激は動脈硬化巣の構成成分である平滑筋細胞の起源の一部と考えられている骨髄由来単核球を平滑筋細胞に分化させる可能性があることを見いだした。以上より、Notchシグナルは血管平滑筋細胞や間葉系幹細胞のみならず、骨髄由来単核球を平滑筋細胞に形質変換(transdifferentiation)させることにより動脈硬化形成に関与する可能性があると考えている。本研究において、Notchシグナルの血管平滑筋細胞および骨髄由来単核球の形質変換に及ぼす分子機構を詳細に解明し、血管病発症に及ぼすNotchシグナルの影響を検討し、治療への応用の可能性を模索する。

2. 研究の目的

以前のパイロットスタディによりNotch刺激が複数の経路により平滑筋分化マーカーを誘導することを確認していた。その中で特筆すべき点は、平滑筋細胞の分化を強力に誘導するSRF依存性のコアクチベーターであるmyocardin遺伝子の誘導による経路である。myocardin遺伝子の上流に関する報告はこれまで知られておらずNotch刺激が平滑筋分化の主要因子であるmyocardinのmRNA発現を誘導するという点で、Notchシグナルは血管平滑筋分化を規定する主要な因子である可能性があり、その可能性について検討した。血管前駆細胞は骨髄由来単核球の中に含まれることが知られているが、この血管前駆細胞が平滑筋細胞へと分化するメカニズムに関する報告はこれまで知られておらずNotch刺激が血管前駆細胞から平滑筋細胞への分化を誘導する主要な因子である可能性があり、その可能性について検討した。以上、総括すると

- (1) Notchシグナルがmyocardin遺伝子の発現を誘導するメカニズムを検討する。
- (2) Notchシグナルが骨髄由来単核球から平滑筋細胞へ分化誘導する可能性およびメカニズムを検討する。

3. 研究の方法

(1) Notchシグナルがmyocardin遺伝子を誘導するメカニズムを検討する。

Notchシグナルの恒常的活性化因子であるNICD(上

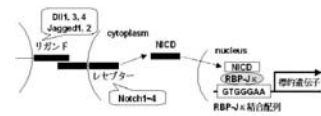


図2. Notchシグナルの機構図

図)を過剰発現すると10T1/2線維芽細胞において複数の平滑筋分化マーカー(SM-MHC, h-caldesmon, Smoothelin-B等)のmRNAとともにmyocardinのmRNAを誘導することを確認した(下図)。また、培養ラット大動脈平滑筋細胞(RASMC)においてもNICD刺激によりmyocardin遺伝子が誘導されることを確認していた。これらの分子機序を明らかにするために以下の実験を行った。

RASMCにおいては定常状態でmyocardin遺伝子が発現しているが、Notchシグナル阻害剤DAPTの存在下で、このmyocardin遺伝子の発現がどのように変化するか。また、myocardin遺伝子のプロモーター領域部位にはRBP-Jk結合サイト(Notchシグナル応答配列)が含まれている。以上より、myocardin遺伝子のプロモーター領域を用いて、ルシフェラーゼプラスミドによるレポーター遺伝子アッセイと、それに引き続きその結合サイトにRBP-Jk蛋白が結合するかどうかゲルシフトアッセイおよびNotch1抗体を用いてchromatin immunoprecipitation assay (ChIP)を行った。

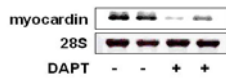
(2) Notchシグナルが血管前駆細胞を平滑筋細胞に分化誘導する可能性、メカニズムを検討する。

血管前駆細胞は骨髄由来の末梢血単核球(PBMC)に含まれることが知られており、PBMCは血管傷害時にその部位に付着して平滑筋細胞様の細胞として増殖すると考えられている。したがって、PBMCが培養条件下で平滑筋細胞様に分化する際にNotchシグナルのリガンドJagged1およびNotch3レセプターや強力な平滑筋分化誘導因子であるSRF/myocardinの発現がどのように誘導されるか検討した。また、大腿動脈のワイヤー血管傷害モデルでNotchシグナルのコンポーネントの発現がどのように誘導され、平滑筋分化マーカーの発現とどのように発現の連動が見られるか検討した。

4. 研究成果

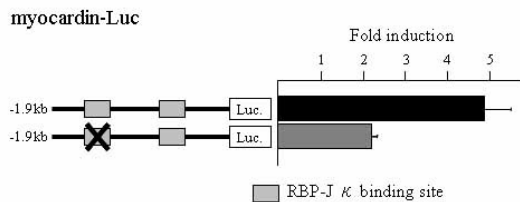
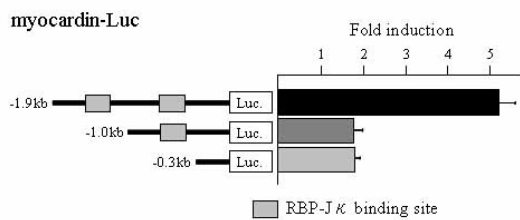
(1) Notch シグナルが myocardin 遺伝子を誘導するメカニズムを検討する。

RASMC においては定常状態で myocardin 遺伝子が発現しているが、Notch シグナル阻害剤 DAPT にてこの myocardin 遺伝子の発現が減少することを確認した (下図)。それに伴い平滑筋分化マーカー



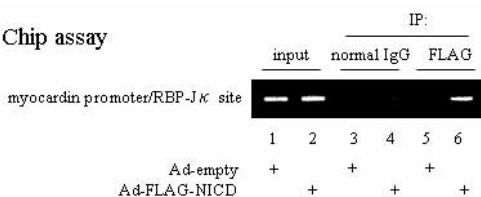
の SM-actin (SMA) の発現が減少した。

次に myocardin プロモーター領域を用いて、レポータージーンアッセイを行った。以下の3つのコンストラクトと NICD の発現ベクターを同時に遺伝子導入すると最長のレポーターコンストラクトのプロモーター活性が上昇した (下図)。RBP-J κ 結合配列に変異を加えると転写活性が著しく低下した (下図)。



以上より、5' 寄りの RBP-J κ 結合領域を介して NICD による転写が亢進すると考えられた。ゲルシフトアッセイで、RBP-J κ と結合すると推測される結合領域が複合体を形成することを確認した。さらに、ChIP アッセイで *in vivo* において NICD が RBP-J κ を介してその結合領域にリクルートされることが明らかとなった。

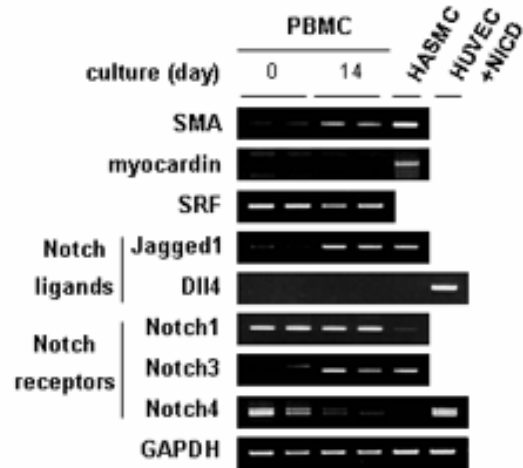
Chip assay



以上の結果は、現在、投稿準備中である。

(2) Notch シグナルが血管前駆細胞を平滑筋細胞に分化誘導する可能性、メカニズムを検討する。

末梢血単核球を PDGF-BB および FGF2 の存在かで培養すると、平滑筋様の表現系を呈することが知られている。この培養細胞で RT-PCR 法を用いて遺伝子発現を検討すると (次図)



14 日後に、平滑筋分化マーカーである SMA の発現が確認された。この際、最も強力な平滑筋分化誘導因子である SRF/myocardin の発現誘導は認められなかった。それに対して血管平滑筋に発現することが知られている Jagged1 および Notch3 の発現誘導が認められた。これらの発現は細胞免疫染色でも確認された。Notch シグナル阻害薬である DAPT の存在下では SMA の発現が認められないことから、この末梢血単核球の平滑筋様細胞への分化過程で、Notch シグナルが重要な役割をになうことが推察された。

次にワイヤー血管傷害時における新生内膜形成時に Notch コンポーネントおよび SMA の発現がどのように見られるか、GFP 発現細胞の骨髄移植マウスを用いて免疫染色法で検討した (骨髄由来細胞は GFP 陽性になるモデル)。新生内膜層に GFP/Jagged1 や GFP/Notch3 の二重陽性細胞を豊富に認めたものの、GFP/SMA 細胞の二重陽性細胞はわずかに確認されるのみだった。SMA 陰性細胞では Notch シグナルの標的因子であり平滑筋細胞分化阻害因子である HERP1 の発現が豊富に認められた。以上より、末梢血単核球が障害血管において平滑筋様細胞に分化する際に Notch シグナルが重要な役割を果たすものの、分化阻害因子である HERP1 を同時に誘導するために SMA の発現を顕著には誘導しないのではないかと考えた。

以上の結果は BBRC, 2009 に掲載された。

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 3 件)

① Doi H, Tomita T (他 11 名、9 番目) Notch signaling regulates the differentiation of bone marrow-derived cells into smooth muscle-like cells during arterial lesion formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 381: 654-659. 査読あり

②倉林正彦、富田智之

検査所見の読みかたとピットフォール
一血液検査 日本医師会雑誌 137(特別
号1):S89-92, 2008、査読なし

③倉林正彦、富田智之

選択的コレステロール吸収抑制薬の使い方
Modern Physician 28:389-392, 2008、査読
なし

〔学会発表〕(計6件)

①第210回日本循環器学会関東甲信越地方会
2008.12.6(東京)

土屋寛子、中島正博、入江忠信、後藤耕作、
八木宏明、斎藤章宏、根岸一明、福田延昭、
奥村 渉、富田智之、中島 忠、金古善明、
中野明彦、新井昌史、倉林正彦、茂原 淳、
高橋 徹

発症の発端となった右心不全症状が自然軽
快した急性下壁梗塞に伴う心室中隔穿孔の
1例

②第555回日本内科学会関東地方会
2008.7.13(東京)

星島啓子、福田延昭、奥村 渉、富田智之、
中野明彦、金古善明、新井昌史、長谷川 昭、
倉林正彦

第1度房室ブロックの出現が診断のきっかけ
となった心サルコイドーシスの1例
急性心筋梗塞に合併した心室細動発作に植
え込み型除細動器が作動し救命し得た一例

③第207回日本循環器学会関東甲信越地方会
2008.2.9(東京)

小野洋平、根岸一明、太田昌樹、高松寛人、
八木宏明、高橋利絵子、斎藤章宏、奥村 渉、
富田智之、中野明彦、金古善明、新井昌史、
長谷川 昭、倉林正彦

Color KinesisによるDiastolic stunning
の評価が有用であった1例

④第206回日本循環器学会関東甲信越地方会
2007.12.1(東京)

佐藤泰輔、高橋利絵子、小野洋平、太田昌樹、
八木宏明、高松寛人、根岸一明、斎藤章宏、
奥村 渉、富田智之、中野明彦、長谷川 昭、
倉林正彦

再開通させたCTOからのretrograde
approachにてPCIに成功した右冠動脈亜完全
閉塞病変の1症例

⑤第548回日本内科学会関東地方会
2007.10.13(東京)

原 健一郎、長谷川 昭、八木宏明、磯部 全、
青木史暁、前野敏孝、富田智之、須賀達夫、
倉林正彦、小泉 聡

15年の経過で喀血を発症し、気管支動脈塞栓
術にて救命しえた慢性血栓塞栓肺高血圧症
の1例

⑥第546回日本内科学会関東地方会
2007.7.22(東京)

太田昌樹、金古善明、斎藤章宏、根岸一明、富
田智之、中野明彦、新井昌史、長谷川 昭、倉
林正彦

急性心筋梗塞に合併した心室細動発作に植
え込み型除細動器が作動し救命し得た一例

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 智之 (TOMITA TOMOYUKI)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：00400755

(2) 研究分担者

倉林 正彦 (KURABAYASHI MASAHIKO)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00215047