

平成21年 5月18日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790542
 研究課題名 (和文) ヒト成体における血管形成機構の解明及び血管内皮前駆細胞の体外増幅法の開発
 研究課題名 (英文) The mechanism of cell fate determination of human EPCs and its functional therapeutic cascade.
 研究代表者
 和田 美夏 (WADA MIKA)
 日本大学・医学部・助教
 研究者番号：90420950

研究成果の概要：骨髄微小環境下において Notch リガンドである Jagged-1 はヒト未分化前駆細胞の維持および血管系への増殖・分化を促し、Dll-1 は抑制することが示された。本研究で開発された Jagged-1 発現骨髄ストローマ細胞を用いて、ヒト血管新生に効率的な細胞を体外増幅することが可能となり、細胞再生医療の新たな発展につながった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
H19年度	1,700,000	0	1,700,000
H20年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：再生医療科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血管病態学

キーワード：再生医療、Notch、Jagged-1、血管内皮前駆細胞 (EPC)

1. 研究開始当初の背景

生体には様々な細胞に分化できる未分化な多能性幹細胞・前駆細胞が存在する。近年、これらの解析に伴い再生医療が発達し、幹/前駆細胞は障害を受けた臓器の再生や人工臓器の開発に応用されはじめている。特に、血管内皮前駆細胞 (Endothelial Progenitor Cell=EPC) はすでに虚血性疾患において臨床的な移植治療法が実用化され、血管再生療法としてわが国でも行われている。

これらの幹細胞・前駆細胞は、発生や分化の段階において様々な体内環境からの刺激や内因性のプログラムによって特定の方向に分化増殖し、複雑な組織・器官さらには個体を形成する。この未分化性維持及び分化増殖の制御機構のひとつとして近年注目されているのが、レセプターである Notch とリガ

ンドである Jagged (-1,-2) 及び Delta (-1,-2,-4) からなる Notch シグナル系である。

Notch リガンド発現細胞は、隣接する同レセプター発現細胞に Notch シグナルを伝達することにより、レセプター発現細胞の分化増殖の制御に関与し細胞の運命を決定する。現在までに、血液細胞の未分化性維持や B/T/樹状細胞の分化、神経細胞の発生などにおいてその役割が解明されている。血管分野でも、Notch シグナル系ノックアウトマウスは発生初期段階で血管構造の異常、特に動脈・静脈の分化異常をおこし胎児致死であることから、Notch が血管発生に重要な役割をもつとされ、血管異常を伴うヒト疾患でもこれら Notch シグナルの遺伝子異常が判明しているものがある。

しかし、Notch 系ノックアウトマウスの多

くは胎生 10 日前後に胎内で死亡するため、それ以降の器官形成期や出生後の血管形成についての Notch シグナルの役割は不明であり、さらに、出生後の成体血管における Notch シグナルについては、癌組織などの末梢局所での血管形成や、すでに分化した末梢血管における血管新生での報告が散見されるのみである。

EPC と共通の祖先細胞（ヘマンジオブラスト）から由来する血液幹細胞は、成体では骨髄に存在し、Jagged-1 シグナルによりその未分化性と増殖能を維持し、骨髄外では T/B リンパ細胞の分化を制御し、血液細胞分化の全体の流れを制御する。血液細胞と同様に、EPC も成体では骨髄に存在し、必要に応じて末梢局所に遊走することがわかっており、Notch シグナルは骨髄における未分化な EPC の増殖や分化、そして末梢の血管形成部位への遊走といった成体での血管形成の一連の流れを、総括的に説明できる可能性が非常に高い。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、ヒト成体の EPC の起源とされる CD133 陽性細胞の骨髄内におけるその未分化性維持及び増殖・分化制御機能に果たす Notch シグナルの役割や、虚血など必要時における EPC の骨髄から局所への動員・遊走における Notch シグナルの役割を *in vivo*, *in vitro* の系を用いて、ともに明らかにする。これにより、成体での血管形成機序において、骨髄から血管形成局所に至る EPC 動態の Notch シグナルによる分子制御機構の解明が可能となる。

(2) 前述(1)における知見を基に、Notch シグナルによる高度に分子制御された機能性 EPC を用いた血管再生療法の有効性を検討し、次世代型の EPC 移植による血管再生療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) ストローマ細胞

既にヒト臍帯血の未分化維持能があることが示されている、マウス骨髄細胞由来のストローマ HESS-5 を用いた。この HESS-5 では、Jagged-1 及び Delta like 1 の蛋白の発現がなく、Notch シグナル伝達もみられないことを確認した後、レトロウイルスを用いて human Jagged-1 (hJag-1) 及び human Delta like 1 (hDl1-1) を導入し、hJag-1 発現 HESS-5 (hJag-1) 及び hDl1-1 発現 HESS-5 (hDl1-1) を作成した。発現マーカーとして、NGFR を用い、empty vector のみを導入した HESS-5 (control) をコントロールとして用いた。ストローマ細胞の培養には α -MEM (Gibco) を用い、10%ウマ血清 (Gibco) 及びペニシリン・

ストレプトマイシン (Gibco) を添加した。

(2) 臍帯血 (CB) 細胞及び CD133 陽性細胞分離

十分なインフォームドコンセントの下に採取され、研究用に供与された CB で、採取後 24 時間以内のものを使用した。

比重遠心法により単核球 (MNCs) を分離後、2mM EDTA PBS(-) で 2 回洗浄し、 1×10^8 個の MNCs 当り 300 μ L の 0.5% ウシ血清アルブミン (BSA) 添加 2mM EDTA PBS(-) に浮遊した。これを FcR blocking 試薬 (Miltenyi Biotec) 100 μ L と反応後、hapten-conjugated Anti human CD133 抗体 (Miltenyi Biotec) 100 μ L と 6-12°C で 30 分間反応させ、さらに 2 回洗浄後、抗hapten microbeads (Miltenyi Biotec) 100 μ L と反応させ、2 回洗浄を行った後、Auto MACS または MACS Separation Columns を用いて磁気分離を行った。分離後の細胞を抗 CD133-PE (clone 293C: Miltenyi Biotec) で染色し、CD133 陽性率が 95% 以上であることをフローサイトメーター (FACS: BD Biosciences) を用いて確認した。

(3) HESS-5 ストローマ細胞との共培養

1×10^4 の CB CD133 陽性細胞を、24 時間前に 10% ウマ血清添加 α -MEM で培養を開始した、それぞれの HESS-5 上に播種する。共培養には、5% ウシ胎児血清 (FBS: JRH Bioscience)、100ng/ml SCF, 100ng/ml Flt-3 Ligand, 50ng/mL VEGF (以上 Peprotec), 20ng/ml IL-6, 20ng/ml trombopoietin (以上 Kirin Brewery CO. Ltd から供与) を添加した Stem Span SFEM (Stem Cell Technologies) を用いた。37°C、5% CO₂ 下で 7 日間培養を行い、浮遊細胞を回収後、解析を行った。いくつかの実験では、Notch シグナル阻害剤として、10 μ g/ml の γ セクレターゼインヒビター (GSI: Calbiochem) を培養液中に添加した。

(4) フローサイトメトリーによる解析

共培養によって増殖及び分化誘導された細胞を、PBS(-) でストローマ細胞上を穏やかに洗浄することにより回収し、FcR blocking 後、CD34-FITC (clone 581), CD34-PE (clone 581), CD45-FITC (clone HI30), CD31-FITC (clone WM59) (BD Biosciences), AC133-APC (clone AC133) (Miltenyi Biotec), KDR-non rabeled (Sigma) を用いて染色し、FACS Caliber (Becton Dickinson) により細胞表面抗原を測定した。KDR 染色では、二次及び三次抗体として、それぞれ biotin-anti mouse IgG1 (BD Biosciences) 及び APC-Streptavisin (BD Biosciences) を使用した。Isotype control として、mouse IgG1-FITC (clone MOPC-21), mouse IgG1-PE (clone MOPC-21), mouse IgG1-APC (clone

MOPC-21) and non-labeled mouse IgG1 (clone MOPC-21) (BD Biosciences) を使用した。解析には、CELL Quest (BD Biosciences) を用いた。

(5) RT-PCR

培養後の細胞の Total RNA を RNeasy Micro Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。100ng の RNA から First Standard cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) のランダムプライマーを用いて cDNA を作成し、PCR template とした。特異的 PCR には Taq DNA polymerase (Takara) を用いた。Primer は 5' -GTCGCACTGAAACTTTTCGTCCA-3' / 5' -CAGTAGCTGCGCTGA TAGACATCCA-3' (hVEGF-A), 5' -AACCACATCAAGTATGC CACCAACC-3' / 5' -CGTGC CGATCTCAGTCTCA-3' (heNOS), 5' -CTGAT GCCCCATGTTCGTC-3' / 5' -CACCTG TTGCTGTAGCCAAATTCG-3' (hGAPDH) で、それぞれ、56 °C/30cycle, 64 °C/40cycle, 64 °C/20cycle で PCR をおこなった。PCR 産物を電気泳動により 2%アガロースゲルに展開しデジタル撮影後、Image J (free software) を用いて半定量を行った。

(6) EPC コロニーアッセイ

それぞれの Stroma 上で 1 週間共培養した CD133 陽性細胞由来細胞 5×10^2 を、Iscove's Modified dulbecco's Medium (IMDM) (Gibco), Methocult H4236 (Stem Cell Technologies), 30% FBS (JRH Bioscience), penicillin/streptomycin (Gibco), human SCF (100 ng/mL), IL-3 (20 ng/mL) (以上 Kirin Brewery から供与), VEGF (50 ng/mL), basic FGF (50 ng/mL), EGF (100 ng/mL), IGF-1 (100 ng/mL) (以上 Peprotec), and Heparin (2 IU/mL) (LEO Pharma, Ballerup, Denmark) を含む 1 mL のメチルセルロース含有半固形培地に加え、10 cm² 細胞培養ディッシュで 37 °C, 5% CO₂ 下で 18 日間培養し、顕微鏡下で EPC コロニー数をカウントした。

EPC コロニー形成細胞の検討及び接着能解析のため、コロニーカウント後、2 μg/mL の DiI labeled acetylated low density lipoprotein (DiI-Ac-LDL) (Biomedical Technologies) を加えて 37 °C、1 時間で EPC を染色し、PBS(-) で 2 回穏やかに洗浄してメチルセルロース及び非接着コロニーを取り除いた後、2 mM EDTA PBS (-) で接着している EPC コロニー形成細胞を回収した。

接着能解析では、 2×10^5 の EPC コロニー形成細胞を、0.1% gelatin (Sigma) でコートした 24well 培養プレートに播種し、0.1% BSA 及び 100 ng SDF-1 (Peprotec) を含む IMDM 0.5 ml 中で 37 °C、20 分間培養した。その後、PBS(-) で 2 回穏やかに洗浄して非接着細胞を除去し、底面に残る接着細胞を蛍光顕微鏡で

カウントした。

表面抗原解析では、DiI-Ac-LDL 染色後 1% パラホルムアルデヒドで固定し、FcR blocking 後、10 μg/mL の FITC-labeled Ulex europaeus lectin type 1 (UEA-1) (Vector Laboratories Inc) を用いて 4 °C、1 時間染色し、0.1% BSA 含有 PBS(-) で洗浄後、FACS Caliber により解析を行った。

(7) 下肢虚血モデル作成と解析

8-9 週齢の雄ヌードマウス (日本クレア) をペントバルビタール麻酔下に大腿動静脈を結紮し、培養後の細胞 1×10^5 を IMDM 50 μL に浮遊させ、5 箇所に分けて筋肉内に移植した。IMDM のみを移植したものを非細胞投与コントロールとして用いた。移植後 4, 7, 14, 28 日目にレーザードップラー (LDPI) (Moor Instruments) を用いて下肢筋肉の血流を経時的に測定した。28 日目に麻酔薬の過量投与により安楽死させ、下肢筋肉を 4% パラホルムアルデヒドで固定後、OCT コンパウンド (Sakura Finetech) で包埋・凍結し、5 μm 厚の凍結切片を作成、染色を行った。

Isolectin B4 (Vector Laboratories) 染色を行い、1 検体につき無作為に抽出した 15 枚の異なる切片を顕微鏡下で観察し、毛細血管密度を測定した。

更に、抗 human leukocyte antigen (HLA)-ABC (BD Biosciences)、抗 human von Willebrand factor (vWF) (DAKO) を一次抗体として免疫染色を行い、マウス筋組織内のヒト由来血管内皮細胞を検出した。二次抗体として、Zenon Alexa Fluor 594 Mouse IgG1 Labeling Kit 及び Zenon Alexa Fluor 488 Mouse IgG2a Labeling Kit (Molecular Probes) を用いた。

(8) 統計学的解析

1 way ANOVAs により検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差とした。すべての計算は Statview 5.0 (Abacus Concepts Inc) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) hJagged-1 及び hD11-1 の CB CD133 陽性細胞増殖における働き

HESS5/hJag-1 及び HESS5/hD11-1 がヒト CB 中の CD133+ 細胞の in vitro 培養に及ぼす影響を検討した。まずは、培養後の細胞数を検討した。それぞれのストローマ上において、 1×10^4 cells/24well で 7 日間共培養を行ったところ、コントロール群は $6.09 \pm 1.50 \times 10^5$ 個の細胞が得られたのに対し、hJag-1 刺激群では $8.76 \pm 2.07 \times 10^5$ ($P < 0.05$) 個、hD11-1 刺激群は $3.54 \pm 1.07 \times 10^5$ ($P < 0.05$) 個であった (図 1a)。培養後のコントロール群の細胞数を 1 とした場合、hJag-1 群は 1.44 倍、hD11-1 刺激群は 0.58 倍となったが、Notch

シグナル阻害剤である γ secretase inhibitor (GSI) 存在下で培養した場合、これらはコントロールと同レベルとなり、この細胞増幅の差はNotchシグナルによる作用と考えられた(図 1b)。

以上より、HESS-5 上の培養での CB CD133+ 細胞の培養において、hJag-1 は細胞数を増加させる作用があり、D11-1 は増加を抑える作用があると考えられた。

(2)hJagged-1 及び hD11-1 の CB CD133 陽性細胞分化における働き

次に、培養後の細胞分化能を比較するため、細胞表面マーカーをフローサイトメトリーを用いて検討した。コントロール群に比し hD11-1 刺激群では、より造血幹細胞に近い造血前駆細胞である CD34+/CD38- cell や血管内皮細胞系である CD31+/KDR+ cell の比率は有意に減少していた。これに対して、hJag-1 刺激群では、CD34+/CD38- cell, CD34+/CD133+ cell, CD31+/KDR+ cell それぞれの比率はコントロール群と比較して増加傾向がみられたが、有意差はみられなかった。細胞数の比較においては、造血前駆細胞である CD34+/CD38-cell, 未分化 EPC である CD34+/CD133+ は hJag-1 刺激群で著明に増加していた ($P < 0.05$) (図 1c)。さらに、血管内皮系である CD31+/KDR+ cell は hJag-1 群では 1.5 倍に増加しており ($P < 0.01$)、逆に hD11-1 群では 0.5 倍に減少していた ($P < 0.01$)。これらの差は GSI によってみられなくなり(図 1d)、Notch シグナルによるものと考えられた。

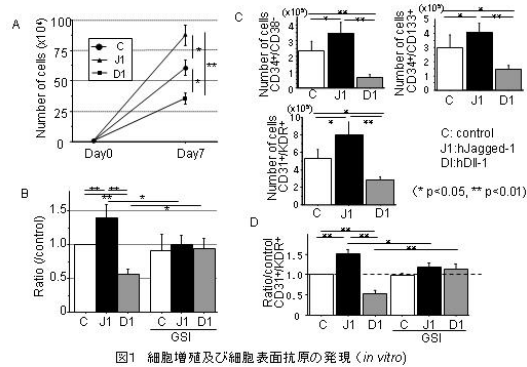


図1 細胞増殖及び細胞表面抗原の発現 (in vitro)

さらに、これら培養細胞の mRNA 発現を比較検討したところ、Jag-1 刺激群では、D11-1 群に比較して、hVEGF 及び heNOS の発現が有意に増加していた (図 2a, b)。

以上より、HESS-5 上での CB CD133+ 細胞の培養において、hJag-1 は未分化造血幹細胞を維持し、かつ、EPC の増幅、血管内皮系への分化を促進し、D11-1 はそれらを抑える作用があると考えられた。

(3)hJagged-1 及び hD11-1 の EPC コロニー形

成における働き

In vitro における EPC 分化能を検討するため、hJag-1 または hD11-1 で 7 日間共培養した細胞を、メチルセルロース半固形培地で 18 日間培養し、EPC コロニーをカウントした。

hJag-1 刺激では、EPC コロニー数が高く、コントロール群の EPC コロニー数を 1 としその増加率をみたところ、hJag-1 刺激群の EPC コロニー数は有意に増加していた ($P < 0.05$) が、hD11-1 刺激群は減少していた ($P < 0.01$) (図 2c)。更に、hJag-1 刺激群では EPC マーカーである Ac-LDL、UEA-1 をともに発現する細胞が多く (data not shown)、接着能も高かった(図 2d)。

以上より、hJag-1 刺激は in vitro における EPC コロニー形成において、その量も質も増加させることが示された。

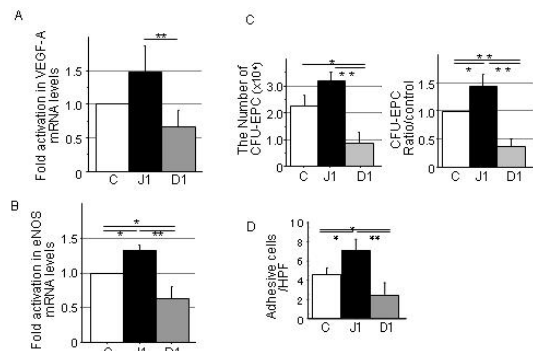


図2 mRNA発現及びEPCコロニー形成能(in vitro)

(4)hJagged-1 及び hD11-1 の虚血部における血管新生における働き

hJag-1 または hD11-1 で 7 日間共培養した細胞を、ヌードマウスにおける下肢虚血モデルに移植し、その治療効果を検討した。レーザードップラーを用いて経時的に下肢血流を測定した。対側肢の血流を 1 とした場合の、レーザードップラー値の推移をみると、非細胞移植群に比べ細胞移植群では、いずれも血流は改善傾向にあるが、hJag-1 刺激細胞移植群が最も改善効果が高かった (図 3a)。

更に、28 日目の虚血部筋肉内の毛細血管密度を Isolectin B4 を用いて染色した。その結果、hJag-1 刺激群では優位に血管密度の上昇が認められ (図 3b)、血流の改善は血管密度の増加によるものと考えられた。

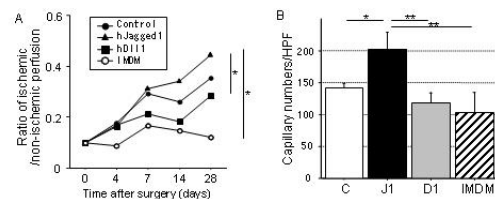


図3 虚血肢における血管形成能(in vivo)

(5) 虚血筋における、移植ヒト細胞の血管内皮への分化

CB CD133 陽性細胞のマウス虚血筋肉内における血管内皮への分化能を検討するため、ヒト特異的抗原に対する免疫染色を行った。その結果、HLA-ABC 及び hvWF がともに陽性となるヒト由来血管内皮細胞が細胞移植群すべてに認められた (data not shown)。非細胞投与群である IMDM 投与群では、ヒト由来細胞はみられなかった。よって、CB CD133 陽性細胞は、マウス虚血筋肉内で、血管内皮に分化したと考えられた。

以上より、我々の開発した hJagged-1 発現 HESS-5 ストローマ細胞を用いた体外培養法え r により、CB CD133 陽性細胞から治療効果をもつヒト EPC を増幅可能であることが示され、本研究では、新たな細胞再生医療の開発につながる成果が得られた。

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 2 件)

- ① Kwon SM, Eguchi M, Wada M, Iwami Y, Hozumi K, Iwaguro H, Masuda H, Kawamoto A, Asahara T. Specific Jagged-1 signal from bone marrow microenvironment is required for endothelial progenitor cell development for neovascularization. *Circulation*. 118(2):157-65, 2008, 査読有
- ② Rica Tanaka, Mika Wada, Sang Mo Kwon, Haruchika Masuda, Rie Ito, Jacquelyn Carr, Muneo Miyasaka, Stephen M Warren, Takayuki Asahara, Oren Tepper: The Effects of Flap Ischemia on Normal and Diabetic Progenitor Cell Function. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 121(6):1929-42, 2008, 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 和田美夏、権相模、江口正倫、伊藤理恵、小堀みちる、穂積勝人、松本太郎、麦島秀雄、増田治史、浅原孝之。ヒト CD133 陽性細胞由来血管内皮前駆細胞における Notch シグナルの役割。第 8 回日本再生医療学会, 2009. 3. 5, 東京
- ② 和田美夏、権相模、江口正倫、伊藤理恵、小堀みちる、穂積勝人、松本太郎、麦島秀雄、増田治史、浅原孝之。ヒト CD133 陽性細胞由来血管内皮前駆細胞における Notch シグナルの役割。第 11 回循環器再生医療研究会, 2009. 5. 23, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 美夏 (WADA MIKA)
日本大学・医学部・助教
研究者番号：90420950

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし