

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500573

研究課題名（和文） 内皮幹細胞及び樹状突起細胞の動態からみた全身諸臓器血管活性化

研究課題名（英文） Mobilization of endothelial progenitor cells and vascular dendritic cells of bone marrow origin in the organs and vascular system of the whole body

研究代表者

南條 博 (NANJO HIROSHI)

秋田大学・医学部・准教授

研究者番号：70250892

研究成果の概要（和文）：骨髄より動員された内皮幹細胞と樹状突起細胞が、全身諸臓器の血管の活性化に直接関与することを成体で明らかにする目的で、本研究を遂行した。骨髄キメラマウス4ヶ月のトレッドミル負荷1週-4週後の全身諸臓器を詳細に観察した。得られた主な知見は以下の通りである。1) 骨髄由来樹状突起細胞が多く出現している部位とまったく見られない部位に分かれているのが特徴で、一様の分布ではない。2) 骨髄由来樹状細胞は肋間動脈開口部で多く見られる。3) 骨髄由来樹状細胞の出現頻度はトレーニングマウスとトレーニングしないマウスで有意な差はみられない。4) 骨髄由来樹状細胞の出現頻度はトレーニング1～4週で差はみられない。5) 骨髄由来内皮細胞は上行大動脈起始部にみられる。6) 心臓毛細血管では多数の骨髄由来内皮細胞がみられる。7) 全身諸臓器の動脈、静脈、リンパ管に骨髄由来内皮細胞がみられる。さらに、週齢による骨髄由来内皮幹細胞と樹状突起細胞の動態を検討し、以下のことが判明した。8) 骨髄由来樹状細胞は週齢とともに増加し、大動脈弓から下行胸部大動脈、72週では腹部大動脈に至る大動脈ほぼ全体に分布する。最終的に動脈硬化のない老齢マウスにおいて、骨髄由来樹状細胞が大動脈内膜全体に分布するという世界で初の知見を病理形態学的に証明した。

研究成果の概要（英文）：Appearance and distribution of endothelial progenitor cells and vascular dendritic cells of bone marrow origin were examined in the organs and vascular system in the whole body using bone marrow transplantation chimeric mice. The main results were as follows. A lot of endothelial cells of bone marrow origin were seen in the cardiac capillaries. No endothelial cell of bone marrow origin was seen in the aorta except for the orifice of the ascending aorta and aortic valve. Many vascular dendritic cells of bone marrow origin were mobilized in the non-atherosclerotic aorta in all the mice. In proportion as the mice were older, vascular dendritic cells of bone marrow origin increased and their clusters were seen in almost all the aorta from the aortic orifice to the abdominal aorta. Vascular dendritic cells of bone marrow origin may be some defensive role for atherosclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：内皮幹細胞、樹状突起細胞、血管樹状細胞、骨髄由来、活性化

### 1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞、脳梗塞、脳出血等、循環器系致死疾患の主因となる動脈硬化症や動脈瘤の本態についてはいまだ不明である。欧米諸国が世界をリードして研究されてきた脂質代謝異常、特に高コレステロール血症が粥状動脈硬化の主因であると、様々な抗コレステロール薬投与による治療が臨床の場で広く行われている。しかし、特に日本では脂質代謝異常や高コレステロール血症がなくても動脈硬化症が進行している多くの患者が存在する。最近ではメタボリックシンドロームという新たな概念が提唱されたが、抗コレステロール薬投与により逆に脳梗塞の発症率を高める場合があることが判明、高コレステロール血症の基準値修正の議論がなされるなど、高コレステロール血症の概念、病態、治療そのものの信頼性が揺らいでおり、早急に動脈硬化症の本態を明らかにする必要がある。さらに、動脈硬化症を防ぐ方法としてトレーニング（適度な運動）が推奨されているが、そのメカニズムに対する明確な答えはいまだない。

我々は、動脈における血管内皮細胞には血流を認識（感知）し、血流に対するリモデリング（再形成）の指令を行うという重要な機能を明らかにした（Nanjo H, Sho E, Masuda H, et al. Exp Mol Pathol. 80:38-45, 2006. Sho E, Nanjo H, Masuda H, et al. J Vasc Surg. 41: 844-852, 2005. Sho E, Nanjo H, Masuda H, et al. J Vasc Surg. 39: 601-612, 2004. Sho E, Nanjo H, Masuda H, et al. Exp Mol Pathol. 75: 1-11, 2003.）。また、家兎電気刺激により骨格筋の血流量を増大させると、骨格筋毛細血管新生及び内皮細胞の増殖が生じることを明らかにした（Masuda H, Nanjo H, Kawamura K, et al: Microsc Res Tec 60:2-12, 2003. Ebina T, Kobayashi M, Nanjo H, Masuda H, et al: Pathology International 52: 702-712, 2002.）。成体の幹細胞が存在し、血管内皮前駆細胞が血液中に存在することが判明（Asahara T, Isner JM, et al. Science 275: 964-967, 1997.）、また、胚における血球発生において内皮細胞からBリンパ球が生じることが証明され（Nishikawa S, Fraser S, et al. Immunol. rev. 175: 112-119, 2000.）、内皮幹細胞のより多元的あるいは祖先的な能力が注目されている。我々は、実験的大動脈瘤モデルにおいてCD34陽性細胞の局在と分化が血流制御に密接に関連していることを証明した（Sho

E, Nanjo H, Masuda M, et al. J Vasc Surg 41(5): 844-852, 2005. Sho E, Nanjo H, Masuda H, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20: 1916-1921, 2004.）。骨髄には多種類の幹細胞が含まれており、我々は骨髄キメラマウスで全身諸臓器の血管に骨髄由来内皮幹細胞が動員されることを確認した。また、最近の研究で骨髄由来内皮幹細胞だけでなく、骨髄由来樹状突起細胞が大動脈に動員されているという事象を捉えつつある。トレーニング（適度な運動負荷）の効果を、骨髄由来内皮幹細胞及び樹状突起細胞の動態から評価しようとする研究は、いままでも国内外で行われていない、独創的なものである。漠然と動脈硬化症や糖尿病等の成人病予防ないし老化予防に有効とされているトレーニングの基盤的意義を血管活性化という視点から明らかにし、新しい治療法ないしトレーニング法の開発研究に寄与したいと考え、本研究を遂行した。

### 2. 研究の目的

骨髄より動員された内皮幹細胞と樹状突起細胞が、全身諸臓器の血管の活性化に直接関与することを成体で明らかにする。具体的には骨髄キメラマウスを用いたトレッドミル運動負荷トレーニングにより、ドナー骨髄由来の内皮幹細胞と樹状突起細胞がレシピエント全身諸臓器の血管で分化、増殖し、生着することを、形態学的に解明する。

### 3. 研究の方法

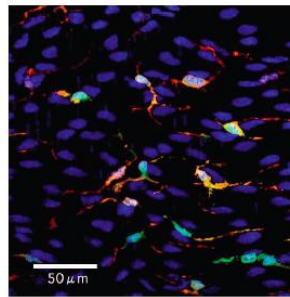
最初に GFP 骨髄キメラマウスを作製し、骨髄移植4ヶ月後からトレッドミルによる運動を荷したトレーニングモデルマウスを作製した。1) 骨髄キメラマウスの作製：ドナーとして蛍光発現するC57BL/6J-Tg(CAG-EGFP)トランスジェニックマウス(GFPマウス)(Okabe M. et al.: FEBS lett. 407, 313-319. 1997.)を、レシピエントとしてC57BL/6Jワイルドタイプマウスを用い、 $1.5 \times 10^7$  個/0.2-0.5ml mediumをレシピエントマウスの尾静脈から注入した。2) キメラマウスの確認：レシピエントの骨髄、脾臓を抗 GFP抗体で免疫組織化学染色で確認した。3) トレッドミル運動負荷モデルの作製：骨髄移植4ヶ月後にトレッドミル運動負荷モデルを作製した。トレッドミル負荷は1日2時間で1-4週間連続とし、それぞれトレッドミル負荷直後に屠殺し、運動負荷を課さないモデルをコントロール群とした。4) 組織標本作

製：マウスは屠殺1時間前に、BrdU (0.05mg/gの生理食塩溶液)を腹腔内に投与し、ネンプタール過量投与で屠殺した。キメラマウスを4%パラホルムアルデヒド液で大動脈灌流固定後、全身諸臓器の凍結およびパラフィン組織ブロックを作製した。大動脈は上行大動脈起始部から腸骨動脈分岐部までを切り出し、約5mm長の切片に分けてリン酸バッファーに入れ、全載標本用として、凍結切片用ブロックとともにディープフリーザーに保存した。5) さらに、週齢による骨髄由来内皮幹細胞、樹状突起細胞の動態を検討する目的で、骨髄移植後、17、22、32、48、52、57、60、64、72週間長期飼育マウスを作製した。6) GFPとCD34、CCD11、核BrdU標識を合わせた多重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、骨髄由来の内皮細胞、樹状突起細胞、周皮細胞、平滑筋細胞の出現パターンを形態学的に検討した。

#### 4. 研究成果

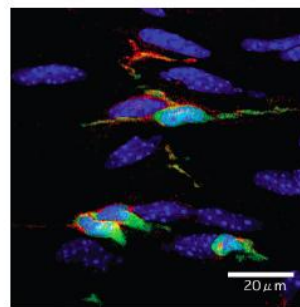
骨髄キメラマウス4ヶ月のトレッドミル負荷1週-4週後の全身諸臓器を詳細に観察した。得られた主な知見は以下の通りである。1) 骨髄由来樹状突起細胞が多く出現している部位とまったく見られない部位に分かれているのが特徴で、一様の分布ではない。2) 骨髄由来樹状細胞は肋間動脈開口部で多く見られる。3) 骨髄由来樹状細胞の出現頻度はトレーニングマウスとトレーニングしないマウスで有意な差はみられない。4) 骨髄由来樹状細胞の出現頻度はトレーニング1~4週で差はみられない。5) 骨髄由来内皮細胞は上行大動脈起始部にみられる。6) 心臓毛細血管では多数の骨髄由来内皮細胞がみられる。7) 全身諸臓器の動脈、静脈、リンパ管に骨髄由来内皮細胞がみられる。さらに、週齢による骨髄由来内皮幹細胞と樹状突起細胞の動態を検討し、以下のことが判明した。8) 骨髄由来樹状細胞は週齢とともに増加し、大動脈弓から下行胸部大動脈、72週では腹部大動脈に至る大動脈ほぼ全体に分布する。最終的に動脈硬化のない老齢マウスにおいて、骨髄由来樹状細胞が大動脈内膜全体に分布するという世界で初の知見を病理形態学的に証明した。

図1：骨髄由来血管樹状細胞（大動脈）



Green: EGFP<sup>+</sup> cells  
Red: GFP<sup>+</sup> cells

図2：骨髄由来血管樹状細胞（大動脈）



Red: CD11c<sup>+</sup> cells  
Green: EGFP<sup>+</sup> cells  
(auto fluorescence)

図3：17週の骨髄由来血管樹状細胞の分布（大動脈）

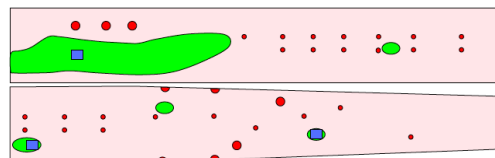


図4：48週の骨髄由来血管樹状細胞の分布（大動脈）

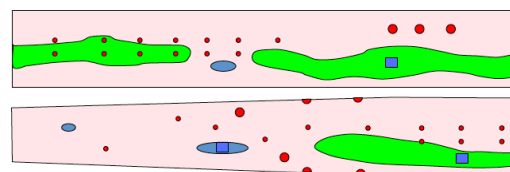
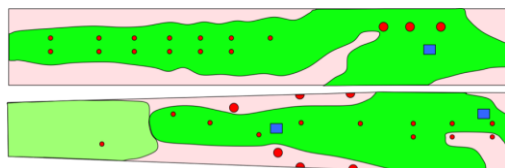


図5 : 72 週の骨髄由来血管樹状細胞の分布  
(大動脈)



#### 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 1 件)

① Yoshida Makoto, Nanjo Hiroshi, Takahashi Masato, Kobayashi Mikio, Kawamura Kouiti, Masuda Hirotake, et al. (13, ③), Weaving hypotheses of myocardial sarcomeres- Discovery of periodic broadening and narrowing of intercalated disc during volume-load change-. American Journal Pathology, 査読有, Vol.176, 2010, 660-678

[学会発表] (計 15 件)

① Takahashi Masato, Nanjo Hiroshi, et al., Transit amplifying maintains normal aortic endothelial turnover : Revisit of replicating aortic endothelial cell cluster of Schwartz and Benditt (1976). Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, Annual Conference 2010, April 8-10, 2010, San Francisco, USA.

② 南條 博, 小林實貴夫, 他, 動脈・毛細血管・リンパ管・静脈の骨髄由来内皮幹細胞. 第99回日本病理学会総会, 2010年4月27-29日, 東京

③ 高橋正人, 南條 博, 他, 非破裂分節性中膜壊死性動脈炎の2例. 第99回日本病理学会総会, 2010年4月27-29日, 東京

④ 小松正代, 南條 博, 他, 1.5day transient high blood flow tears internal elastic lamina after 7-day. 第99回日本病理学会総会, 2010年4月27-29日, 東京

⑤ Masuda Hirotake, Nanjo Hiroshi, et al., Venous Narrowing After Long Time High Flow In Experimental Canine Carotid-Jugular Fistula. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, Annual Conference 2009, April 29- May 1, 2009. Washington, D.C., USA.

⑥ 南條 博, 小林實貴夫, 他, 骨髄由来内皮細胞の動態からみた臓器不均等分布の意義. 第98回日本病理学会総会, 2009年5月1-3日, 京都

⑦ 高橋正人, 南條 博, 他, 血流負荷ウサギ総頸動脈における拡張性リモデリング時の増

殖平滑筋細胞は骨髄由来である. 第98回日本病理学会総会, 2009年5月1-3日, 京都  
⑧ 小松正代, 南條 博, 他, 血流負荷家兎総頸動脈の ex vivo における経時的変化. 第98回日本病理学会総会, 2009年5月1-3日, 京都

⑨ Nanjo Hiroshi, Masuda Hirotake, et al., Localization and Distribution of Endothelial Cells of Bone Marrow Origin Associated with Hemodynamic Conditions. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, Annual Conference 2008, April, 16-18, 2008, Georgia, USA.

⑩ Mikio Kobayashi, Hirotake Masuda, et al., Dendritic Cells and Smooth Muscle Cells of Bone Marrow Origin at the Non-atherosclerotic Normal Aorta in Old Mice. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, Annual Conference 2008, April, 16-18, 2008, Georgia, USA.

⑪ 南條 博, 増田弘毅, 他, 骨髄由来内皮細胞の基本的動態における臓器不均等. 第97回日本病理学会総会. 2008年5月15-17日, 金沢

⑫ 高橋正人, 南條 博, 他, 血流負荷ウサギ総頸動脈における増殖内皮細胞の in vitro 培養についてオリンパスLCV100を用いた検討. 第97回日本病理学会総会. 2008年5月15-17日, 金沢

⑬ 小林實貴夫, 南條 博, 他, 長期生存骨髄キメラマウスの大動脈で見られたドナー由来の平滑筋様細胞および樹状細胞. 第97回日本病理学会総会. 2008年5月15-17日, 金沢

⑭ 吉田 誠, 南條 博, 実験的容量負荷心肥大の研究. 第97回日本病理学会総会. 2008年5月15-17日, 金沢

⑮ 小松正代, 南條 博, 血流負荷動脈の ex vivo における経時的変化. 第97回日本病理学会総会. 2008年5月15-17日, 金沢

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

南條 博 (NANJO HIROSHI)  
秋田大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 70250892

##### (2) 研究分担者

小林 実貴夫 (KOBAYASHI MIKIO)  
秋田大学・大学院医学系研究科・技術長  
研究者番号 : 20375306

##### (3) 連携研究者

増田 弘毅 (MASUDA HIROTAKE)  
秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 60103462

川村 公一 (KAWAMURA KOICHI)  
秋田大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号 : 00091801

高橋 正人 (TAKAHASHI MASATO)  
秋田大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号 : 10315806