

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790709

研究課題名(和文) 骨髄由来細胞をターゲットにした動脈硬化性疾患に対する治療戦略

研究課題名(英文) Therapeutic Strategy Against Atherosclerotic Disease Targeting Bone Marrow-Derived Cells

研究代表者

岩田 洋 (IWATA HIROSHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00451807

研究成果の概要(和文)：

背景：リンパ球・単球・マクロファージなどの骨髄由来細胞は平滑筋類似の形質を獲得し、血管リモデリングに寄与することが報告されている。本研究において、我々はリンパ球・単球・マクロファージのサブクラスの多様な機能と分化制御機構に着目し、血管病への骨髄由来細胞の機能を明らかにすることを試みた。

方法と結果：

- 1) マウスを用いた実験：マウス高分化型(収縮型)平滑筋に発現する平滑筋マーカー、平滑筋ミオシン重鎖(SM myosin heavy chain；SM-MHC)に対するきわめて特異度の高い抗体を新たに作製、さらに細胞起源を研究する目的でSM-MHCノックインマウス(SM-MHCを発現するとLacZを発現する=X-gal染色で青色に染まる)、やや分化度の低い平滑筋にも発現する平滑筋マーカー、平滑筋 $\alpha$ -アクチン(SM $\alpha$ -actin)が発現するとGFPが発現するトランスジェニックマウスの両マウスラインを確立、それらのマウスの骨髄細胞を放射線により骨髄細胞を破壊した野生型マウスに移植し、さまざまな血管リモデリングのモデルマウス(ガイドワイヤーによる血管障害モデル、ApoEノックマウスを用いた高コレステロール動脈硬化モデル、心移植による動脈硬化モデル)を行い、骨髄由来細胞の関与と分化度を検討した。その結果、骨髄由来細胞は、①血管リモデリング部位に浸潤する ②SM-MHCは発現しないが、SM $\alpha$ -actinは発現する。ということが明らかとなった。そのため、血管リモデリングにおいて、骨髄由来細胞は、平滑筋細胞様の形質を獲得するが、高分化型平滑筋細胞へは分化しない、ということが明らかとなった。さらに、その骨髄由来平滑筋”様”細胞の働きや細胞系を詳しく解析するため、動脈リモデリングマウスから骨髄由来SM $\alpha$ -actin陽性細胞(骨髄由来平滑筋”様”細胞)を単離し、その形質を詳細に検討したところ、骨髄由来平滑筋”様”細胞は炎症性単球(inflammatory monocytes)の形質を有することが明らかとなった。
- 2) 心筋梗塞症例の閉塞冠動脈から吸引された血栓の解析：心筋梗塞の診断にて東京大学付属病院に入院した68人から吸引された108個の冠動脈内血栓を組織学的に検討したところ、血栓内に含まれる幼若細胞(CD34陽性細胞)の比率が高いほど、慢性期の再狭窄が高率であった。

結語：

骨髄由来細胞は血管障害に際し動員され、病変に浸潤、炎症細胞としての形質と同時に平滑筋の形質を一部発現しながら、血管リモデリングの促進にはたらくと考えられる。

研究成果の概要(英文)：

**Background-** It has been proposed that bone marrow-derived cells infiltrate the neointima, where they differentiate into smooth muscle (SM) cells; however, technical limitations have hindered clear identification of the lineages of bone marrow-derived "SM cell-like" cells.

**Methods and Results-** Using a specific antibody against the definitive SM cell lineage marker SM myosin heavy chain (SM-MHC) and mouse lines in which reporter genes were driven by regulatory programs for either SM-MHC or SM $\alpha$ -actin, we demonstrated that although some bone marrow-derived cells express SM $\alpha$ -actin in the wire injury-induced neointima,

those cells did not express SM-MHC, even 30 weeks after injury. Likewise, no SM-MHC+ bone marrow-derived cells were found in vascular lesions in apolipoprotein E-/-mice or in a heart transplantation vasculopathy model. Instead, the majority of bone marrow-derived SM $\alpha$ -actin+ cells were also CD115+CD11b+F4/80+Ly-6C+, which is the surface phenotype of inflammatory monocytes. Moreover, adoptively transferred CD11b+Ly-6C+ bone marrow cells expressed SM $\alpha$ -actin in the injured artery. Expression of inflammation-related genes was significantly higher in neointimal subregions rich in bone marrow-derived SM $\alpha$ -actin+ cells than in other regions.

**Conclusions-** It appears that bone marrow-derived SM $\alpha$ -actin+ cells are of monocyte/macrophage lineage and are involved in vascular remodeling. It is very unlikely that these cells acquire the definitive SM cell lineage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：①動脈硬化②細胞起源③骨髄由来細胞④平滑筋細胞 ⑤分子メカニズム

#### 1. 研究開始当初の背景

本研究計画は、動脈硬化などの血管病変の発生・進展に対する骨髄由来細胞の多彩な機能を解明し、その機能の制御機構を同定して新しい抗血管リモデリング治療開発へと発展させることを目的とする。我々のこれまでの検討は、単球・マクロファージが平滑筋類似の形質を獲得し、血管リモデリングに寄与することを示唆する。そこで、単球・マクロファージのサブクラスの多様な機能と分化制御機構に着目し、血管病への骨髄由来細胞の機能を明らかにする。

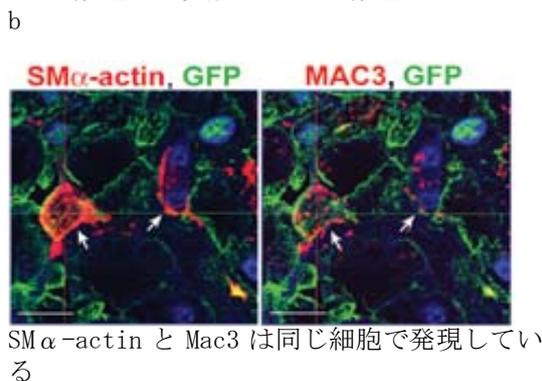
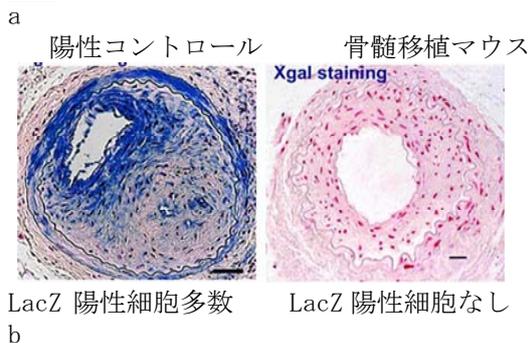
動脈硬化性疾患は近年増加の一途をたどり、そのメカニズムの解明と治療法の開発・確立は喫緊の課題である。血管平滑筋細胞は、病的状態では劇的に形質を変化（形質変換）させて、血管障害に対し防御的にはたらくと同時に、臓器虚血の原因となる血管リモデリングにおいて重要な役割を果たすことはよく知られている。従来、血管リモデリングの際に見られる平滑筋細胞は、もともと血管の中膜に存在する平滑筋細胞が内膜に遊走、増殖したものと考えられてきた。しかし、我々のグループが、骨髄由来細胞が血管病変で平滑筋細胞類似の形質を示すことを明らかにして以来(*Nat Med* 8, 403-9 2002)、同様の

報告が次々と多数なされ、血管病変への骨髄由来細胞の関与が広く認められるようになってきた。ところが、骨髄由来細胞の系譜や分化、またどのように病変形成に寄与するかは不明のまま残されており、血管病態における意義もまだ明らかではない。平滑筋様の形質を示すことから、単純に平滑筋と同じ機能を持っていると推察されてきたに過ぎない。これまで骨髄由来平滑筋様細胞の同定にマーカーとして主に使われてきた平滑筋 $\alpha$ アクチン(SM $\alpha$ -actin)は、筋線維芽細胞を含む様々な非平滑筋細胞に発現し、特異的なマーカーではない。我々は、骨髄由来細胞の系譜を明確に同定するために、きわめて平滑筋特異性の高い平滑筋ミオシン重鎖(SM-MHC)遺伝子に着目し(*Curr Atheroscler Rep* 5, 214-22 2003)、SM-MHC遺伝子座にLacZ遺伝子をノックインした平滑筋レポーターマウス(SM-MHC-LacZマウス)、マウスSM-MHCアイソフォームSM1に特異的なモノクローナル抗体を作成した。また、SM $\alpha$ -actin陽性細胞の系譜を検討するために、SM $\alpha$ -actinプロモーターによりEGFP遺伝子発現が制御されるSM $\alpha$ -actin-EGFPトランスジェニックマウスも確立した。

SM-MHCおよびSM $\alpha$ -actinレポーターマウス

の骨髄を野生型マウスに移植、血管障害を加えたところ、骨髄由来細胞は血管リモデリング部位に動員され、一部は（約 20%）SM $\alpha$ -actinを発現するが、SM-MHCは全く発現しないこと（図 1a）を明らかにした。この結果は**骨髄由来細胞は平滑筋細胞に分化しない**ことを明確に示すものである。さらに骨髄由来SM $\alpha$ -actin陽性細胞の形質を検討したところ、これらの細胞は一部の平滑筋マーカーと同時に、単球・マクロファージのマーカーを発現していることが明らかとなった（図 1b）。

【図 1】



また、骨髄由来SM $\alpha$ -actin陽性細胞は、細胞外基質、基質分解酵素、サイトカインなどを盛んに分泌し、血管壁のリモデリングに積極的に寄与していることが明らかとなった。つまり、**骨髄由来の単球・マクロファージ系の細胞は、平滑筋細胞あるいは筋線維芽細胞様の形質を獲得し、従来考えられきた炎症細胞とは全く異なる機能を獲得し、血管壁のリモデリングを制御する**と考えられる

## 2. 研究の目的

これまでに、申請者らのグループは心血管リモデリングの分子機構に注目し、血管平滑筋細胞におけるSM-MHC分子の同定とその解析、血管リモデリングにおける持続する慢性炎症の重要性の指摘、心血管リモデリング (*Nat Med* 8, 856 - 863, 2002) のみならず脂質・糖代謝にも重要なはたらきを果たす (*Nat Med* 14, 656 - 666 2008) 転写因子：KLF5 の分離同定などの成果をあげてきた。さらに、血管リモデリングにおいて骨髄由来細胞が平滑

筋細胞の形質を一部獲得することを示した。 (*Nat Med* 8, 403 - 409, 2002) その後申請者はレポーターマウスを用いて解析を行い、病変に存在する骨髄由来血管平滑筋様細胞は平滑筋細胞とは異なり、単球・マクロファージ系細胞が平滑筋様形質を獲得したものであることを明らかにした。本研究計画ではこの解析をさらにすすめて、1) 単球・マクロファージと骨髄由来平滑筋様細胞 (SM $\alpha$ -actin陽性細胞) の細胞系譜を解析するとともに、血管病態における機能的役割を明らかにする。また、2) 平滑筋様細胞への分化や血管病変への遊走を刺激する因子と、分化を制御する転写機構を解析する。最終的には、3) 骨髄由来細胞を標的とした治療戦略の確立へと発展させることを最終的な目的とする。

## 3. 研究の方法

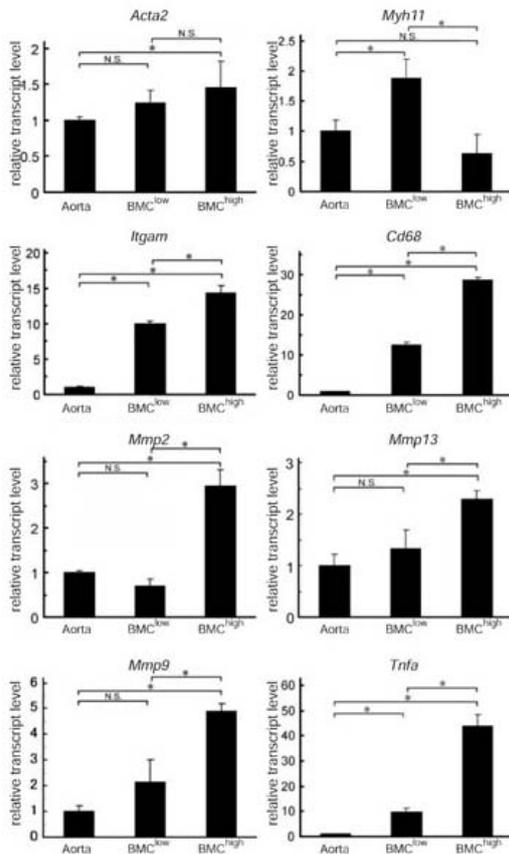
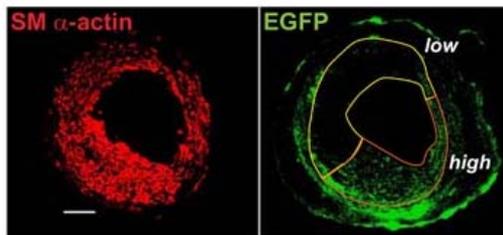
- 1) マウスを用いた実験: マウス高分化型 (収縮型) 平滑筋に発現する平滑筋マーカー、平滑筋ミオシン重鎖 (SM myosin heavy chain; SM-MHC) に対するきわめて特異度の高い抗体を新たに作製、さらに細胞起源を研究する目的で SM-MHC ノックインマウス (SM-MHC を発現すると LacZ を発現する=X-gal 染色で青色に染まる)、やや分化度の低い平滑筋にも発現する平滑筋マーカー、平滑筋 $\alpha$ -アクチン (SM $\alpha$ -actin) が発現すると GFP が発現するトランスジェニックマウスの両マウスラインを確立、それらのマウスの骨髄細胞を放射線により骨髄細胞を破壊した野生型マウスに移植し、さまざまな血管リモデリングのモデルマウス (ガイドワイヤーによる血管障害モデル、ApoE ノックマウスを用いた高コレステロール動脈硬化モデル、心移植による動脈硬化モデル) を行い、骨髄由来細胞の関与と分化度を検討した。さらに、骨髄由来平滑筋”様”細胞の働きや細胞系を詳しく解析するため、動脈リモデリングマウスから骨髄由来 SM $\alpha$ -actin 陽性細胞 (骨髄由来平滑筋”様”細胞) を単離し、フローサイトメトリーを用いてその形質を詳細に検討した。
- 2) 心筋梗塞症例の閉塞冠動脈から吸引された血栓の解析: 心筋梗塞の診断にて東京大学付属病院に入院した 68 人から吸引された 108 個の冠動脈内血栓と冠動脈から吸引された末梢血を組織病理学的に、あるいはフローサイトメトリーを用いて細胞表面抗体の検討を行い、さらに慢性期 (心筋梗塞発症後 6 ヶ月程度) の血管造影所見における狭窄度を QCA (Quantitative Coronary Analysis) を用いて定量的に評価した。

## 4. 研究成果

平成 21 年度

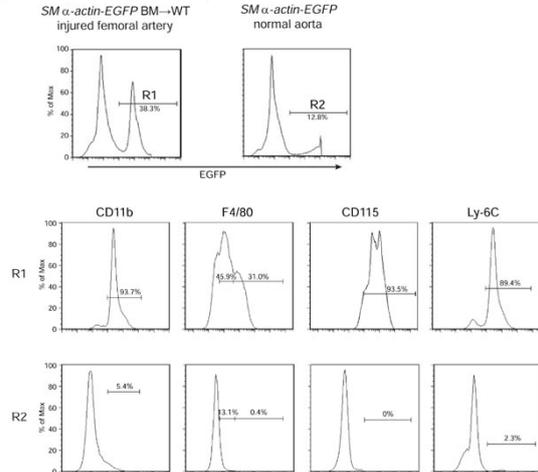
① SM $\alpha$ -actin-EGFP レポーターマウス骨髄を野生型に移植した骨髄置換(キメラ)マウスを作成、それに対し、多様な血管障害を行い、血管病変形成を誘導する。その後、病変を含む血管組織を採取、細胞を単離した上で、フローサイトメトリーを用い GFP 発現細胞(平滑筋様細胞であることを意味する)を分離、それらを培養し遺伝子発現・表面マーカー発現・機能(遊走能、増殖能などの)解析を行い、マクロファージ・単球との相同性、相違を明確にした。

図 2 : 骨髄由来細胞(緑)が多数集簇している部分と、そうでない部分を切り離し、それぞれの部位での遺伝子発現を検討した。



骨髄由来細胞の集簇している部位では、SMMHC の発現は少なく、炎症性サイトカインの発現が多かった。SM $\alpha$ -actin の発現には両者でほぼ同様であった。

図 3 : 血管リモデリング部位における骨髄由来 SM $\alpha$ -actin 細胞を単離し、その表面抗原を解析、細胞系譜を検討した。

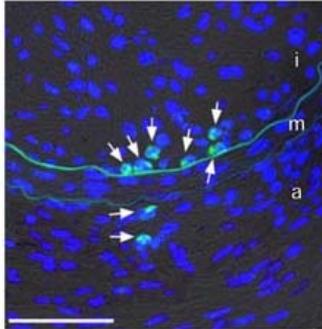
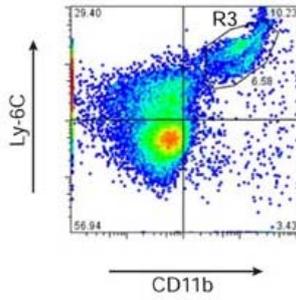


骨髄由来 SM $\alpha$ -actin 陽性細胞は、M1 マクロファージの形質を有していることが明らかとなった。

平成 22 年度

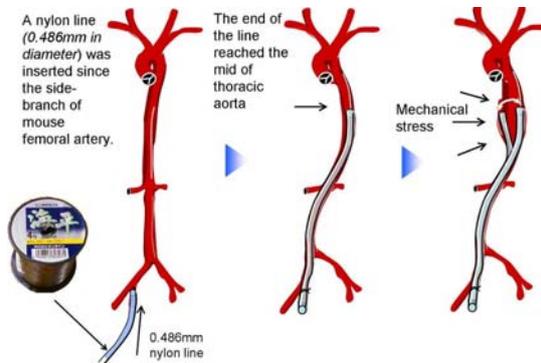
- ① SM $\alpha$ -actin プロモーターによってヒトジフテリア毒素受容体を発現するトランスジェニックマウスを作成することに成功した。
- ② 新たな血管障害モデル(市販の釣り糸を用い、マウス大動脈内に持続的な物理的血管障害を与え、血管リモデリングを促進させる)の作製に成功した。

図 4 : GFP にてラベルした骨髄細胞中の CD11b/Ly6c 陽性細胞を単離し、野生型マウスに静脈注射、その上で血管障害モデルをいって血管リモデリングを引き起こし、病変部を観察した。



GFPにてラベルされた細胞が病変部で観察された。

図5: 新たな血管障害モデル: 釣り糸モデルの紹介

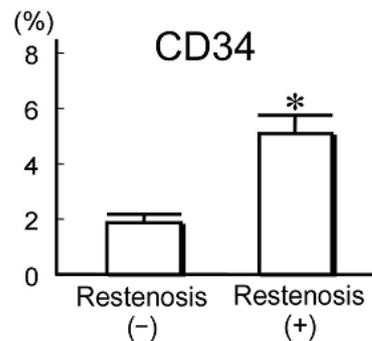
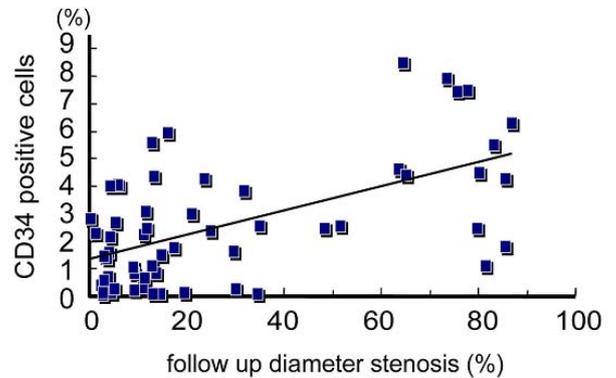
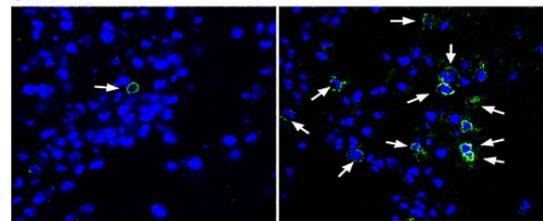


上記のマウスモデルを用いた実験の結果、血管病変に集簇する骨髄由来 SM $\alpha$ -actin 陽性細胞は、マクロファージ、あるいは単球の形質を有しながら、SM $\alpha$ -actin も同時に発現していることが明らかとなった。特にマクロファージのサブタイプの中でも炎症を促進すると考えられる M1 マクロファージの形質を強く発現していることが示された。それらを勘案すると、血管病変において観察される骨髄由来 SM $\alpha$ -actin 陽性細胞は、これまでに腎臓・肺で繊維化などの臓器リモデリングに寄与すると報告された (N Engl J Med 2001 など) circulating fibrocytes と大きな相同性を有することが示唆され、同細胞の詳細

な解析は動脈硬化のみならず、さまざまな臓器リモデリングの解明に極めて有用である可能性が考えられた。さらに、心筋梗塞症例の閉塞冠動脈から吸引された血栓の解析: 心筋梗塞の診断にて東京大学附属病院に入院した 68 人から吸引された 108 個の冠動脈内血栓と冠動脈から吸引された末梢血を組織病理学的に、あるいはフローサイトメトリーを用いて細胞表面抗体の検討を行い、さらに慢性期 (心筋梗塞発症後 6 ヶ月程度) の血管造影所見における狭窄度を QCA (Quantitative Coronary Analysis) を用いて定量的に評価したところ、血栓中の CD34 陽性細胞 (幼若細胞) の比率と、慢性期の再狭窄率は有意な正の相関を認めた。上記の結果は、おそらくは骨髄から動員され、病変部に浸潤した幼弱な細胞が、血管リモデリング=新生内膜増殖に何らかの働きをしていることを示唆していると考えられる。

図6

急性心筋梗塞症例における冠動脈内血栓の解析: CD34 陽性細胞比率と慢性期冠動脈狭窄率との関連



CD34 陽性細胞率と慢性期冠動脈狭窄度には

有意な正の相関が認められ、再狭窄を認めた症例においては、再狭窄を認めなかった症例に比してCD34陽性率は有意に高値であった

#### 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 岩田 洋、真鍋一郎、藤生克人、山本哲史、武田憲文、江口航生、古谷安希子、黒尾 誠、佐田政隆、永井良三、” Bone Marrow-Derived Cells Contribute to Vascular Inflammation but Do Not Differentiate Into Smooth Muscle Cell Lineages” 査読有、*Circulation* 122 巻、2010、2048-2057
- ② 岩田 洋、佐田政隆、安東治郎、藤田英雄、森田敏宏、澤城大悟、高橋政夫、平田陽一郎、高梨秀一郎、田端 実、平田恭信、永井良三、” Impact of primitive cells in intracoronary thrombi on lesion prognosis: temporal analysis of cellular constituents of thrombotic material obtained from patients with acute coronary syndrome” 査読有、*Heart* 96 巻、2010、748-755

[学会発表] (計3件)

- ① Hiroshi Iwata, Masataka Sata, Jiro Ando, Hideo Fujita, Daigo Sawaki, Masao Takahashi, Yasunobu Hirata, and Ryozo Nagai: Abstract 19704: “Significant Correlation between Primitive Cells in Intracoronary Thrombi in Patients with Myocardial Infarction and Lesion Progression” *Circulation*, 23 November 2010; 122: A19704. (2010 年 American Heart Association Annual Scientific Meeting, 於アメリカ合衆国シカゴ)
- ② Hiroshi Iwata, Ichiro Manabe, Katsuhito Fujiu, Norifumi Takeda, Kosei Eguchi, Masataka Sata, and Ryozo Nagai Abstract 5429: “Bone Marrow-derived Cells Contribute to Vascular Inflammation but Do Not Differentiate Into Smooth Muscle Cell Lineages” *Circulation*, Nov 2009; 120: S1090 - S1091. (2009 年 American Heart Association Annual Scientific Meeting, 於アメリカ合衆国オランダ)
- ③ Hiroshi Iwata, Ichiro Manabe, and Ryozo Nagai Abstract 4958: “A Novel Mouse Model of Thoracic Aortic Aneurysm Revealed the Protective Property of TNF-alpha Against the Rupture of Aneurysm” *Circulation*, Nov 2009; 120: S1030. (2009 年 American Heart

Association Annual Scientific Meeting, 於アメリカ合衆国オランダ)

[図書] (計1件)

岩田 洋、永井良三 メディカルレビュー社 高血圧ナビゲーター第3版、表題：血管リモデリング

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等  
-なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岩田 洋 (IWATA HIROSHI)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：00451807

(2) 研究分担者 該当なし  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 該当なし  
( )

研究者番号：