

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 19 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590765

研究課題名（和文） 骨髄由来内皮前駆細胞におけるプロスタノイドの包括的役割解明

研究課題名（英文） Role of prostanoids in the bone marrow derived endothelial cells

研究代表者

岡田 基（OKADA MOTOI）

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：80431427

研究成果の概要（和文）：

骨髄由来内皮前駆細胞（EPC）における血管ホメオスターシスに關与するプロスタノイドPGであるPGI₂およびTXA₂の役割を解明した。EPCには、PGの特異的受容体を発現しており、PGそれぞれの特異的受容体欠損マウスおよび、同マウス由来EPCを用いて、血管リモデリングモデルおよび下肢虚血モデルを用いて、これらのPGによって、EPC機能が厳密に制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We clarified the role of vascular prostanoids, i.e. prostacyclin and thromboxane in the bone marrow-derived endothelial cells (EPC). EPC expressed their specific receptor, IP and TP respectively. We observed the functional changed of EPCs derived from IP- or TP-deleted mice using injured femoral artery vascular remodeling and peripheral ischemic models. Finally we found that PGI₂ and TXA₂ strictly regulated the function of EPCs and contribute to the pathogenesis of vascular diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学臨床医学・循環器内科

キーワード：臨床心血管病態学 プロスタノイド

1. 研究開始当初の背景

虚血性心血管疾患における血管新生や障害血管の修復において、EPCの重要性がクローズアップされ、すでに患者本人のEPCや単核球細胞を用いた細胞導入療法の臨床

応用が試されている。しかし、その効果は決して十分なものといえず、本格的な臨床応用のレベルに至っていない。患者本人から採取したEPCを利用するというコンセプトの

細胞導入療法は、拒絶反応などの面で安全性の高い。しかし、EPC機能を低下させることが知られている糖尿病などの基礎疾患を罹患していることが多い心血管系疾患患者から機能が保たれたEPCを利用することが困難であるという根本的問題点がある。今後、本格的なEPCを利用した臨床応用のためにも、EPCを含めた再生前駆細胞の機能維持に関する機序解明が必要である。

我々は、EPCはPGI₂産生細胞であり、その受容体(IP)をもち、PGI₂オートクラインあるいはパラクライン作用により厳密に機能制御を受けており、障害血管リモデリングや虚血臓器における血管新生などの病態に非常に重要であることを明らかにしてきた。プロスタノイド(PG)の中で、トロンボキサン(TXA₂)は、血小板凝集、血管平滑筋収縮や細胞増殖など動脈硬化促進性PGと認識されている。そして、PGI₂は、生理的なTXA₂拮抗PGとして働くことが、血小板、血管平滑筋細胞など多くの標的細胞で知られているが、PGI₂系が重要な役割をもつEPCにおいてTXA₂系がどのような役割を持つのか不明である。

我々は準備実験において、①糖尿病マウスで認められるEPC機能低下は、PGI₂/IP系の賦活化により、ほとんど正常EPCレベルまで機能改善を示すことから、心血管系リスク疾患における異常EPCの改善にむけて、PGI₂系調節の重要性が考えられた。また、②骨髄細胞群の中でEPCは、IPに加えてTXA₂の特異的受容体(TP)が発現している細胞であり、精製EPC導入による血管リモデリング抑制効果は、野生型EPCにくらべ、TP欠損EPCのほうが、高い傾向にあることを見出した。以上のことから、われわれは、『EPCの機能維持にPGI₂系と共にTXA₂系が重要な役割をもつ』のという仮説をたて、その検証実

験を展開していく。

2. 研究の目的

仮説 EPC機能は、PGI₂/IP系に加えてTXA₂/TP系シグナルによって調節をうけ、障害血管リモデリングや臓器虚血血管新生などの病態に重要な役割をもつ。この仮説を実証するため以下の目的を掲げた。

目的1 ; EPC細胞機能におよぼすPGI₂/IP及びTXA₂/TP系の作用解明

目的2 ; EPCのPGI₂/IP及びTXA₂/TP系の心血管疾患病態における役割解明

目的3 ; 同PG系調節によるEPC機能改善と糖尿病下での病態改善効果の証明

3. 研究の方法

目的1 ; EPC細胞機能におよぼすPGI₂/IP及びTXA₂/TP系の作用解明 ; 我々は、EPC内にIPに加え、TPが発現していることを確認し、EPCがPGI₂およびTXA₂の標的細胞であることが示唆された。ここでは、単離したEPCの細胞機能に関して、PGI₂-IP系およびTXA₂-TP系シグナルの役割について解明していく。

実験方法 :

EPC分離および培養法 ; EPCの分離は、細胞表面マーカーを指標に、単核球分離後、Lin(-) /cKit1(+)/Sca1(+)細胞をMACS法により精製培養した。培養液に添加するIPおよびTP agonist/antagonistとして、それぞれ beraprost, ON054918/CAY10449 および U46619 /SQ29548 を利用する。野生型マウスおよび各PG受容体欠損マウスよりEPCを調整した。

EPC内PGI₂, TXA₂シグナル系の調節 ; EPC内のPGI₂, TXA₂産生酵素であるPGIS(あるいはTXS)の発現増強および抑制のため、同酵素遺伝子あるいはshRNA組み換えレトロウイ

ルスを作成、感染させた。

EPCによるPGI₂およびTXA₂産生能； EPCにはCOX1/2およびPGISが発現し、PGI₂が産生することを確認しているが、EPC内のTXA₂産生能があるのか、あればその関与する酵素群(TXS)発現に関して確認すると共に、各種IP、TP agonist antagonistによるPGI₂、TXA₂産生系酵素群の発現をRT-PCR法により、各PGs産生をELISA法で測定。

EPC増殖能および分化能評価； EPCの増殖能は、すでに確立している細胞コロニー形成法、およびMTT法で評価し、内皮細胞(あるいは平滑筋やその他の種類への細胞)への分化度は、各種増殖因子添加した分化誘導用培地で長期培養(1~2週間)後、各種分化マーカー(内皮細胞；vWF、CD31、eNOS、平滑筋細胞；alpha-smooth muscle actin、Calponin、Macrophage；F4/80、CD45R)を免疫染色することにより評価した。

EPC内発現遺伝子パターンの解析； EPCの機能に重要である遺伝子群の発現について、RT-PCR法により測定した。1) VEGF、EGFなどEPCの分化、増殖に関与するといわれているangiogenic factorsの遺伝子群。2) CycなどEPCの増殖、遊走能などに関与する遺伝子群。3) 内皮細胞などで様々な重要な機能(その分化度を含め)が明らかにされている遺伝子群(vWf、CD31、eNOS、PAIなど)

目的2； EPCのPGI₂/IP及びTXA₂/TP系の心血管疾患病態における役割解明 EPCの産生臓器である骨髄細胞に選択的にIPあるいはTP欠損させた骨髄移植マウスを準備し、本マウスを用いた下肢虚血あるいは血管損傷モデルで各病態における骨髄IP、TPの役割を明らかにした。さらに、骨髄IP、TPの中でもEPCの寄与についての確認を、単離したwild EPC、IP-KO EPC、TP-KO EPCの導入実験で行った。

実験方法：

マウス骨髄移植モデル； 致死量放射線照射させたwildマウスに、各種マウス(wild、IP-KO、TP-KO)の骨髄細胞を移植したマウスを作成する。本方法により、95%以上の骨髄細胞を置換することを確認した。

血管内皮損傷-血管リモデリングモデル； マウス大腿動脈内腔をwireにより障害させ、新生内膜肥厚(血管リモデリング)進行が止まる術後3-4週目に、血管を摘出し、組織学的にリモデリングを評価した。

下肢虚血-血管新生モデル； マウス大腿動脈を結さつし、その後の下肢血流改善度を血流ドップラー法で経時的に測定。虚血骨格筋内の損傷程度、新生血管度などは、組織学および免疫組織学的解析で行った。

EPC導入法； 目的1で示した方法で単離精製したEPCを、経尾静脈注(血管リモデリングの場合)、経筋肉注(下肢虚血の場合)による投与した。導入したEPCの生体内局在のために、GFP発現マウス(GFP-transgenic miceとTPおよびIP-KOマウスとのcross-bleeding miceは作成、自家繁殖している)を用いた。

目的3； 同PG系調節によるEPC機能改善と糖尿病下での病態改善効果の証明 DMマウスより精製したEPC機能低下が、PG系試薬でどのように改善、変化するかを目的1で述べた細胞機能解析、機能関連遺伝子発現動態などで解析した。また、DMマウスにおける各疾患モデル(目的2参照)において、単離調整したEPC導入法の効果を評価した。

実験方法：

糖尿病マウスモデル； 6-8週齢マウスにストレプトゾトシンを投与し、1週後に高血糖が確認されたマウスを選定、明らかなEPC機能低下を確認できる8週後に実験に利用した。

EPC 機能調節法； 各種 IP, TP agonist あるいは antagonist の利用、各種遺伝子誘導・Knock down 用レトロウイルスの利用（目的 1 参照）により、DM 由来 EPC の細胞機能（目的 1 参照）および病態での役割（目的 2 参照）を解明した。

(1) PG 受容体欠損骨髄移植モデルでは、EPC 以外の細胞（血小板など）で PG 欠損の影響がでる。同骨髄移植モデルでの検討の場合、必ず wild あるいはそれぞれの PG 受容体欠損 EPC 導入実験をあわせて行い、骨髄細胞のなかで EPC の寄与について確認した。

(2) IP や TP 以外の PG 系が EPC 機能に関与する可能性 EPC が、PGI₂ や TXA₂ 以外の PG 系により影響を受ける可能性は十分ある。同申請研究に平行して、他の PG（例えば PGE₂ 受容体（EP1-4））の EPC 内での発現を確認した後、同受容体欠損マウス（連携研究者（結城）薬理学講座より供与）由来の EPC 機能解析を行ってみた。

4. 研究成果

骨髄由来内皮前駆細胞（EPC）における血管ホメオスタシスに関するプロスタノイド PG である PGI₂ および TXA₂ の役割を解明した。EPC には、PG の特異的受容体を発現しており、PG それぞれの特異的受容体欠損マウスおよび、同マウス由来 EPC を用いて、血管リモデリングモデルおよび下肢虚血モデルを用いて、これらの PG によって、EPC 機能が厳密に制御されていることを明らかにした。

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 Prostacyclin stimulated integrin-dependent angiogenic effects of endothelial progenitor cells and mediated potent circulation

recovery in ischemic hind limb model.

Aburakawa Y, Kawabe J, Okada M, Yamauchi A, Asanome A, Kabara M, Matsuki M, Takehara N, Nakagawa N, Okumura S, Minami Y, Mizukami Y, Yuhki K, Ushikubi F, Hasebe N. Circ J 77(4), 1053-1062, 2013

- ② Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies. Yuhki K, Kojima F, Kashiwagi H, Kawabe J, Fujino T, Narumiya S and Ushikubi F. Pharmacol Therap. 129, 195-205, 2011
- ③ Prostaglandin I₂ promotes recruitment of endothelial progenitor cells and limits vascular remodeling. Kawabe J, Yuhki KI, Okada M, Kanno T, Yamauchi A, Tashiro N, Sasaki T, Okumura S, Nakagawa N, Aburakawa Y, Takehara N, Fujino T, Hasebe N, Narumiya S, Ushikubi F. Atheroscler. Thromb Vasc Biol 30, 464-470, 2010

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① Administration of Beraprost inhibited metastasis in lung cancer Y Minami, T Sasaki, S Endo, K Shibukawa, J Kawabe, M Kitada, Y Ohsaki AACR (アメリカ癌学会) 米国 (San Francisco) 2013
- ② Prostacyclin signal in endothelial progenitor cells is crucial for tumor neoangiogenesis and its growth S Okumura, J Kawabe, T Sasaki, Y Minami, N Hasebe, Y Ohsaki) ISHR (国際心臓研究会) 日本 (京都) 2010
- ③ Prostacyclin signal in endothelial progenitor cells is crucial for tumor neoangiogenesis and its growth S Okumura, J Kawabe, T Sasaki, Y

Minami, N Hasebe, Y Ohsaki) ISHR (国際心臓研究会) 日本 (京都) 2010

[図書] (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 基 (OKADA MOTOI)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：80431427

(2) 研究分担者

川辺 淳一 (KAWABE JUNICHI)
旭川医科大学・医学部・特任准教授
研究者番号：10400087

(3) 連携研究者

結城 幸一 (YUHKI KOUITI)
旭川医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80302420