

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461091

研究課題名(和文) 血管内皮前駆細胞の増幅・分化ニッチを構築する血液細胞の同定とその分子機構の解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism of blood cell-cell interaction forming niche inducing CD34+ cell expansion and differentiation to endothelial progenitor cells in vascular regeneration

研究代表者

増田 治史 (MASUDA, Haruchika)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：50278496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト末梢血のCD34+血管幹細胞の血管内皮前駆細胞への分化・増幅においてCD34-細胞との直接的細胞間クロストークが重要であること、さらに、CD34-細胞分画中の単球(CD14+細胞)及びTリンパ球(CD3+細胞)の当該事象における役割について、CD3+細胞よりもCD14+細胞に発現するNotchリガンド及びCD34+細胞に発現するNotchリセプターの細胞間クロストークが重要であることを突き止めた。この結果は、単球とCD34+血管幹細胞のNotchリセプター・リガンド系による血管再生機能を担うニッチの形成という新規な血管生物学的分子機構を世界で初めて解明したことになる。

研究成果の概要(英文)：We investigated blood cell-cell interactions to promote the expansion and differentiation of endothelial progenitor cells (EPCs) derived from CD34+ cells using the novel culture system developed by our laboratory. Peripheral blood mononuclear cells are divided into CD34+ stem cells, and CD34- cells of T lymphocytes (CD3+ cells), and monocytes (CD14+ cells). We found the promoting effect of CD34- cell populations on vascular regeneration capability of CD34+ cells via expansion and differentiation to endothelial progenitor cells (EPCs). Further, CD14+ cells turned out to be a key cell population responsible for the effect through a direct cell-cell interaction of Notch ligand/receptor system, Delta like -1 expressed on CD14+ cells to Notch receptor-1, or 2 on CD34+ cells, but not CD3+ cells. The results indicate that CD34+ cells together with CD14+ cells form the functional 'niche' playing a critical role in vascular regeneration, providing a novel information in vascular biology.

研究分野：血管再生

キーワード：血管内皮前駆細胞 CD34 Notchシステム 血管再生 単球 血液細胞間ニッチ

1. 研究開始当初の背景

ヒト末梢血単核球 (Peripheral Blood Mononuclear Cell = PBMC) に含まれる CD34+ 幹細胞由来血管内皮前駆細胞 (Endothelial Progenitor Cell = EPC) について、虚血性疾患の病態診断や EPC 移植血管再生治療の有効性評価における EPC の数と機能評価の有用性が判明している。我々は、EPC の増幅・分化度評価法 (EPC-コロニー形成アッセイ = EPC-CFA) 及びヒト CD34+ 幹細胞を用いた EPC 増幅 (Quantity)・分化 (Quality) 培養法 (QQ 培養) による血管再生機能増強培養法を開発した。また、ヒト PBMC の QQ 培養においても血管再生機能が増強され、さらに、PBMC の CD34+ 幹細胞単独と CD34- 単核球との再構築細胞の QQ 培養を実施したところ、CD34+ 細胞の EPC 増幅・分化能が増強されることを発見した。今まで、我々は、骨髄中 EPC 増幅・分化機能性ニッチとして、骨髄微小環境における Jagged-1 (JAG1) の関与をマウスにおいて報告した。前述の知見は、骨髄微小環境のみならず、血液系細胞の CD34+ 幹細胞と CD34- 単核球においても、EPC の増幅・分化を司る何らかの細胞間ニッチが存在することが想定された。

2. 研究の目的

今回の研究では、QQ 培養系を用いて、ヒト末梢血 EPC の未分化 CD34+ 幹細胞における「EPC 増幅・分化の分子機序」について、CD34+ 幹細胞及び CD34- PBMC (単球及び特に T リンパ球) の血液系細胞間の「EPC 増幅・分化の分子機序」に関わる血管再生機能性ニッチを探索することを目的とした。

3. 研究の方法

臨床研究委員会の承認を得て実施した (13R-228 号)。健康人からインフォームドコンセントを得て、末梢血 10~50mL から PBMC を単離した。磁気ビーズ法を用いて CD34+ 細胞、CD14+ 細胞、CD3+ 細胞を実験に応じて単離した。トランスウエルメンブラン、6well Primria plate を用いて、CD34+ 幹細胞と各 CD34- 単核球分画の直接的または間接的 QQ 共培養を行った。QQ 培養は、サイトカイン (SCF; 100ng/mL、TPO; 20ng/mL、flt3 ligand; 100ng/mL、VEGF; 50ng/mL、IL-6; 20ng/mL) 添加した StemLineII 造血幹細胞増幅培地を用いた。培養細胞の Notch ligand、CD34+ 細胞の Notch receptor の発現を flow cytometry にて実施した。QQ 培養細胞の EPC-コロニーアッセイを行い、EPC の増幅・分化能を評価した。

4. 研究成果

(1) ヒト PBMC の QQ 培養中では EPC は増幅・分化が促進する (図 1)。

PBMC (2×10^6 /well) の QQ 培養において、培養後、QQ 細胞 (2×10^5 /dish) の総 EPC コロニー産生数は漸増し、特に、3 日目以降、分化型コ

ロニーの増加が顕著になり、それとともに、総 EPC コロニー産生数も漸増した。未分化型コロニー産生数は、培養開始後、漸増し 5 日後で最高になった。

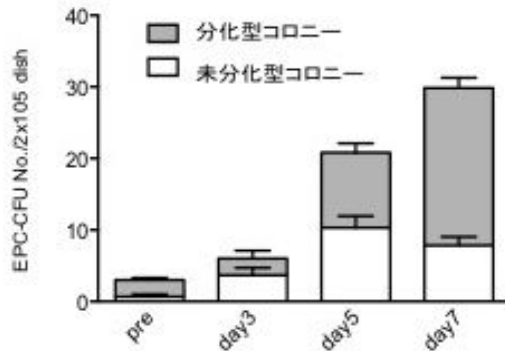


図1: PBMC中のQQ培養期間におけるEPCコロニー産生能の推移。PBMC (2×10^6 /well) にて7日間QQ培養)。

(2) CD34- PBMC は、直接的な細胞間接触により CD34+ 幹細胞の EPC 増幅・分化が促進する (図 2)。

QQ 培養細胞について、EPC コロニー産生能は CD34- PBMC ではなく、CD34+ 幹細胞に存在していた。また、トランスウエルを挟んだ CD34- PBMC (2×10^6 /well) 及び CD34+ 幹細胞 (4×10^3 /well) の QQ 培養を実施した結果、この CD34+ 幹細胞は EPC コロニーを産生しなかった。一方、各細胞を同一細胞数ずつ再構築 (混合) した後、QQ 培養を実施したところ、PBMC の QQ 培養細胞と同様に、EPC コロニー産生が著増した。この結果は、(1) CD34- PBMC が CD34+ 幹細胞の EPC 増幅・分化能を促進させること、(2) この現象は、CD34+ 幹細胞と CD34- PBMC の責任分子機構として、液性因子によるものではなく、直接的細胞間分子情報伝達機構によることが判明した。

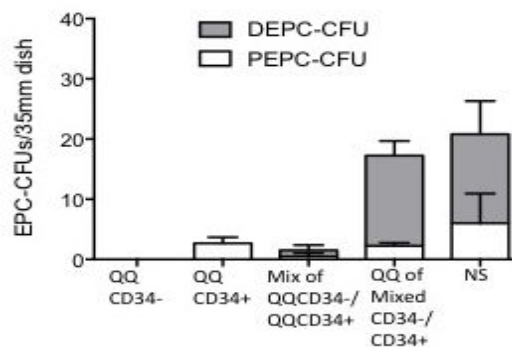


図2: PBMC中のCD34+細胞、CD34+細胞除去MNCのQQ細胞、QQ前後の再構築細胞におけるEPCコロニー産生能の比較。QQCD34-; CD34+細胞除去MNCのQQ細胞 (2×10^6 をQQ培養)、QQCD34+; CD34+細胞のQQ細胞 (4×10^3 をQQ培養)、Mix of QQCD34-/QQCD34+; CD34+細胞とCD34+細胞除去MNCの各QQ細胞の再混合細胞 (4×10^3 と 2×10^6 を各QQ培養後、再構築)、QQ of Mixed CD34-/CD34+; CD34+細胞とCD34+細胞除去MNCの再混合細胞のQQ細胞 (4×10^3 と 2×10^6 ずつ混合しQQ培養)。EPC-CFAIについて、各細胞につきQQ培養前細胞数の1/10個のQQ細胞を播種した。

(3) QQ 培養系では、単球系細胞(CD14+細胞)が CD34+幹細胞の EPC 増幅・分化能を促進する(図3)

CD34+幹細胞(4×10^3 個)と単球(CD14+細胞; 2×10^6 個)または T リンパ球(CD3+細胞; 2×10^6 個)を混合後、QQ 培養を行い QQ 培養細胞(1×10^5 /dish)の EPC コロニー産生は、CD3+細胞ではなく、CD14+細胞との直接的 QQ 培養により促進された。

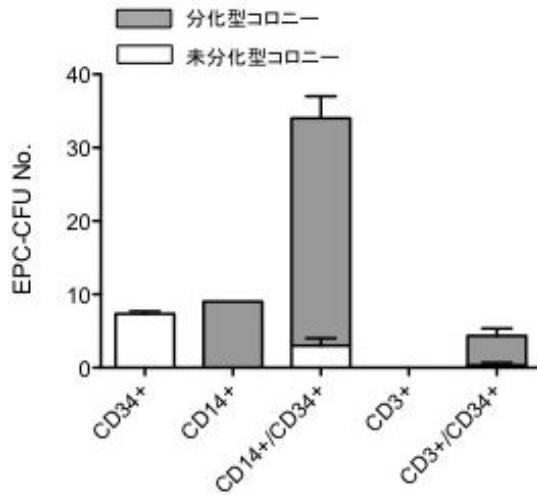


図3:各細胞分画の単独及び共培養によるQQ細胞のEPCコロニー産生能。

(4) QQ 培養系においては、細胞間の Notch シグナルが重要である(図4)

PBMNC の QQ 培養系における Notch シグナル抑制を目的として、セクレターゼ抑制剤(15 μ M)を添加した PBMNC の QQ 培養を行った。EPC コロニー産生能が抑制されたことから、CD34-PBMNC と CD34+幹細胞との EPC 産生におけるクロストークにおいては、Notch シグナルが重要であることが判明した。また、CD34+幹細胞においては、Notch-1 receptor 及び Notch-2 receptor の発現が 29.4%、27.1%認められた。

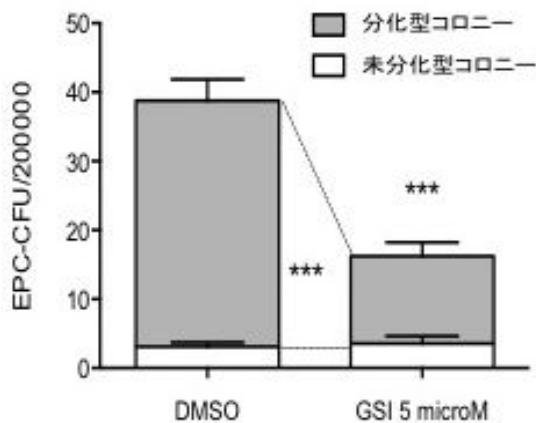


図4:QQ 培養におけるEPCの増幅・分化におけるNotchシグナルの影響。Notchシグナル抑制剤の γ セクレターゼインヒビター(GSI; 5 μ M)添加条件下におけるQQ培養細胞のEPCコロニー産生能。DMSO= 対照群。***P< 0.001

(5) QQ 培養系では、単球系細胞(CD11b+細胞)において DLL 1 が一時的に発現が亢進する(図5)

Flow cytometry による QQ 培養期間中の単球系細胞(CD11b+細胞)において Notch ligand の発現を検討した。JAG1 及び DLL4 については培養期間を通じて発現する単球系細胞は希少であったが、DLL1 を発現する単球系細胞は、培養3日目において、単球系細胞中 35%と一時的に著増した。この結果は、QQ 培養系の EPC 増幅・分化の責任細胞である単球系細胞における機能性分子として DLL1 の一時的発現が重要であることが示唆された。

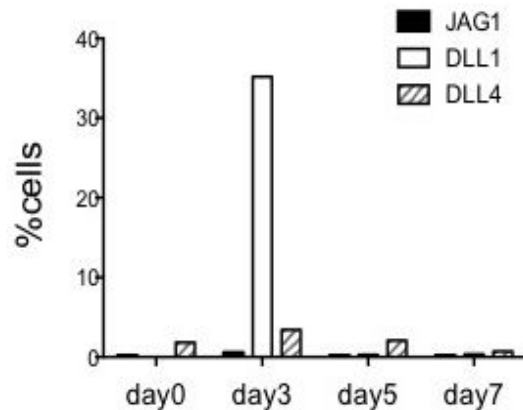


図5:QQ 培養期間中のNotch ligand発現単球・マクロファージ含有率の変遷。

(6) DLL1 は QQ 培養系における EPC 増幅・分化の機能性分子である(図6、7)

単球系細胞(CD14+細胞)の DLL1 の機能を検討するために、単離した CD34+幹細胞(1×10^4)及び shRNA レンチウイルスによるトランスフェクションによる DLL1 の発現を抑制した CD14+細胞(1×10^6)を直接的 QQ 培養を実施した。培養後 QQ 細胞 (2.5×10^4) からの総 EPC コロニー産生数(図6)及び分化度(図7)は、対照群に比較して、約 1/2 に減少し、EPC の増幅・分化は抑制された。この結果は、DLL1 が CD14+細胞の CD34+幹細胞の EPC 増幅・分化促進因子であることが判明した。

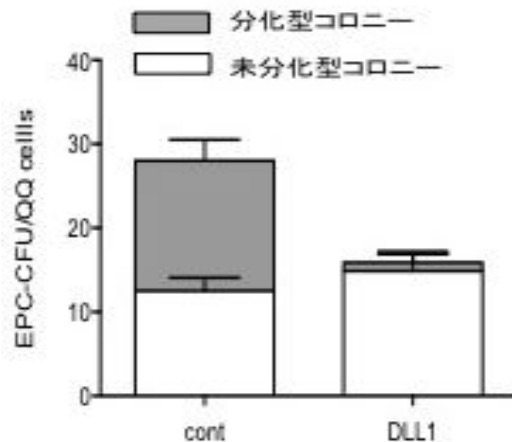


図6:QQ 培養におけるEPCの増幅におけるDLL1の影響。

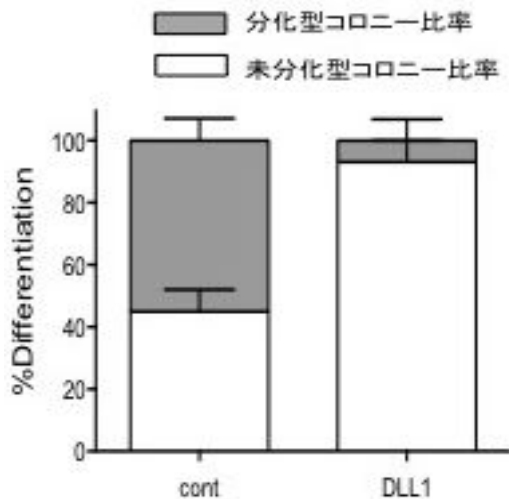


図7: QQ 培養におけるEPCの分化におけるDLL1の影響。

(7) 考察及び今後の展望

ヒト末梢血の CD34+血管幹細胞の EPC への増幅・分化において CD34-細胞との直接的細胞間クロストークが重要であること、さらに、CD34-細胞分画中の単球及び T リンパ球の当該事象における役割について、CD3+細胞よりも CD14+細胞に発現する Notch リガンド及び CD34+細胞に発現する Notch リセプターの細胞間クロストークが重要であることを突き止めた。この結果は、単球と CD34+血管幹細胞の Notch リセプター・リガンド系による血管再生機能を担当する細胞間ニッチの形成という新規な血管生物学的分子機構を世界で初めて解明したことになる。この分子機構は、各種病態における末梢血単核球の血管再生能の診断学的評価系を開発する上で、また、末梢血単核球の QQ 培養細胞移植による、より治療効果の高い血管再生療法を開発する上で、それらの分子機構の観点から重要な知見を与えると考えられる。

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9件)

Takizawa S, Masuda H, Asahara T et al. Progress in Endothelial Progenitor Cell Culture System: Potential for Stroke Therapy. *Neurol Med Chir.* 2016; 56, 97-101.

doi.org/10.2176/nmc.ra.2016-0027 (査読有り)

増田治史. 抗炎症・血管・組織再生性細胞群としての培養末梢血単核球の再生医療応用. *日本血栓止血学会雑誌.* 2014, 25; 593-602.

doi.org/10.2491/jjsth.25.593 (査読有り)

Obi S, Masuda H, Asahara T et al. Dextran Induces Differentiation of Circulating Endothelial Progenitor

Cells. *Physiol Rep.*, 2014, 2; e00261. doi:10.1002/phy2.261 (査読有り)

Masuda H, Tanaka R, Asahata T et al. Vasculogenic Conditioning of Peripheral Blood Mononuclear Cells Promotes Endothelial Progenitor Cell Expansion and Phenotypic Transition of Anti-inflammatory Macrophage and T lymphocyte to Cells with Regenerative Potential. *J of AHA*, 2014, 3; e000743. doi:10.1161/JAHA.113.000743 (査読有り)

Tanaka R, Masuda H, Asahara T, Miyasaka M. Autologous G-CSF-mobilized Peripheral Blood CD34+ cell Therapy for Diabetic Patients with Chronic Nonhealing Ulcer. *Cell Transplantation.* 2014, 23; 167-179.

doi:10.3727/096368912X658007 (査読有り)

Kamei N, Masuda H, Asahara T et al. Ex-vivo Expanded Human Blood-Derived CD133+ cells Promote Repair of Injured Spinal Cord. *J of the Neurological Sciences.* 2013, 328; 41-50. doi: 10.1016/j.jns.2013.02.013 (査読有り)

Tanaka R, Masuda H, Asahara T et al. Quality Control Culture System Rescues Diabetic Endothelial Progenitor Cell Vasculogenesis and Accelerates Wound Closure. *Diabetes.* 2013, 62; 3207-3217. doi:10.2337/db12-1621 (査読有り)

Tsukada S, Masuda H, Asahata T et al. Identification of Mouse Colony Forming Endothelial Progenitor Cells for Postnatal Neovascularization: a novel insight highlighted by new mouse colony forming assay. *Stem Cell Research & Therapy.* 2013, 4; 20. doi:10.1186/scrt168 (査読有り)

Masuda H, Asahara T. Clonogenic Assay of Endothelial Progenitor Cells. *Trends in Cardiovascular Medicine.* 2013, 23; 99-103. doi:10.1016/j.tcm.2012.09.007 (査読有り)

[学会発表](計5件)

増田治史(発表者). Establishment of Serum-Free Culture System of Peripheral Blood Mononuclear Cells to Potentiate Vascular Regeneration. 第11回国際幹細胞研究学会(ISSCR)、2014/6/12-6/15、ボストンコンベンションセンター(米国)(ポスター)

増田治史(発表者). Vasulogenic Conditioning of Peripheral Blood Mononuclear Cells Coordinates Tissue Regeneration Associating Cells. 第18回国際血管生物学会、2014/4/14-4/17、

京都みやこメッセ(京都)(ポスター)
増田治史(発表者). Vasulogenic
Conditioning of Peripheral Blood
Mononuclear Cells Corordinates
Regenerative Potential via Expanding
Endothelial Progentior Cells,
Anti-inflammatory Macrophages and
T-lymphocytes. 第78回日本循環器学会、
2014/3/21-3/23、東京国際フォーラム
(東京)(口演)
増田治史(発表者). Vasculogenic
Culture of Blood Mononuclear Cell
Enhances Regenerative and
Anti-inflammatory Potential. 第13回
日本再生医療学会、2014/3/4-3/6、京都
国際会議場(京都)(口演)
増田治史(発表者). 「血管内皮前駆細胞
と血管再生、組織再生」、第14回
pharmaco-Hematology シンポジウム、
2013/6/1、長井記念ホール(東京)(口
演)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：血管内皮前駆細胞を含む細胞群の生体
外増幅法

発明者：増田治史、田中里佳、浅原孝之

権利者：同上

種類：方法の発明

番号：

(国内)特願第2012-218206号

出願年月日：2013/9/28

(国外)PCT/JP2013/76618号

出願年月日：2013/9/30

国内外の別：国内及び国外

取得状況(計0件)

特記なし

〔その他〕

ホームページ等

特記なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

増田 治史(MASUDA Haruchika)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：50278496

(2)研究分担者

特記なし

(3)連携研究者

浅原 孝之(ASAHARA Takayuki)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：20246200