

血管再生の分子機構と喫煙の影響に関する研究

中尾 一和*、伊藤 裕*

はじめに

我々はこれまで、従来血液を通すパイプとしてのみとらえられていた血管が、血流状態を感じし種々の生理活性物質を産生分泌し、そのオートクリン/パラクリン作用により、急性期には血管トーンスを、慢性期にはその構造を変化させ（血管のリモデリング）、循環動態のホメオスターシスの維持に関与することを明らかにしてきた¹⁾。一方我々は、無限の増殖性とほとんどすべての細胞に分化できる多能性を有する胚幹細胞 embryonic stem (ES) cells より血管を構成する内皮細胞 (EC) と血管平滑筋細胞 (VSMC) の双方に分化し得る「血管前駆細胞 vascular progenitor cells (VPC)」を新しく単離同定した²⁻⁴⁾。血管再生は、喫煙及び高血圧症等の生活習慣病によりもたらされる動脈硬化症疾患において、根治的な治療法につながると考えられる。これまでの研究によれば、喫煙刺激による潰瘍形成モデルなどにおいて血流改善や治療の遅延が見られるとの報告もある。

目 的

そこで我々は、VPC による *in vitro*、*in vivo* での血管発生分化モデルシステムを用いて、血管再生のメカニズムを局所内分泌学的、発生細胞学的に解析することで、喫煙の血管再生への影響を分子細胞レベルで明らかにし、その成果を喫煙による血管障害の抑制、更には、血管再生促進治療へ応用することを目的として研究をすすめている。

我々は昨年までの本財団研究助成により以下

の研究成果を得てきた。マウス ES 細胞より、vascular endothelial growth factor (VEGF) 受容体である Flk1 陽性細胞を FACS にてソーティングし、コラーゲン IV コートディッシュ上で VEGF 及び PDGF-BB 添加にて培養すると、Flk1 陽性細胞は、それぞれ内皮細胞 (VE カドヘリン、PECAM-1 陽性) 及び壁細胞 [ペリサイトあるいは血管平滑筋細胞; α 平滑筋アクチン (α SMA) 陽性、平滑筋ミオシン重鎖陽性、カルポニン陽性、SM22 α 陽性] に分化することが明らかとなった。更に、Flk1 陽性細胞を I 型コラーゲンゲル内で 3 次元培養することにより、血管構築が再構成され、ES 細胞由来 Flk1 陽性細胞が VPC であることが示された。最近、循環血中に内皮細胞の前駆細胞 endothelial precursor cells (EPC) が存在し、この EPC が成体においても血管新生の場に生着し内皮細胞に分化することにより、血管が創り出されるということが明らかになり、更に、喫煙者では循環血中の EPC が減少している事も報告されている。

そこで本研究課題においては、我々の見出した ES 細胞由来 VPC を用いた、喫煙による血管再生障害モデルにおいて、その分子機構を明らかにし、更に、VPC 並びに我々がこれまで一貫して研究を続けてきた血管ホルモンを用いた血管再生障害に対する新たな治療法の開発を目指した。

方法および結果

1) 血管ホルモン、アドレノメジュリンの内皮再生作用の検討

我々は心臓血管ホルモンであるナトリウム利尿ペプチドが cGMP/プロテインキナーゼ G カス

* 京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科

ケードを活性化して血管再生作用を発現することを報告した⁵⁾⁻⁸⁾。一方、アドレノメジュリン (AM) は内皮細胞からも産生され、cAMP/プロテインキナーゼ A (PKA) カスケードを活性化し、内皮由来血管拡張ペプチドとして作用する。そこで我々は AM の血管保護再生作用について検討した。

損傷内皮再生過程の *in vitro* モデルである wound healing assay にて AM の内皮再生作用を検討した。AM 10^{-11} M から 10^{-8} M の添加にて損傷内皮再生は用量依存的かつ有意に刺激された。培養内皮細胞において、AM 10^{-8} M 刺激により Akt リン酸化は 30 分をピークに亢進した。更に、内皮細胞損傷により Akt リン酸化が亢進し、AM を添加するとリン酸化がより亢進した。AM/PKA/Akt カスケードのインヒビターとして、AM 受容体拮抗剤の AM (22-52) 及び CGRP (8-37)、PKA 阻害剤の Rp-cAMP 及び細胞膜透過型の PKA inhibitor peptide、PI3 キナーゼ阻害剤である LY294002 及び wortmannin の計 6 種を用いた。これら 6 種のインヒビターはいずれも AM による内皮細胞における Akt 活性化を抑制し、更には wound healing assay での内皮再生促進作用も抑制した⁹⁾。

2) たばこ主流煙抽出物による損傷内皮再生抑制とアドレノメジュリンによる回復

Wound healing assay において、メEDIUM にたばこ主流煙水溶液抽出物 cigarette smoke extract (CSE) を添加して、CSE が内皮再生に及ぼす影響を検討した。10 万倍希釈 CSE をメEDIUM に添加すると、内皮再生はコントロールと比較して $81.7 \pm 2.9\%$ となった。一方、メEDIUM に 10 万倍希釈 CSE と AM 10^{-8} M を同時添加すると、内皮再生はコントロールと比較して $124.9 \pm 2.8\%$ となり、内皮再生が有意に促進した。

3) ヒト ES 細胞からの VPC の同定

未分化ヒト ES 細胞はマウス ES 細胞とは異なり、未分化段階において既に Flk1 (VEGFR2) が

発現していた。しかしこの段階では、未分化マーカーである TRA-1 陽性であった。しかし、マウス頭蓋冠由来線維芽細胞 OP-9 との共培養により TRA-1 陰性分画が出現した。この TRA-1 陰性 Flk1 陽性細胞は、PDGFR 陽性 VE カドヘリン陰性であり、この分画をソートし、VEGF および血清刺激下で培養を続けると、VE カドヘリン陽性、PECAM-1 陽性の内皮細胞および α SMA 陽性の壁細胞が分化し、この細胞分画がヒトにおける VPC であることが示された。

4) たばこ主流煙抽出物およびアドレノメジュリンの ES 細胞由来血管前駆細胞の内皮細胞分化に対する効果の検討

未分化マウス ES 細胞を LIF 非存在下に 4 型コラーゲン上で 4 日間培養すると、Flk1 陽性細胞が全体の約 30-40% に誘導されてくる。これらの細胞を FACS を用いて 95% 以上の高い純度でソートし、4 型コラーゲン上で再び培養をおこなった。FCS のみで Flk1 陽性 VPC を培養した場合には、 α SMA 陽性壁細胞が 95% 以上を占め、PECAM-1 陽性の内皮細胞はほとんど出現しなかった。FCS に VEGF を投与すると、PECAM-1 あるいは VE カドヘリンが陽性の内皮細胞が全体の約 30% に誘導された。AM (10^{-9} - 10^{-6} M) は、VEGF との併用において、PECAM-1 陽性内皮細胞誘導作用を認めた。この AM による ES 細胞由来 VPC からの内皮細胞分化促進作用は、今回同定したヒト ES 細胞由来 VPC (TRA-1 陰性 Flk1 陽性) を用いても同様に認められた。すなわち 10^{-7} - 10^{-6} M AM は VEGF 100 ng/ml 存在下でのヒト ES 細胞由来 VPC の内皮細胞への分化を用量依存性に促進した。一方、CSE (1-10 万倍希釈) は、ES 細胞由来 VPC の増殖および内皮細胞への分化を有意に抑制した。

5) アドレノメジュリントランスジェニックマウスを用いた *in vivo* における血管再生作用の検討

AM 遺伝子は AM のみならず別の血管拡張性ペプチド PAMP も産生する。AM を単独で過剰産生

するマウスを作成する目的で、AM遺伝子の PAMP コード領域 3' 端アミド化シグナルのグアニンをシトシンに塩基置換することで、PAMP 生理活性発現に必須であるアミド化を阻害した変異型 AM 遺伝子を作成し、SAP プロモーターと結合して、肝臓から AM のみを単独で過剰産生するトランスジェニック (AM-Tg) マウスを開発した。そのマウスにおいて中大脳動脈 20 分閉塞脳梗塞モデル (20m-MCAO) を作成し、AM の生体における血管再生作用および神経保護再生作用を検討した¹⁰⁾。

得られた AM-Tg マウスのアミド化 AM 濃度は 24.9 ± 4.2 fmol/ml まで上昇し、ヒトで治療効果を認めた濃度に匹敵した。20m-MCAO における梗塞域とグリオーシスは AM-Tg において有意に減少し、また虚血基底核におけるアポトーシスと白血球浸潤が有意に低下していた。更には、再生ニューロン (BrdU/NeuN 二重陽性細胞) も AM-Tg で有意に増加し、ロータロッドで評価した運動機能の有意な改善を認めた。

6) アドレノメジュリンを用いたアドレノメジュリンのヒト ES 細胞由来血管前駆細胞移植による血管再生の増強作用の検討

12 週齢の AM-Tg を用い、我々が既に報告した大腿動脈結紮下肢虚血モデル⁸⁾を作成した。大腿動脈結紮直前に生食 (PBS) 100 μ l に溶解したヒト ES 細胞由来細胞を 5×10^5 個動脈内投与した。ヒト ES 細胞由来血管細胞の調製は以下のように行った。

ヒト ES 細胞株を OP9 ストローマ細胞上で 9 日間培養した。その結果、TRA-1 陰性 VEGFR2 陽性細胞が全体の 19.4% 出現した。この VPC 分画を FACS にてソートし、4 型コラーゲンコートデイスシュ上に播種し、VEGF 50 ng/ml、10% 血清下に 3 継代培養を続けた。このようにして得られた細胞は、PECAM-1 陽性内皮細胞および α SMA 陽性血管平滑筋細胞の 2 種類の細胞より構成されていた。この 2 種類の血管細胞の混合物を VPC 由来血管細胞 VPC-derived vascular cells (VPC-VC) とした。細胞群は以下の 6 群とした。

- 野生型マウス、生食投与群: WT+PBS
- AM-Tg、生食投与群: Tg+PBS
- 野生型マウス、VPC-VC 移植群: WT+VPC-VC
- AM-Tg、VPC-VC 移植群: Tg+VPC-VC
- 野生型マウス、VPC 移植群: WT+VPC
- AM-Tg、VPC 移植群: Tg+VPC

AM-Tg (Tg+PBS) は、野生型マウス (WT+PBS) に比べ術後 10 日目より有意の血流増加を認めた。VPC-VC 移植群の場合、野生型マウスおよび AM-Tg はほぼ同程度に、WT+PBS に比べ、有意に血流の増加を認め、Tg+PBS と比べ、高値の傾向を示した。一方、VPC を野生型マウスに移植しても、有意の血流増加は認められなかった。しかしながら、VPC を AM-Tg に移植した群では、6 群中最も高い血流量を示した。マウス内皮細胞数は、AM-Tg (Tg+PBS、Tg+VPC-VC、Tg+VPC) において、野生型マウスに比べ、有意に高値を示した。一方、VPC-VC 移植群において、ヒト内皮細胞は新生血管に認められた。VPC 移植群では、野生型マウスに比べ、AM-Tg において、より多くのヒト内皮細胞の生着を認めた。

考 察

我々はナトリウム利尿ペプチドの一つである CNP が内皮細胞から産生・分泌されることを明らかにし、CNP がペプチド性の内皮由来血管弛緩因子 (EDRF) として、血管トーンすや増殖の調節に関与するいわゆる「血管壁ナトリウム利尿ペプチド系」の存在を提唱した¹¹⁾¹²⁾。喫煙は活性酸素産生を亢進させることが知られているが、我々は更に酸化ストレスそのものである過酸化水素 (H_2O_2) が CNP、及び同じくヒト褐色細胞種より単離同定され血管弛緩に働く AM の分泌を亢進させ、一方、血管収縮ペプチドであるエンドセリン endothelin (ET) 分泌及び ET 産生に関与するエンドセリン変換酵素 endothelium converting enzyme (ECE)、更にアンジオテンシン変換酵素 angiotensin converting enzyme (ACE) 発現を抑制することを明らかにした¹³⁾¹⁵⁾。

喫煙刺激により内皮障害が起こり、NO 分泌が低下することで血管新生が障害されるが、我々はこれまで種々の遺伝子改変動物を用いて NO 合成酵素阻害による血管新生抑制モデルにおいて、ナトリウム利尿ペプチド/cGMP/cGMP 依存性プロテインキナーゼ (cGK) 系が血管再生促進作用を有し、その活性化により血管再生治療効果が認められることを明らかにした⁸⁾。本研究課題において我々は、血管拡張ホルモンである AM がナトリウム利尿ペプチド同様に障害内皮細胞の再生を cAMP/PKA 及び IP3キナーゼ/Akt 系を活性化することにより促進することを証明した。更に、AM は CSE による障害内皮細胞の再生抑制を有意に改善した。一方、AM はマウス、更に今回新たに同定したヒト ES 細胞由来 VPC の VEGF による内皮細胞分化誘導を著明に促進する作用を有することも明らかになった。更に、AM-Tg マウスを開発し、この動物を用い、AM が生体においても血管再生作用を発揮し、更に脳虚血時には神経保護再生作用を発現することを明らかにした。喫煙者は、非喫煙者に比較し、脳血管障害発症の頻度が高いことが報告されている。本研究により、AM が虚血脳において保護的効果を発揮し、更に血管再生作用および、神経細胞への直接作用と血管再生を介した間接的機序の両者による神経再生作用を発揮することで、虚血脳において血管、神経保護再生促進的に作用する可能性が示された。また、ヒト ES 細胞由来 VPC 移植による虚血肢における血管再生を AM は有意に促進することも明らかとなった。

以上の我々の成果により、喫煙による虚血時における血管再生の障害とその機序が明らかとなった。血管ホルモン AM は、この喫煙による血管再生障害に対して内因性の血管再生を促進し、あるいは ES 細胞由来 VPC 移植時には、その内皮細胞への分化を促進することで治療的効果を発現することが示された。現在、AM は国立循環器病センターにおいて、心不全および肺高血圧患者への投与が試験的に実施され、有効な臨床成績が得られている。我々が作成した AM-Tg マウスの血中 AM 濃度は、ヒトへの投与時に認められ

る血中濃度とほぼ同じであり、研究課題で観察された AM の血管・神経保護再生作用は、喫煙者の血管再生障害治療においても期待できると考えられる。更に、今後これまでの我々の知見を踏まえて、喫煙による血管再生障害に対する新しい治療法の開発を目指して、AM 遺伝子を導入した VPC を構築し、より有効な ES 細胞由来 VPC の生体への移植を目指している。

文 献

- 1) 伊藤 裕. 血管再生医療の現況とヒト ES 細胞の臨床応用. 日本医師会雑誌 2004; 132: 1142-5.
- 2) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M et al. Flk1 positive cells derived from embryonic stem cell serve as vascular progenitor. Nature 2000; 408: 92-6.
- 3) Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Yamashita J et al. Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage. Blood 2003; 101: 2675-8.
- 4) Sone M, Itoh H, Yamashita J et al. Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells. Circulation 2003; 107: 2085-8.
- 5) Doi K, Ikeda T, Itoh H et al. C-type natriuretic peptide induces redifferentiation of vascular smooth muscle cells with accelerated reendothelialization. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21: 930-6.
- 6) Ohno N, Itoh H, Ikeda T et al. Accelerated reendothelialization with suppressed thrombogenic property and neointimal hyperplasia of rabbit jugular vein grafts by adenovirus-mediated gene transfer of C-type natriuretic peptide. Circulation 2002; 105: 1623-6.
- 7) Kook H, Itoh H, Choi B-S et al. Physiological concentration of atrial natriuretic peptide induces endothelial regeneration *in vitro*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 284: H1388-97.
- 8) Yamahara K, Itoh H, Chun T-H et al. Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 3404-9.
- 9) Miyashita K, Itoh H, Sawada N et al. Adrenomedullin provokes endothelial Akt

activation and promotes vascular regeneration both *in vitro* and *in vivo*. FEBS Lett. 2003; 544: 86-92.

- 10) Miyashita K, Itoh H, Arai H et al. The neuroprotective and vasculo-neuro-regenerative roles of adrenomedullin in ischemic brain and its therapeutic potential. Endocrinology 2006; 147: 1642-53.
- 11) Suga S, Nakao K, Itoh H et al. Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor- β . Possible existence of "vascular natriuretic peptide system". J Clin Invest 1992; 90: 1145-9.
- 12) Komatsu Y, Nakao K, Itoh H et al. Vascular natriuretic peptide. Lancet 1992; 340: 622.
- 13) Saito T, Itoh H, Chun T-H et al. Coordinate regulation of endothelin and adrenomedullin secretion by oxidative stress in endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 281: H1364-71.
- 14) Chun T-H, Itoh H, Saito T et al. Oxidative stress augments secretion of endothelium-derived relaxing peptides, C-type natriuretic peptide and adrenomedullin. J Hypertens 2000; 18: 575-80.
- 15) Masatsugu K, Itoh H, Chun T-H et al. Shear stress attenuates endothelin and endothelin-converting enzyme expression through oxidative stress. Regul Pept 2003; 111: 13-9.