

CD14 陽性細胞は CD14 マイクロビーズ分離キットを用い Auto MACS (Milteny Biotec) で分離した。CD14 陽性細胞は IL-8 に対する遊走実験に用いた。

4) 単核球由来 early EPC の誘導

リンフォプレップチューブにより分離した単核細胞を EGM-2 培地に懸濁し、FN コート 6 穴プレートにおよそ $1\sim 2 \times 10^7$ cells/well 播種した。約 1 週間培養後、プレート上に接着した細胞を early EPC とした。

Early EPC の培養上清 (Conditioned Medium : CM) を採る場合は、early EPC を非酵素的に回収し、EGM-2 培地に懸濁した後、FN コート、48 穴プレートに 5×10^4 /well の密度で播種した。24 時間後、培地を捨て、5% FBS を含む EBM-2 を 0.3 ml/well 加え、24 時間培養した上清を回収し、 $0.22 \mu\text{m}$ のフィルターでろ過し、 -20°C で保存し、以下の実験に CM として用いた。

5) 単核球由来 late EPC の誘導

臍帯血から調製した単核細胞を培地 (Endothelial Basal Medium-2, 2% FCS, VEGF, bFGF, EGF, R3-IGF1, ascorbic acid, , heparin) に懸濁し、FN コート 6 穴プレートに播種した。播種細胞数は、 1×10^7 cells/well 程度とし、1 週間に 2 回、培地を交換した。培養開始 2~3 週間後に出現する数石状のコロニーを形成する増殖能の高い細胞を late EPC とした。

6) フローサイトメーターによる解析

Early EPC は分画用溶液 (2 mM EDTA, 0.5% BSA を含む PBS) で非酵素的に、late EPC はトリプシンを用いて細胞を剥離・回収し、洗浄後、抗 CD31 抗体-FITC あるいは-PE、抗 CD14 抗体-FITC、抗 CD45 抗体-FITC、抗 CD44 抗体-PE で免疫染色した。抗 VE cadherin (CD144) 抗体、抗 VEGF 受容体-2 抗体、抗 MMP-9 抗体の場合、

二次抗体として抗マウス IgG-FITC 抗体を用い、抗 MMP-2 抗体、抗 eNOS 抗体は二次抗体として抗ウサギ IgG-ローダミン(Rho)抗体を用いた。なお、すべての細胞は 7-amino actinomycin D (7-AAD) で染色し、陽性の細胞は死細胞として、解析の際に排除した。

7) 接着細胞の免疫染色

Early EPC は 1 週間培養後、late EPC および HUVEC はコンフルエントになったところで実験に用いた。細胞を PBS で 3 回洗浄、1% ホルムアルデヒド-PBS で固定後、冷却したエタノール (-20°C) で細胞膜を透過させ、さらに PBS で 3 回洗浄した。1% BSA-PBS を用いて細胞を 4°C 、1 時間、ブロッキングした。次に 4°C 、1 時間、それぞれの第 1 抗体でインキュベートした。PBS で洗った後に、 4°C 、1 時間、抗マウス IgG-FITC 抗体、抗ウサギ IgG-Rho 抗体でインキュベートした。PBS で洗浄後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 LSM 510 (Zeiss) を用いて解析した。

8) マトリゲルを用いた *in vitro*, *in vivo* 管腔形成アッセイ

In vitro アッセイ;

マトリゲルを氷上で融解し、24 穴プレートの場合は $300 \mu\text{l/well}$ 、48 穴プレートの場合は $200 \mu\text{l/well}$ 添加した。 37°C 、 CO_2 インキュベーター中に 30 分静置しゲル化させた。ヒト冠状動脈内皮細胞 (HCAEC) または、late EPC はトリプシンを用いて回収した。方法(4)で回収した CM を 5 倍、10 倍に希釈して 5% FBS-EBM-2 に添加した。HCAEC は 1×10^5 cells/0.5 ml/well、Late EPC は 5×10^4 cells/0.5 ml/well になるようゲル上に播種した。 37°C 、 CO_2 インキュベーターで一晩培養した。形成された管腔の写真有位相差顕微鏡 Axiovert2000 で撮影し、顕微鏡画像解析ソフト AxioVision を用いて管腔の長さを定量した。

In vivo アッセイ;

Early EPC を 5×10^5 cells/0.5 ml になるよう

にマトリゲルに懸濁し、6週令のヌードマウスの皮下に移植した。マウスの体温でゲル化したマトリゲルを2週間後に採り出し、凍結超薄切片を作製し、抗マウスCD31抗体で免疫染色し、共焦点顕微鏡で解析した。

9) 細胞遊走

48穴の改良型ボイデンチャンバーを用いて遊走実験を行った。CMに対する遊走の場合、下室には5倍、10倍に希釈したCMを含む5% FBS-EBM-2を30 μ l加えた。IL-8、VEGFに対する遊走の場合、下室には種々の濃度のIL-8、10 ng/ml VEGFを含む2% FBS-EBM-2を30 μ l/well加えた。上室には、5% FBS-EBM-2 (IL-8、VEGFの時は2% FBS)に懸濁した種々の細胞を、 2×10^4 cells/well/50 μ l加えた。上室と下室を挟むメンブランフィルターはポアサイズが8 μ mのポリカーボネートフィルターを用いた。改良型ボイデンチャンバーを37°C、CO₂インキュベーターに3時間静置した。メンブランフィルターをはずし、上室側に付いた細胞は拭き取り、遊走してきた下室側の細胞を固定・染色し、顕微鏡で計数した。

PI3K阻害剤 wortmannin (100 nM)、p110 PI3K α 阻害剤、PI-103 (250 nM)を用いる際には、15分間、細胞を前処理し、さらに阻害剤をチャンバーの上室及び下室の両方に加えた。

10) Early EPC および late EPC の特性指標の探索

臍帯血より分離した単核球をEGM-2培地を用いてFN上で培養し、early EPC および late EPC を分化誘導した。Early EPC、late EPC および HUVEC のRNAを、RNeasy (QIAGEN) を用いて回収した。Early EPC のRNAサンプルは、TURBO DNase (Ambion) で処理後、再度 RNeasy で精製した。調製したRNAの品質をAgilent RNA 6000 Nano Assayを用いたキャピラリー電気泳動により確認した。RT2 First strand kit を

用いて、逆転写反応により1本鎖cDNAを調製し、血管新生に関連する遺伝子84種類について、定量的PCR (RT2 Profiler PCR Arrays; Super Array) により発現プロファイルを解析した。Real-Time PCRの装置はABI7000を用いた。 β アクチンを内部標準として、各遺伝子について β アクチンとのCt値の差を求め、 $2^{-\Delta Ct}$ を各遺伝子と β アクチンの発現量の比とした。

11) 細胞の浸潤活性

マトリゲルに対する各種細胞の浸潤をBD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamberを用い、BD Biosciences社の示すプロトコールに従って測定した。メンブランフィルターのポアサイズは8 μ mを用いた。マトリゲルをコートしたインサートに2% FBS-EBM-2に懸濁したearly EPC、late EPC、HUVEC および HCAEC を 2.5×10^4 cells/0.5 ml/インサートになるように播種した。下室には10 ng/ml VEGFを含む2% FBS-EBM-2を0.75 ml/well加え、37°C、CO₂インキュベーターにチャンバーを23時間静置した。浸潤した細胞は固定・染色し、顕微鏡で計数した。

MMP-2/MMP-9 阻害剤 V (500 nM、Calbiochem)を用いる際には、インサート及び下室の両方に加えた。

12) MMP-2/MMP9 のウエスタンブロット及びザイモグラフィ

細胞培養上清は非還元下でサンプル調製を行い、10% アクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。転写は10% Methanolを含む10 mM CAPS バッファー (pH 11.0) を用いて0.3 Aで2時間行った。MMP-2 及び MMP-9 に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

Early EPC の分画には0.25M Sucrose/10 mM Tris (pH 7.4)を用い、凍結融解により細胞を破壊し、2000 rpm、4°C、5 min 遠心して核分画である沈査を除去した。さらに100,000g、4°C、40 min で遠心し、上清を細胞質分画、沈査を細胞膜分画

とした。電気泳動用サンプルバッファーを加え、ウエスタンブロットを行った。

ザイモグラフィーにはゼラチンザイモグラフィー用ゲルを用いた。非還元条件下で培養上清を電気泳動し、MMP-2/MMP9 酵素活性により分解された部分をクーマシー染色液で可視化し、Typhoon 9400 (Amersham)で画像化した。

13) PI3K アイソフォーム、オクルディンのウエスタンブロット

種々の細胞は回収後 lysis buffer に溶解した。電気泳動用サンプルバッファーを加え、電気泳動後ウエスタンブロットを行った。

抗 PI3K アイソフォーム抗体及び抗オクルディン抗体ブロット後、抗アクチン抗体を対照として用いた。

C. 研究結果

C-1. AC133 陽性細胞由来 early EPC、単核球由来 early EPC、および late EPC の形態と FACS による特性解析

図 1 に AC133 陽性細胞由来 early EPC、単核球由来 early EPC、および late EPC の分化・誘導法を示した。単核球由来 early EPC は AC133 陽性細胞由来 early EPC を含むヘテロな集団と考えられる。 10^8 個の単核球の中には約 1%、すなわち 10^6 個程度の AC133 陽性細胞が存在し、その数パーセントが AC133 陽性細胞由来 early EPC となる。AC133 陽性細胞由来 early EPC は TPO 刺激で増加させることができ、 10^6 個の AC133 陽性細胞から約 10^5 個程度の AC133 陽性細胞由来 early EPC を得ることができる。一方、 10^8 個の単核球からは、約 10^6 個の単核球由来 early EPC が得られる。

AC133 陽性細胞を 1 週間培養した後、CD31 強陽性細胞を FACS で分画し、FN コートディッシュ上で培養すると図 2 上に示すように紡錘状の early EPC が出現した。また、単核球由来 early EPC も同様に紡錘状の形態を示した。

1 週間培養後の AC133 陽性細胞を抗 CD45 抗体-FITC で染色してフローサイトメーターで解析すると、殆どすべての細胞が白血球共通抗原である CD45 陽性であった (図 3 左上)。また、単核球由来 early EPC も CD45 陽性であり (図 3、左下)、これらの細胞はともに血球系であると考えられた。

図 3 の中段はタイプ IV コラーゲンコートプレート上で一週間培養した AC133 陽性細胞を一晩 FN コートプレート上に培養し、接着した細胞を解析した結果である。接着細胞は殆ど CD31 強陽性分画に由来する (Kanayasu-Toyoda et al., J Cell Physiol. 2003) ため、これらの細胞は AC133 陽性細胞由来 early EPC である。AC133 陽性細胞由来細胞及び単核球由来細胞はいずれも CD31 陽性であった。

CD14 の発現に関しては、単核球由来 early EPC は殆どが陽性であるのに対し、AC133 陽性細胞由来 early EPC は陽性と陰性を含むヘテロな集団であった (図 3 右)。血液から分離される AC133 陽性細胞は単核球分画に含まれるため、単核球由来 early EPC には AC133 陽性細胞由来 early EPC が含まれていると想定される。AC133 陽性細胞由来で CD14 陰性の細胞が単核球由来 early EPC で検出されていないのは、単核球由来 early EPC に含まれる CD14 陰性細胞の割合が低いためであると考えられる。

これらの結果から、CD31 および CD45 の発現と形態の点では AC133 陽性細胞 early EPC と単核球由来 early EPC は類似していると考えられた。特性指標の探索や特性解析法の検討においても、再生医療への応用においても、細胞数の確保は重要な要素であると考え、以下の実験は単核球由来 early EPC を用いて実施した。

図 4 に early EPC、late EPC 及びヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の位相差顕微鏡画像を示す。HUVEC は、組織由来の成熟血管内皮細胞の例として用いた。Early EPC は紡錘状を示し

ているが、late EPC、HUVEC では血管内皮細胞に典型的な敷石状の形態が観察された。細胞表面マーカーをFACSで解析すると、これらの細胞はいずれもCD31陽性であった(図5)。一方、CD45、CD14の発現はearly EPCでは陽性であるのに対し、late EPC及びHUVECは陰性であった。代表的な血管内皮細胞のマーカーであるKDR/VEGFR2の発現はearly EPCでは弱陽性、late EPC及びHUVECでは陰性と陽性の2集団が観察された。Vascular endothelial cadherin (VEcad)の発現はearly EPCでは弱陽性、late EPC及びHUVECでは陽性であった。これらのことから、late EPCの細胞表面マーカー発現は組織由来血管内皮細胞であるHUVECと類似していること、early EPCの細胞表面マーカー発現はlate EPCやHUVECと異なり、血球系のマーカーを発現している細胞であることが明らかとなった。

これら3種の細胞を免疫染色した結果を図6に示す。図5で示したCD45およびCD14発現に関する解析結果は、免疫染色でも確認された。また、early EPC、late EPC及びHUVECはいずれも、endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 発現陽性であった(図6、2段目)。

以上の結果から、early EPCとlate EPCは、血管内皮細胞マーカーであるCD31、eNOSを共通して発現していること、early EPCはCD45およびCD14陽性の血球系の細胞であり、late EPCやHUVECとは異なる系統の細胞であることが示された。

C-2. Early EPCの培養上清による冠状動脈内皮細胞(HCAEC)管腔形成・遊走促進

Early EPCは虚血性心疾患の細胞治療にも応用されようとしている。そこで、冠状動脈内皮細胞(HCAEC)の管腔形成や遊走に対するearly EPC培養上清(CM)の促進効果を検討した。図7aに示すように、early EPCのCMは10倍希釈、5倍希釈と濃度に依存してHCAECの管腔形成を

有意に促進した。また、HCAECの遊走も同様にCM添加により促進された(図7b)。

C-3. Early EPCの*in vivo* 活性評価系

血管再生療法に用いられる細胞の*in vivo*活性評価系を確立した。マトリゲルにearly EPCを浮遊させ、ヌードマウスの背部に皮下注射した(図8)。マウスの体温でゲル化したマトリゲルを2週間後に取り出し、超薄切片を作成した。図9に示すように、early EPCとともに移植したマトリゲル内にはマウス由来のCD31陽性細胞から成る多くの血管が観察された。我々が培養したearly EPCは顕著な血管形成促進作用があることが示された。

C-4. Early EPCの特性指標の探索

図7に示したようにearly EPCの培養上清には血管新生に関わる細胞応答を促進する作用があることから、early EPCの特性指標候補分子を探索するため、血管新生に関わる遺伝子84種類について、HUVECあるいはlate EPCを対照として、多検体同時比較Real Time PCRにより発現プロファイル解析を行った。

図10はearly EPCおよびHUVECについて、各細胞における被験遺伝子の発現量とβアクチン遺伝子発現量の比をプロットしたものである。グラフ上に遺伝子名が示してある点は、early EPCとHUVECで発現量に有意差の認められた遺伝子である。Early EPCはHUVECと比較して、CXCL9、CXCL10、CXCL3、IL-8、CCL2、IL1B、TNF、VEGFAなどのサイトカイン・ケモカイン類の遺伝子を高発現していた。その中でIL-8、CCL2はVEGFAと同様に直接血管内皮細胞の遊走や増殖を促進するという報告がある。従って、early EPC自身は管腔形成をしないが、近隣の血管内皮細胞の血管新生を直接的あるいは間接的に促進する可能性が考えられる。一方、HUVECでは、LAMA5 (Laminin, alpha 5)、PECAM1 (CD31)、COL18A1 (Collagen, type X

VIII, alpha 1)、ITGAV (Integrin, alpha V)、ITGB3 (Integrin, beta 3) などの細胞接着関連タンパク質の遺伝子発現が高いことが観察された。興味深いことに血管新生に重要と考えられるメタロプロテアーゼである MMP-9 は early EPC で、MMP-2 は HUVEC で、より多く発現されていた。

Late EPC と HUVEC では、遺伝子発現プロファイルにほとんど差が認められず、late EPC は組織由来の血管内皮細胞と類似した性質を持つことが示唆された(図 11)。差はわずかではあるが、Late EPC と比較して HUVEC では LAMA5 (Laminin, alpha 5) や ITGB3 (Integrin, beta 3) など細胞接着に関連する遺伝子の発現が高かった。また Late EPC と比較して HUVEC で発現量が高かった THBS2 (Thrombospondin 2)は、血管新生抑制因子として知られている。図 12 に示すように、early EPC と late EPC の遺伝子発現を比較した場合、early EPC と HUVEC の比較と同様の結果が得られた。

これらの結果から、early EPC と late EPC では、遺伝子発現プロファイルが大きく異なること、late EPC は成熟した血管内皮細胞である HUVEC と類似した遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかとなった。

C-5. 種々の細胞における MMP-2/MMP-9 の発現

Early EPC における MMP-9 タンパク質の発現を種々の細胞の培養上清を用いてウエスタンブロット法とザイモグラフィで検討した(図 13)。その結果、early EPC の培養上清にのみ MMP-9 のバンドが検出され、late EPC、HUVEC、HCAEC の培養上清には MMP-2 のバンドが検出された。また、ザイモグラフィでは、ウエスタンブロットでバンドが検出された試料について、ウエスタンブロットと同じ分子量を示す泳動位置にゼラチン分解により生じるバンドが検出された。MMP-2 および MMP-9 の発現パターンは、図 10 や図 12 の遺伝子発現プロファイルと一致するものであった。

MMP-2 や MMP-9 を産生する細胞は、細胞外マトリックスの分解により周囲に浸潤する活性が高いと考えられる。また、高い浸潤活性には MMP-2 や MMP-9 が細胞表面に存在することが必要であるという報告もある (Brooks et al. Cell 85 683 1996, Yu et al. Gene Dev. 2000 14 163)。そこで、フローサイトメトリーにより MMP-2/MMP-9 の細胞表面局在を検討した。その結果、early EPC の細胞表面には MMP-9 のみならず、培養上清には観察されなかった MMP-2 も検出された(図 14)。一方、late EPC、HUVEC、HCAEC の細胞表面には、遺伝子発現解析結果に一致して MMP-9 は検出されず、培養上清に検出された MMP-2 も細胞表面には検出されなかった(図 14)。

細胞膜タンパク質である CD44 と結合して MMP-9 が細胞表面に存在しているという報告 (Yu et al. Gene Dev. 2000 14 163, Bansal Plos ONE 4 e4911 2009)を参考に、early EPC を免疫染色し、フローサイトメーターと共焦点顕微鏡(図 15)で解析した。その結果、MMP-9、MMP-2、CD44 は、いずれも early EPC の表面に存在することが示された。MMP-9 あるいは MMP-2 と CD44 の 2 重染色 (フローサイトメーター 3 段目) では、MMP-9 陽性あるいは MMP-2 陽性の細胞で CD44 陰性の細胞は殆ど観察されなかった。

次に early EPC を細胞質と細胞膜に分画後、MMP-9、MMP-2、および CD44 の発現をウエスタンブロットで解析した結果、共焦点顕微鏡(図 15)による解析と同様に、細胞膜画分に MMP-9、MMP-2、および CD44 が検出された(図 16)。また、還元条件下で電気泳動後、ウエスタンブロットにより MMP-9 及び MMP-2 の分子量を細胞内と培養液中で比較したところ、細胞内の方がともに小さいことが明らかとなった(図 17)。したがって、膜に局在する MMP-9 及び MMP-2 は活性型と考えられた。

C-6. Early EPC の浸潤活性

マトリゲルに対する early EPC の浸潤活性を、late EPC、HUVEC、HCAEC と比較した。浸潤刺激因子としては VEGF を用いた。マトリゲルは、細胞外マトリックスタンパク質を豊富に含む Engelbreth-Holm-Swarm マウス肉腫から抽出した可溶性基底膜から成り、主成分は、ラミニン、コラーゲン IV、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、およびエンタクチン/ニドジェン 1,2 である。解析の結果、early EPC では late EPC、HUVEC、HCAEC に比べ 3 時間でも高い浸潤活性が観察され、23 時間でも持続することが明らかになった (図 18)。VEGF と共に MMP-2/MMP-9 阻害剤を加えると early EPC の VEGF 刺激に応答した浸潤は完全に阻害された (図 19)。これらの結果から、early EPC の浸潤には MMP-2/MMP-9 が関与していることが示され、early EPC が投与局所において新生血管形成のために高効率に浸潤できる可能性が考えられた。

C-7. AC133 由来 early EPC における MMP-9 の発現

これまでの解析から、単核球由来 early EPC は MMP-2/MMP-9 を発現していることが明らかになった。そこで、AC133 由来 early EPC における MMP-2/MMP-9 の発現を共焦点顕微鏡で検討した。図 20 に示すように AC133 由来 early EPC も MMP-2/MMP-9 を発現し、この点でも単核球由来 early EPC と共通していると考えられた。

C-8. Early EPC の IL-8 に対する遊走の解析

Early EPC による血管形成促進の機構として、early EPC が虚血部位に浸潤・遊走し、多くのサイトカインを放出して、既存の血管や late EPC をリクルートすることにより血管再生を促すという仮説が考えられた (図 21)。そこで、この過程において重要な、early EPC の遊走に関わるシグナル伝達機構を解析した。

我々は既に、early EPC が IL-8 を多く産生す

ることを見出している。そこで、IL-8 のオートクライン作用を考え、IL-8 を刺激剤として early EPC の遊走能を評価した。同時に、early EPC 由来 IL-8 のパラクライン作用も想定して、late EPC 及び HUVEC についても、IL-8 の遊走促進作用を検討した。その結果、IL-8 は late EPC や HUVEC を濃度依存的に促進したが、early EPC は IL-8 に対し遊走しなかった (図 22)。

IL-8 受容体の発現をフローサイトメーターで解析すると (図 23)、late EPC や HUVEC に比べ early EPC で強く発現していた。また、単核球由来 early EPC は殆どが CD14 陽性細胞である (図 3) ことから、新鮮な CD14 陽性細胞を用いて IL-8 に対する遊走能を検討すると、IL-8 の濃度に依存して遊走が促進された (図 24)。以上のことから、early EPC は分化の過程で IL-8 に対する遊走能を失う可能性が示された。

C-9. Early EPC の VEGF に対する遊走の解析

次に、遊走促進因子を VEGF に変えて early EPC の遊走能を調べた。その結果、図 25 に示すように、late EPC や HUVEC と同様に、early EPC は VEGF に応答して遊走することが分かった。

細胞遊走を調節するシグナルタンパクとして PI3K が関与していることが報告されている。また、early EPC は血球系由来であると考えられるため、early EPC の遊走には血球に特異的に発現する p110 PI3K δ が重要と考えられた。そこで、VEGF により惹起される遊走に対する PI3K 阻害剤の効果を調べたところ、early EPC の遊走は、PI3K アイソフォーム非選択的阻害剤である Wortmannin により阻害されたが、p110 PI3K α 選択的阻害剤である PI-103 では阻害されなかった (図 26)。Late EPC 及び HUVEC の遊走は、PI-103 により抑制された。

次に、p110 PI3K のアイソフォーム発現をウェスタンブロット法で解析したところ、Late EPC、HUVEC、及び、ヒト冠状動脈内皮細胞

(HCAEC)は p110 PI3K α を発現しているのに対し、early EPCはp110 PI3K δ を発現していた(図 27)。また、AC133 由来 early EPC も免疫染色の結果、p110 PI3K δ を発現していることが確認された(図 28)。Early EPC における p110 PI3K δ の発現を siRNA により抑制すると図 29 右に示すように p110 PI3K δ タンパク発現は抑制され、VEGF に対する遊走も有意に抑制された(図 29 左)。以上の結果から、early EPC には PI3K のうち δ アイソフォームが発現しており、遊走には p110 PI3K δ が関与していると考えられた。

C-10. Late EPC の管腔形成能とオクルディン発現量の関連

Late EPC は、血液単核球細胞を血管内皮細胞増殖条件下で2~3週間培養して得られる細胞で、マトリゲル上での管腔形成する能力を保有している。しかし、管腔形成能は、株ごとに異なっており、細胞組織加工医薬品として用いるためには、管腔形成能の評価が必要である。また、管腔形成に関わる特性指標を明らかにすることが、品質評価において有用であると考えられる。Late EPC の管腔形成に関する代表的な例を図 30 に示す。Late EPC 株である S3、S2-22、2R32 のうち、2R32 は組織由来血管内皮細胞である HUVEC と同程度の管腔形成能を示す株であり、S2-22 及び S3 は HUVEC より管腔形成能が低い株である。特に、S3 と名付けたセルラインでは殆ど管腔が形成されない。S3 株も CD31 や KDR 等の血管内皮細胞マーカーは発現している(図 31)。

これらの 3 種類の late EPC 株について、HUVEC を対照として遺伝子の発現プロファイルと比較したところ、管腔形成能の程度によらず、HUVEC と類似したプロファイルを示すことが明らかになった(図 32)。しかし、管腔形成能に相関する遺伝子として、オクルディン(OCLN)が見出され、管腔形成能の低い S3 では、これらの遺伝子の発現が低いことが見出された(図 34 左)。

遺伝子発現プロファイル比較に用いた late EPC とは異なる株で、管腔形成能を持つ S11-11 と S11-12、及び、管腔形成能の極めて低い S3 について、オクルディンのタンパク質レベルでの発現をウエスタンブロットにより確認したところ、S11-11 株、S11-12 株、及び、陽性対照として用いた HUVEC ではオクルディンの発現が検出されたが、S3 株ではオクルディンの発現が検出されなかった(図 34 右)。

オクルディンは図 33 で示すように tight junction を形成する 4 つの膜貫通ドメインをもつタンパクであるが、血管内皮前駆細胞の管腔形成能との関連はこれまで報告されていない。

C-11. Late EPC の管腔形成におけるオクルディンの機能的役割に関する検討

Late EPC の管腔形成におけるオクルディンの機能的役割を明らかにするため、siRNA を用いたオクルディンのノックダウン実験を行った。管腔形成能の高い Late EPC 株である S11-11 に、オクルディン特異的な siRNA (OCLN-KD-1 及び OCLN-KD-2) を導入したところ、オクルディンの mRNA (図 35 左) が確認された。また、タンパク質レベルでのオクルディンの減少も確認された(図 35 右)。また、これらの siRNA の導入により、管腔形成が抑制された(図 36、37)。

マトリゲル上に播種した細胞の変化を経時的に観察したところ、オクルディンをノックダウンした細胞も S3 細胞も、コントロールの細胞と同様、細胞が網目状にならび、4 時間まで管腔様構造が認められた。しかし、20 時間では、オクルディンをノックダウンした細胞及び S3 細胞では、管腔構造が消失しており、お互いにコンタクトできない様子が観察された(図 38)。以上のことから、オクルディンは late EPC の管腔形成の後期過程あるいは維持に必要な機能的な指標であると考えられた。

D. 考察

成体における血管形成は従来、既存の血管内皮細胞遊走・増殖により新たな血管が形成される血管新生 (angiogenesis) の機序により生じるものと考えられていたが、骨髄に由来する EPC が成体の循環血液中に存在することが報告され、胎生期にのみに認められるとされていた血管発生 (vasculogenesis) の機序を介して血管内皮前駆細胞が成体での血管形成に関わるという概念が提唱された。それ以来、EPC を用いた血管再生療法の開発が試みられ、EPC あるいは EPC の起源細胞を含む細胞画分を用いた臨床研究等が展開されている。

EPC には少なくとも 2 つのタイプがあることが知られている。1 つは増殖能が低く、自身は管腔形成能をもたないが、血管形成に関与するサイトカイン等を放出する紡錘状の形をした early EPC である。Early EPC は不均一ではあるが培養 1-2 週間で出現する。もう 1 つは、高い増殖能と管腔形成能をもち、敷石状を呈した late EPC である。Late EPC は多くの均一な細胞数が得られるので扱いやすいが、出現時期が 2-3 週間と遅く、出現頻度も低い。Early EPC と late EPC の定義は現在に至っても明確でなく、EPC に関する論文においても、early EPC と late EPC のどちらに関する研究であるのかが表題や要旨からは明らかでなく、method の内容から読者が判断しなければならない状況にある。したがって、EPC の分化誘導に関わる基礎的研究の観点はもとより、再生医療における実用化に向けた品質管理法の観点からも、early EPC と late EPC の差異を明確にし、それぞれの特性を明らかにすることが重要である。

我々は、EPC の発見当初から EPC に関する研究に着手し、幹細胞である AC133 陽性細胞を起源とする EPC に関する研究を進めてきた (Kanayasu-Toyoda et al., J Cell Physiol. 195, 119, 2003, J Biol Chem 282, 33507, 2007)。2000 年以降、EPC には 2 種類の細胞 (early EPC

と late EPC) が存在することや (Lin Y. et al. J. Clin. Invest. 105, 71, 2000)、単核球を起源として early EPC の調製が可能であることなどが明らかになり、EPC の起源細胞や調製法に関する知見は変遷してきた。また、単核球を投与する臨床研究や先進医療も多く行われるようになってきた。AC133 陽性細胞が単核球画分に含まれる細胞であること、AC133 陽性細胞を起源とする early EPC と単核球を起源とする early EPC は類似した性質を持つこと、単核球由来 early EPC の方が細胞数の確保が容易であること等を考慮し、early EPC については、単核球から分化誘導される細胞を用いて解析を進めた。

図 12 に示したように、early EPC と late EPC では遺伝子発現プロファイルが大きく異なることが明らかになった。Early EPC では、MMP-9、CXCL10、CXCL9、TNF、IL-1 β 、TYMP、IFN γ 、IL-8、CCL2 などの発現が高く、これらが特性指標として有用である可能性が考えられる。これらの中でも特に、IL-8 や CCL2 は血管内皮細胞の遊走や増殖を促進することが知られており、early EPC の血管新生促進作用に寄与している可能性が高い。他に興味深い知見として、early EPC が MMP-9 を高発現していたことがあげられる。MMP-9 は、基底膜の構成成分である IV 型コラーゲンを分解することがよく知られているが、その他に、c-kit リガンドを切断して可溶性リガンドとして放出させることにより、骨髄由来血管内皮前駆細胞の動員に関与することが報告されている (Heissig et al. Cell 109 625 2002)。MMP-9 のこれらの活性が、early EPC の血管形成促進作用に寄与している可能性が考えられる。MMP-9 は好中球やマクロファージにおいても発現が高いことが知られていることから、MMP-9 の発現の点でも、early EPC が血球系に近い特性を持つことが示唆された。

MMP-9 は転移能が高いガン細胞では細胞表面に存在することが報告されている (Yu et al. Gene Dev. 2000 14 163)。図 14-16 で示したように early

EPC の細胞表面には MMP-9 が存在しており、early EPC は late EPC や組織由来血管内皮細胞と比較して高い浸潤活性を示した(図 18)。さらに、early EPC では、培養上清中には検出されない MMP-2 も細胞膜に存在していることが示された。CD44 は膜貫通型糖タンパク質で、細胞の分化、増殖、運動性に関わっており、腹腔マクロファージや乳癌細胞、黒色腫細胞では MMP-9 と CD44 が結合していることが報告されている(Yu et al. Gene Dev. 2000 14 163, Bansal Plos ONE 4 e4911 2009)。CD44 は early EPC において大量に産生される MMP-9 のみならず、産生量の少ない MMP-2 とも相互作用し、これらのプロテアーゼを細胞膜に留める役割を担っている可能性が考えられる。膜表面に存在する MMP-9 は IL-8 や IL-1 β のプロセッシングに関わり、より生物活性の高い IL-8 や IL-1 β を放出する役割があるという報告 (Steen et al. Blood 96 2673 2000, Schönbeck et al. J Immunol 161 3340 1998) があることから、これらの作用が協調的に作用して血管新生促進作用をもたらすものと思われる。したがって、early EPC において、MMP-2/MMP-9 が細胞膜に存在することが early EPC の血管形成促進能と関連した重要な特性である可能性が考えられた。

次に、early EPC が虚血部位に最初に到着する細胞であるという仮説のもと (図 21)、浸潤には遊走が関与していることや early EPC が血球系細胞であることを考え、遊走に関するシグナル伝達について解析を進めた。Early EPC は VEGF に応答して遊走する。しかし、Early EPC は IL-8 受容体を発現していながら(図 23)IL-8 に応答した遊走反応は示さない(図 22)。Early EPC の殆どが CD14 陽性細胞である (図 3)。Early EPC と対照的に、末梢血から分離した直後の CD14 陽性細胞は IL-8 に応答し、IL-8 の濃度に依存した遊走を示す(図 24)。したがって、CD14 陽性細胞が early EPC へ分化する過程で IL-8 に対する遊走能を失うが、VEGF に対する遊走能は失わない可

能性が考えられた。これらのことから、early EPC は虚血組織に多く産生される VEGF に応答し細胞表面に局在する MMP-9/MMP-2 の作用により、虚血部位に到着する可能性が考えられる(図 21)。Early EPC には VEGF に対する遊走シグナル分子として血球系に多く発現する p110 PI3K δ が強く発現し(Graupera et al. Nature 453 662 2008)、機能している(図 26、27、29)。Late EPC、HUVEC、HCAEC では p110 PI3K α が発現しており、PI3K アイソフォームの違いが early EPC を特徴づける特性指標の一つと考えられる。

Early EPC の *in vivo* での血管形成促進効果は、ヌードマウスの背部への細胞/マトリゲルの移植により示すことができた(図 11)。血管再生療法は移植した細胞が自ら血管を作るより、血管再生促進因子を放出させる細胞を移植する方が治療効果が高いと考えられており(伊澤淳 実験医学 血管研究と血管治療 高倉伸幸編集 28 2861 2010)、early EPC は血管再生療法に有用な細胞であると考えられた。

Late EPC に関する検討では、オクルディンが管腔形成に関わる機能的特性指標であることを示すことができた。オクルディンは tight junction タンパクであり(Tsukita et al. Oncogene 27 6930 2008)、脳の血管において(Hawkins and Davis Pharmacol Rev 57 173 2005)、内皮細胞どうしが接着している辺縁に連続的に発現している(Hirase et al. J Cell Sci 110, 1603 1997)。このことからオクルディンは血液脳関門の重要な働きをしていると考えられている。一方、脳血管以外の内皮細胞ではオクルディンは辺縁に不連続的に発現し、また、オクルディンをノックアウトした ES 細胞では tight junction が形成される報告(Saitou et al. J Cell Biol 141 397 1998)もあり、オクルディンの役割については明確ではなかった。我々が示した管腔形成の顕著な促進効果はオクルディンの新たな役割と言える。Late EPC を細胞組織加工医薬品として用いる場合には、オク

ルディンの発現を確認することが、血管形成能保持の確認に有用であると考えられる。

細胞・組織加工医薬品の品質管理においては、確認試験として、目的とする細胞・組織の形態学的特徴、生化学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質、その他の適切な遺伝型あるいは表現型の指標を選択して、目的とする細胞・組織であることを確認することが求められている。本研究で明らかになった特性指標分子は、early EPCあるいはlate EPCの確認試験や力価試験において有用であると考えられる。すなわち、early EPCで高発現しているMMP-9やケモカイン類は特徴的産生物質として、late EPCの管腔形成能と発現量が相関していたオクルディンは生化学的指標として用いることができる可能性がある。

E. 結論

細胞・組織加工医薬品の品質管理において必要とされる確認試験法や力価試験法の確立に資する研究として、血管内皮前駆細胞をモデルとした研究を行い、以下の結果を得た。

- 1) 単核球由来 early EPC の分化系を確立した。形態と細胞表面マーカーCD45 および CD31 発現の観点から、AC133 陽性細胞由来 early EPCが単核球由来early EPCと類似した性質を示すことを明らかにした。
- 2) Early EPC と late EPC の遺伝子発現プロファイルが大きく異なっていることを明らかにし、early EPC の血管形成促進作用には MMP-9 や CXCL9、CXCL10、IL-8 といったケモカイン類等が寄与している可能性を示した。
- 3) Early EPC が高い細胞外マトリックス浸潤活性を持ち、細胞表面に存在する MMP-9 及び MMP-2 が浸潤能に関連した機能的特性指標であることを明らかにした。浸潤に伴う遊走のシグナル伝達物質は血球に多く発現する

p110 PI3K δ であることを示した。

- 4) ノードマウスの背部に early EPC を含むマトリゲルを移植する *in vivo* の血管形成の活性評価系を開発した。
- 5) Tight junction 関連タンパク質であるオクルディンが late EPC の機能評価因子になり得ることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表、総説

- 1) 山口照英、石井明子 細胞・組織加工医薬品の品質と安全性確保への提言 PHARMASTAGE 7, 1-6, 2008
- 2) 山口照英、石井明子 早期臨床開発段階でのバイオ医薬品の品質・安全性確保 臨床評価 36, 611-627, 2009
- 3) 石井明子、川崎ナナ: バイオ治験薬の品質安全性確保 ファームテクジャパン 16, 69-80 2010

2. 学会発表

- 1) 豊田淑江、石井明子、鈴木 浩子、李 勤、田村悦臣、森田育男、山口照英: 血管内皮前駆細胞である Early EPC と Outgrowth Endothelial Cell の特性解析 第81回日本生化学会大会 2008年12月 神戸
- 2) 鈴木浩子、石井明子、豊田淑江、田村悦臣、山口照英: ヒト臍帯血単核球由来 Outgrowth Endothelial Cell の特性指標の探索と機能解析 第8回日本再生医療学会総会 2009年3月 東京
- 3) 北川博子、豊田淑江、石井明子、鈴木琢雄、

多田 稔、小林 哲、山口照英：血管内皮細胞である Early EPC の機能解析

第 82 回日本生化学大会 2009 年 10 月 神戸

4) 豊田淑江、北川博子、石井明子、多田 稔、鈴木 琢雄、小林 哲、山口照英：血管内皮前駆細胞の機能解析-Early EPC を中心に 第 9 回日本再生医療学会総会 2010 年 3 月 広島

5) 豊田淑江、石井明子、鈴木琢雄、多田 稔、小林 哲、川崎ナナ、山口照英：血管内皮前駆細胞における MMP-2/MMP-9 の役割 第 83 回日本生化学大会 第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

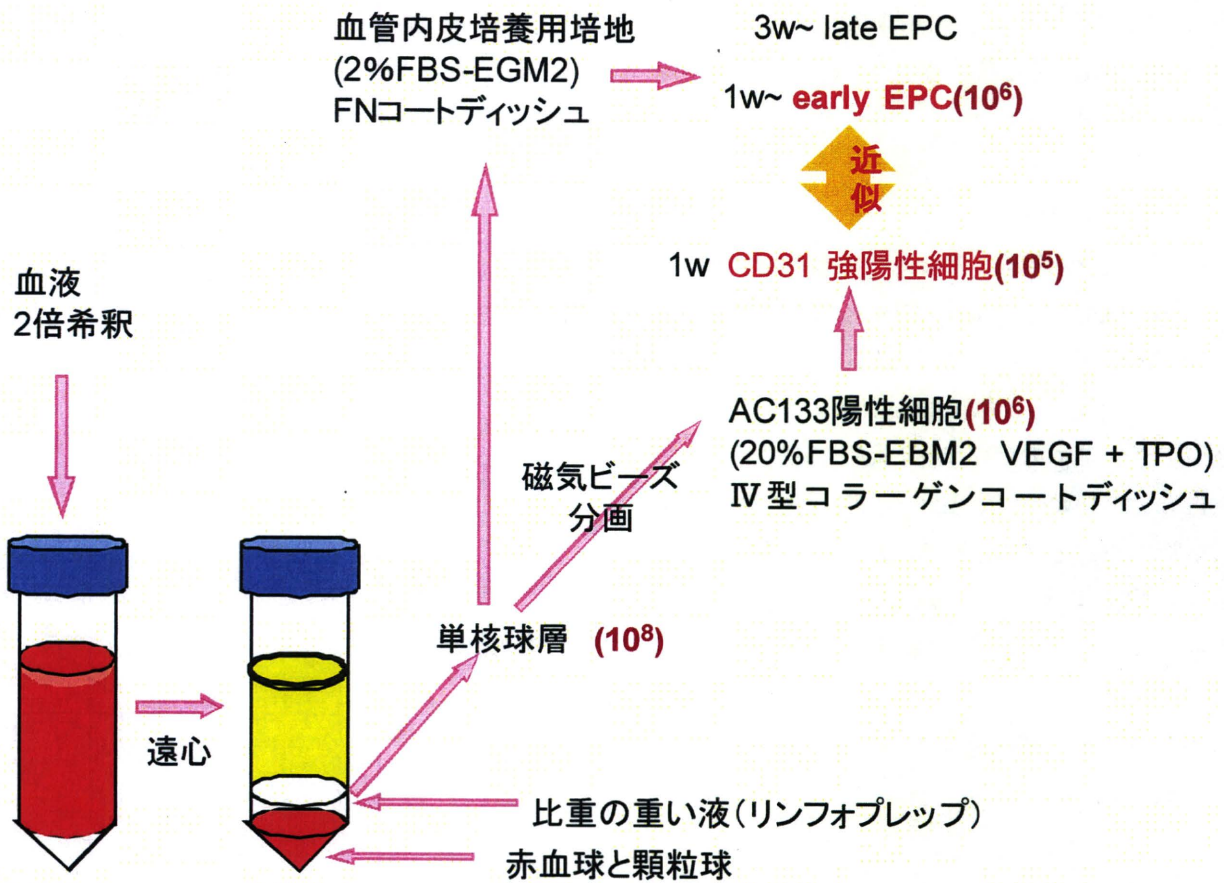
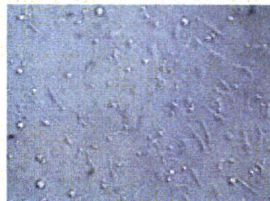


図 1. AC133 陽性細胞由来 early EPC、単核球細胞由来 early EPC および late EPC の分化・誘導

AC133 陽性細胞由来



単核球由来

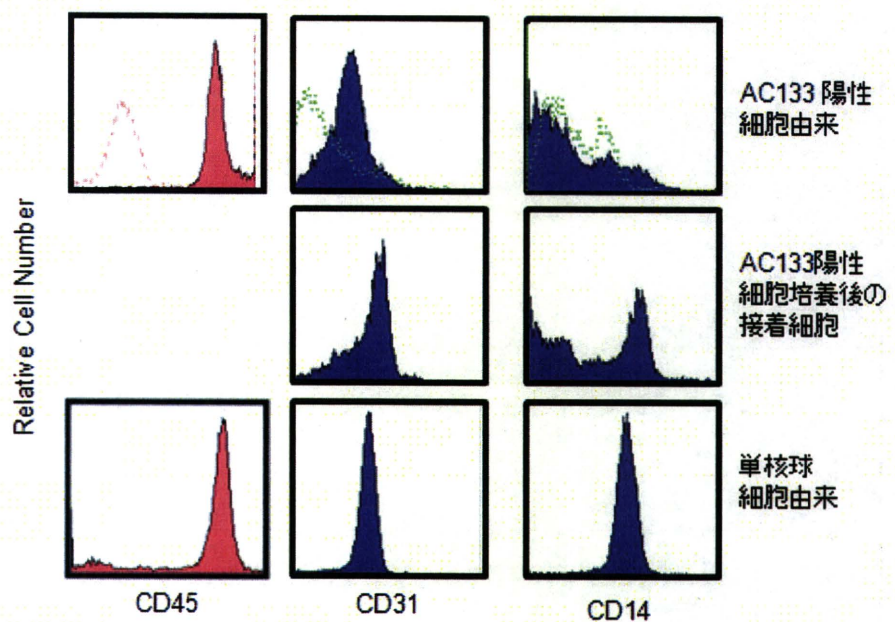


図 2. AC133 陽性細胞及び単核球由来 early EPC の顕微鏡画像

図 3. AC133 陽性細胞及び単核球由来 early EPC における細胞表面マーカー分子の発現

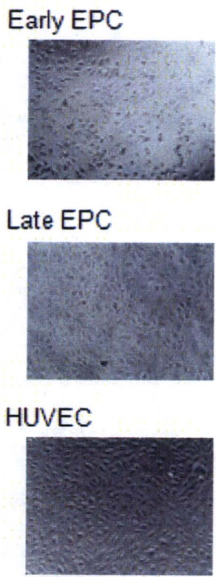


図 4. 単核球由来 early EPC、Late EPC および HUVEC の光顕画像

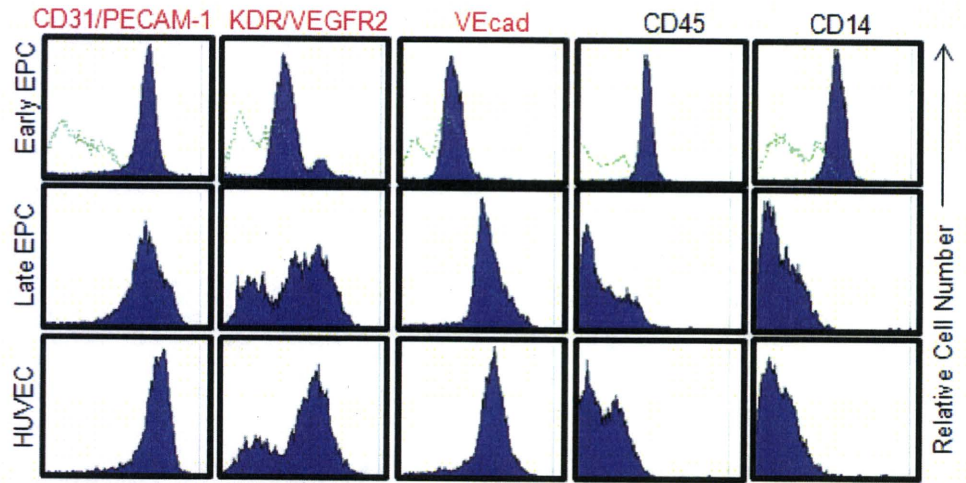


図 5. 単核球由来 early EPC、Late EPC および HUVEC における細胞表面マーカー分子の発現

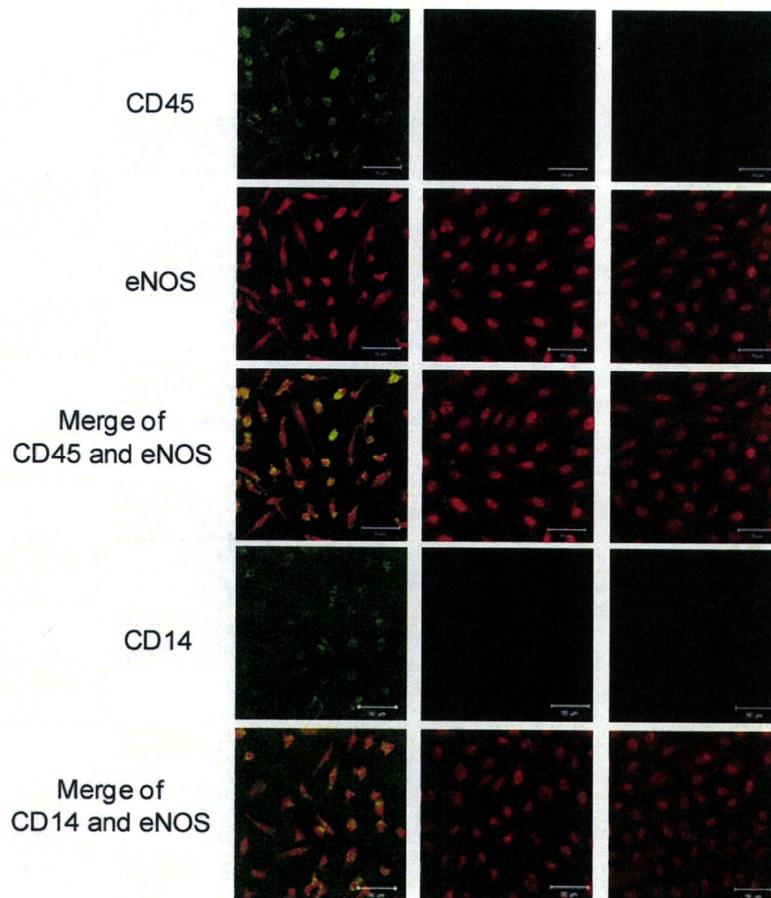
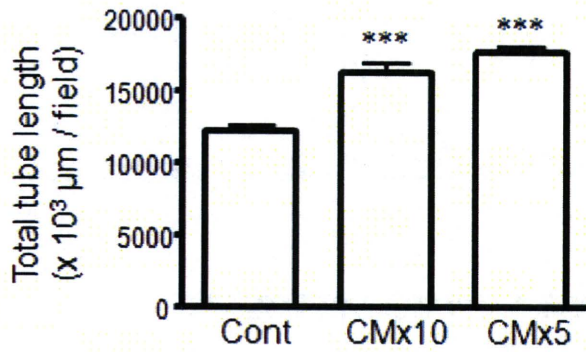
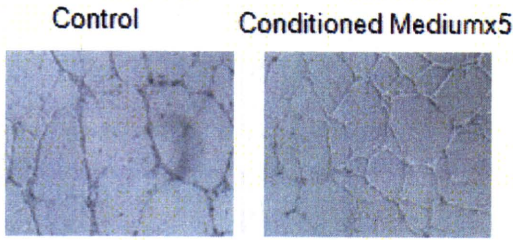


図 6. 単核球由来 early EPC、Late EPC および HUVEC におけるマーカー分子の発現

a. 管腔形成



b. 遊走

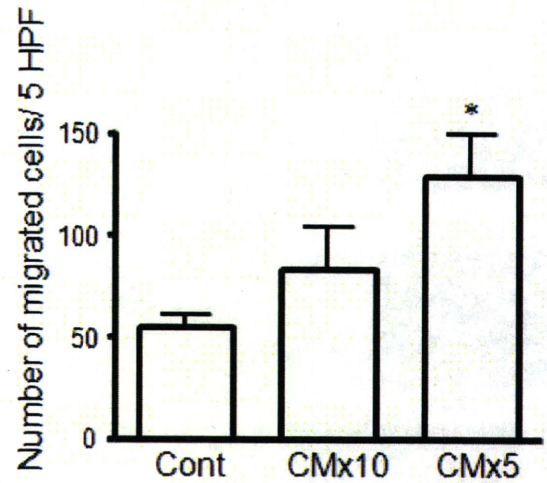


図 7. 冠状動脈内皮細胞の管腔形成・遊走に対する early EPC 培養上清の促進効果

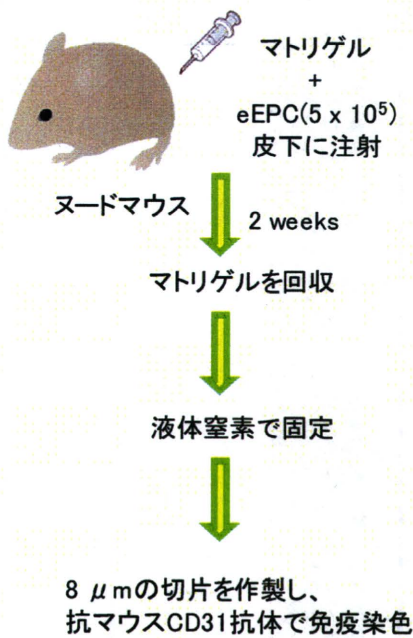
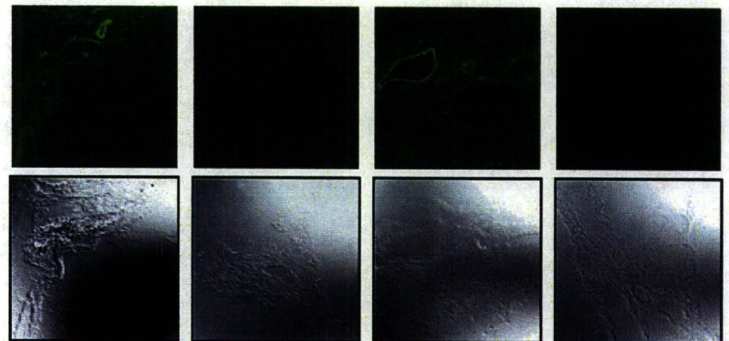


図 8. マトリゲルとともにノードマウスに移植した eEPC の *in vivo* における血管形成促進効果

Control



eEPC

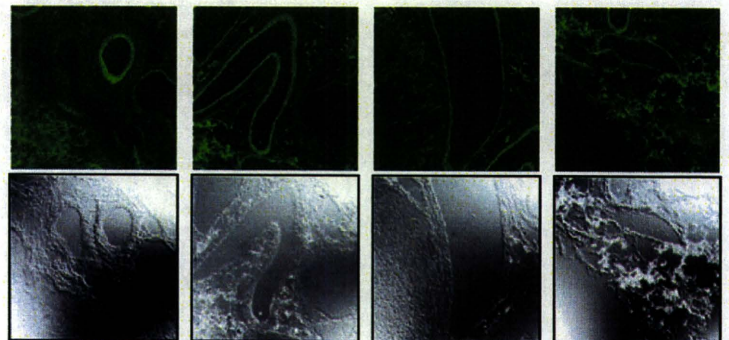


図 9. Early EPC とともに移植したマトリゲル内に観察される宿主マウス由来 CD31 陽性血管内皮細胞

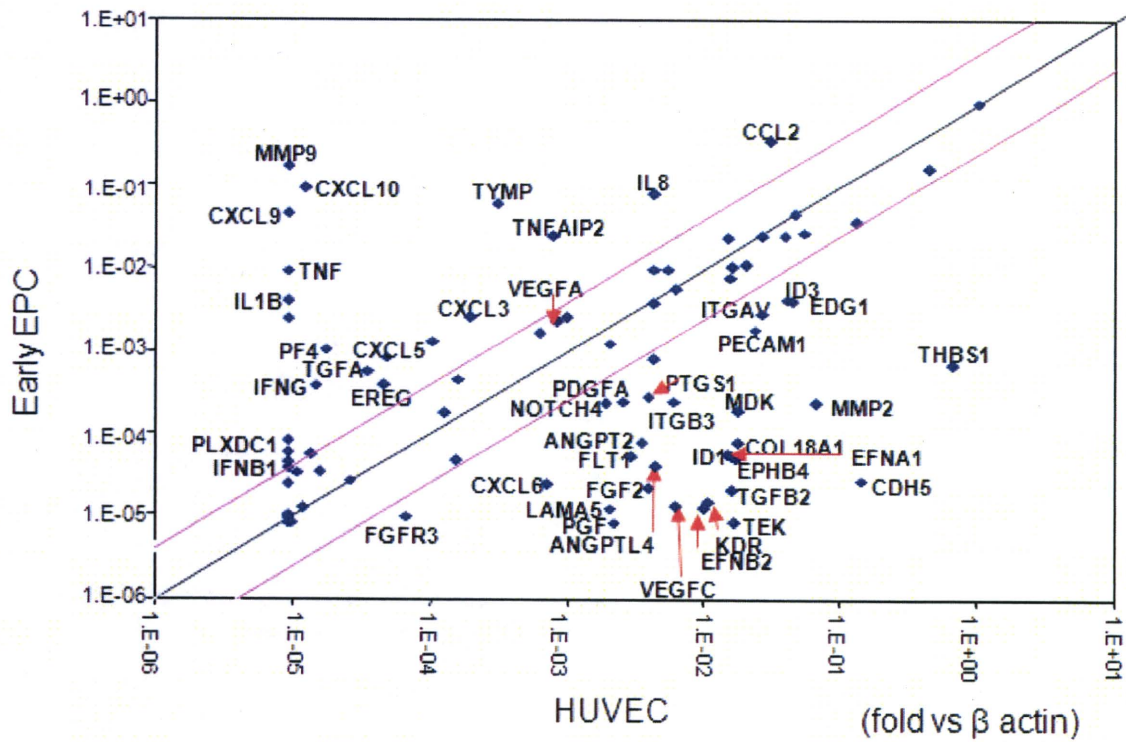


図 10. Early EPC 及び HUVEC における血管新生関連因子の遺伝子発現プロファイル比較

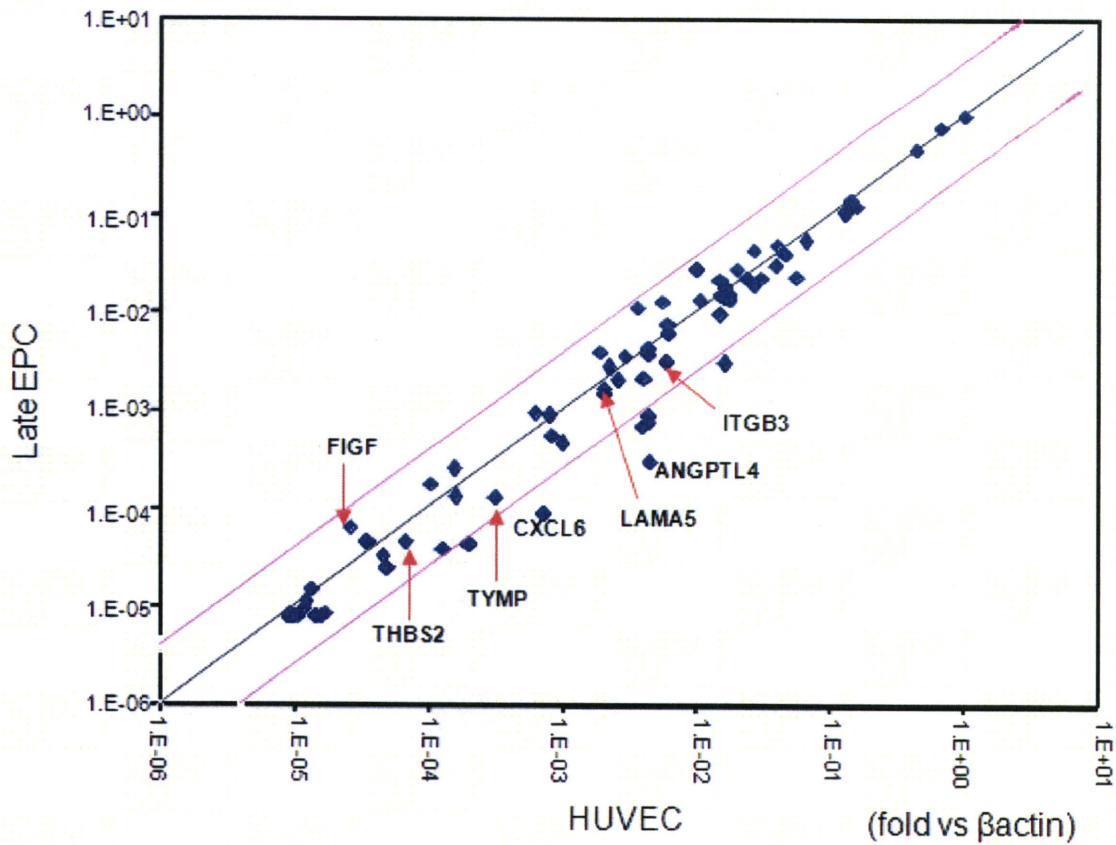


図 11. Late EPC 及び HUVEC における血管新生関連因子の遺伝子発現プロファイル比較

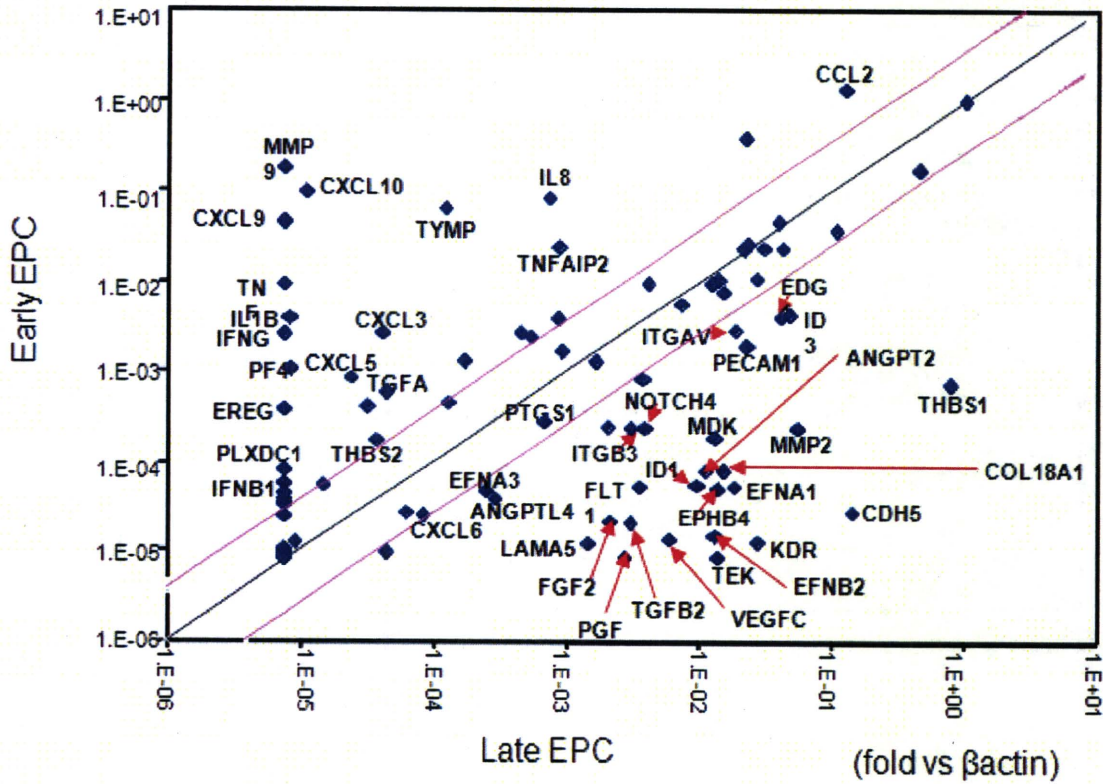


図 12. 単核球由来 early EPC 及び late EPC における血管新生関連因子の遺伝子発現プロファイル比較

ウエスタンブロッティング

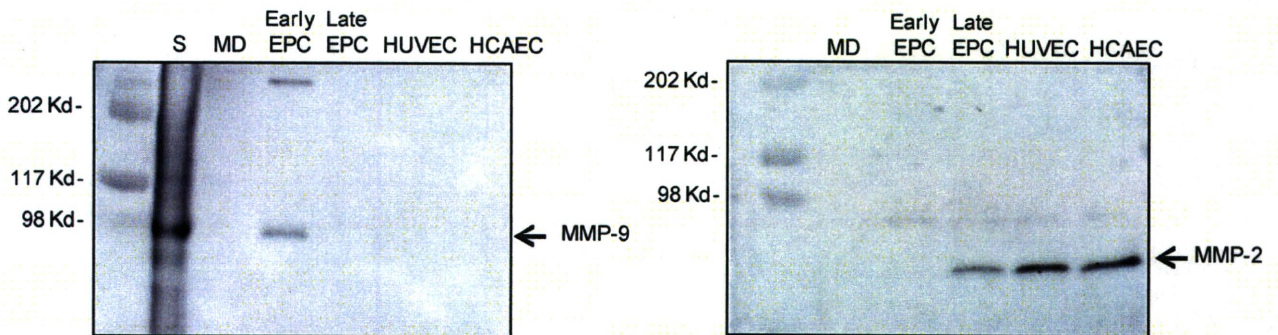


図 13. 種々の細胞の培養上清における MMP-9/MMP-2 タンパク質および活性の検出

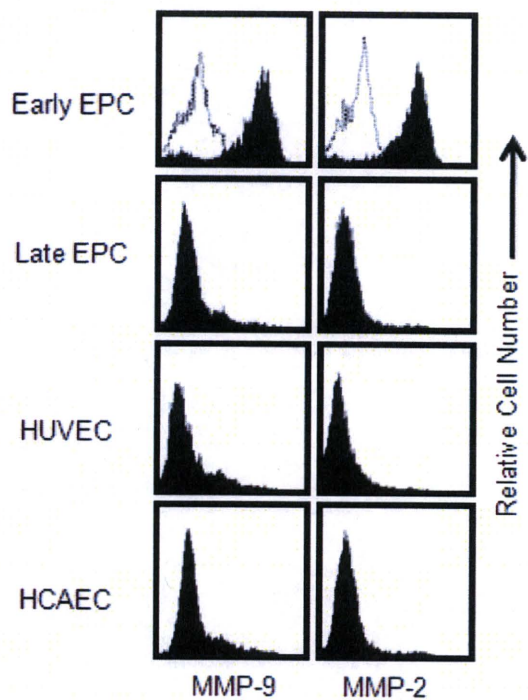


図 14. フローサイトメトリーによる細胞表面
MMP-9/MMP-2 の検出

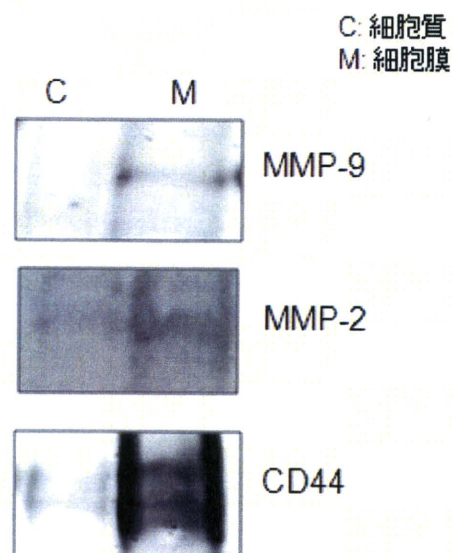


図 16. ウェスタンブロットによる MMP-9、
MMP-2、及び CD44 の検出

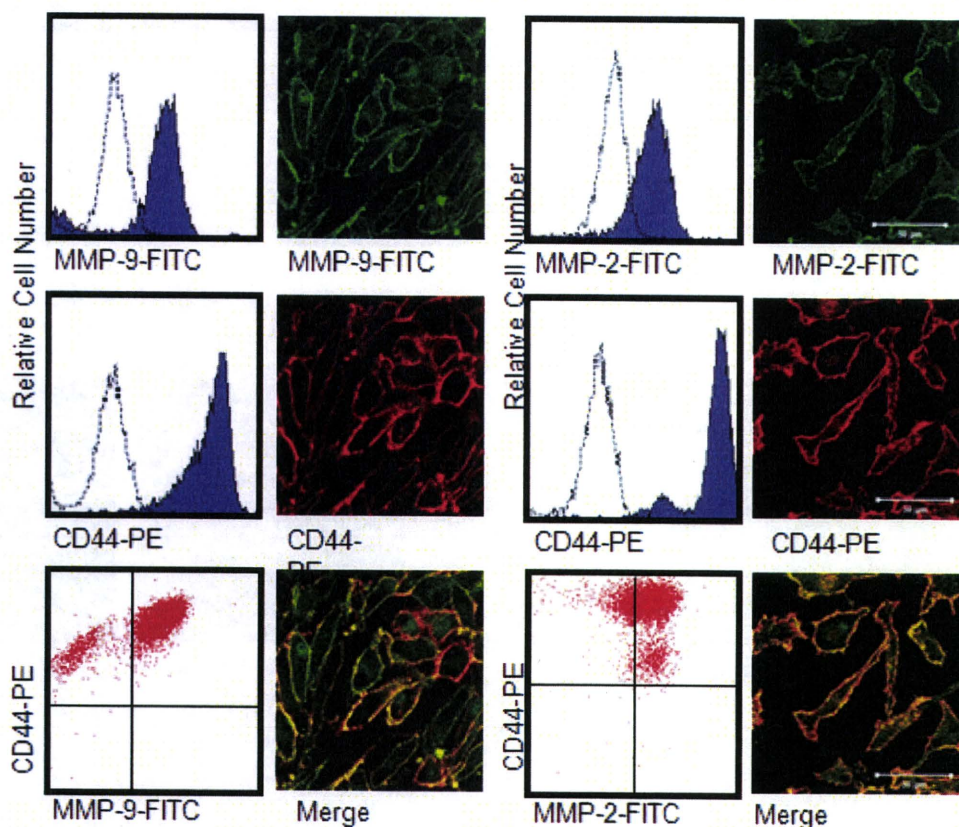


図 15. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた MMP-9、MMP-2、及び CD44 の蛍光免疫染色解析

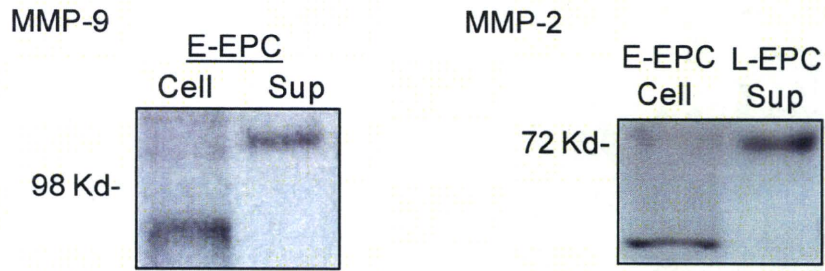


図 17. ウエスタンブロットによる細胞内と培養上清中 MMP-9 及び MMP-2 の分子量比較

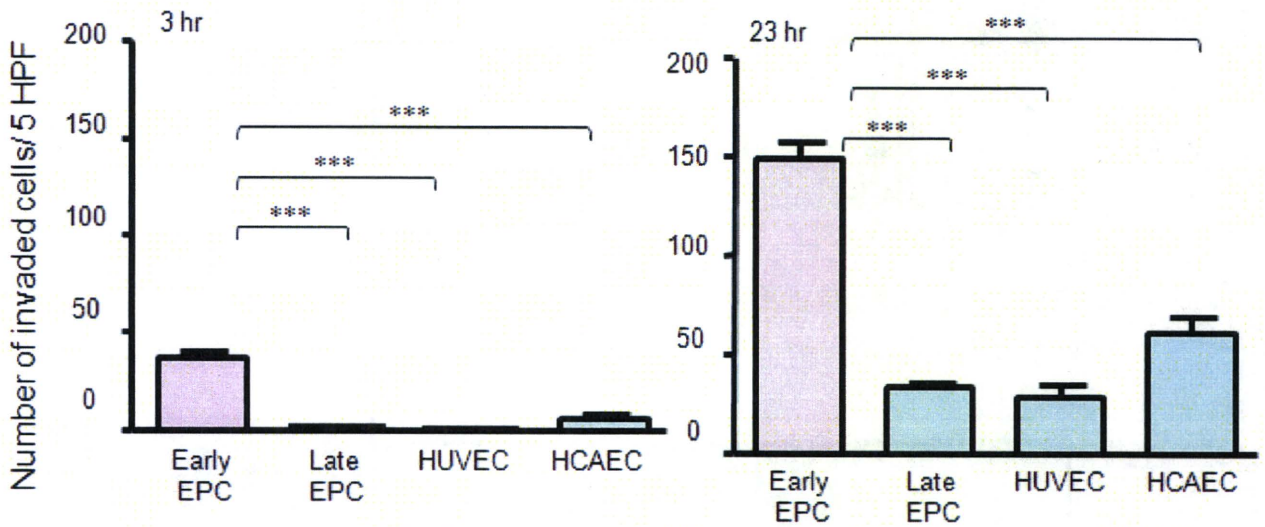


図 18. VEGF 刺激に応答した浸潤活性

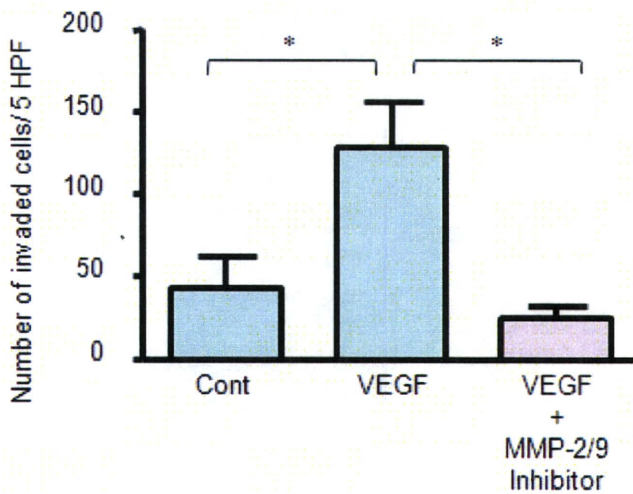


図 19. VEGF 刺激による early EPC の浸潤に対する MMP-2/9 阻害剤の効果

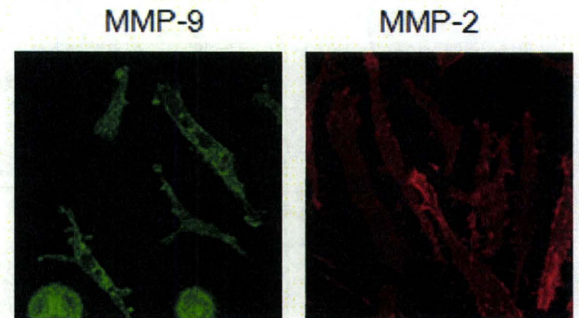


図 20. AC133 由来 Early EPC における MMP-9/MMP-2 の発現

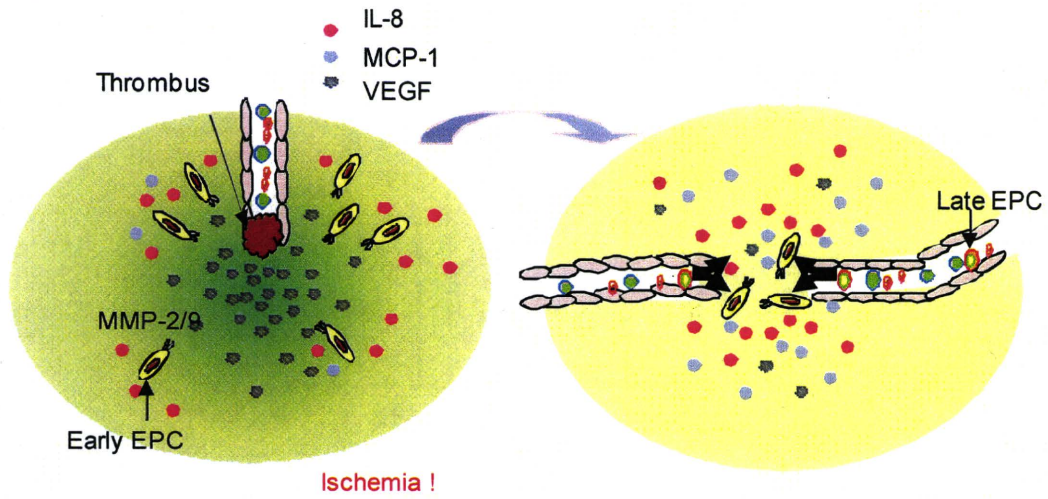


図 21. Early EPC が最も早く虚血部位に浸潤する と考える作業仮説

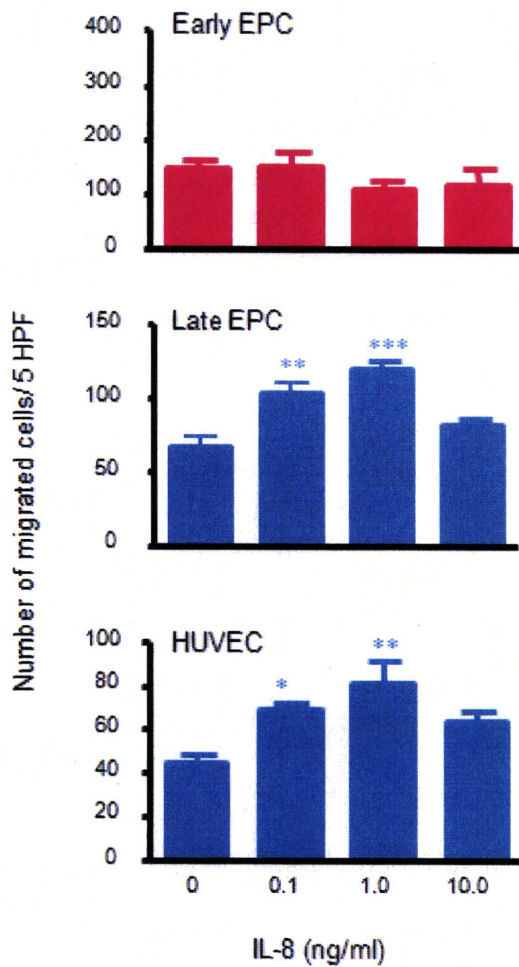


図 22. IL-8 に応答した EPC の遊走

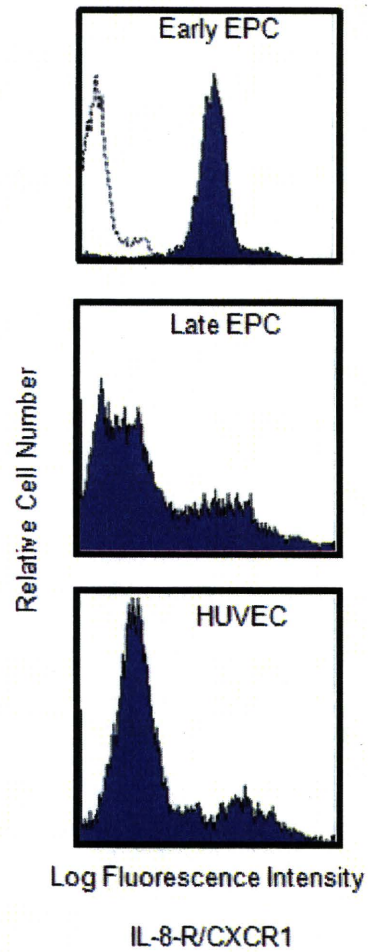


図 23. EPC における IL-8 受容体の発現

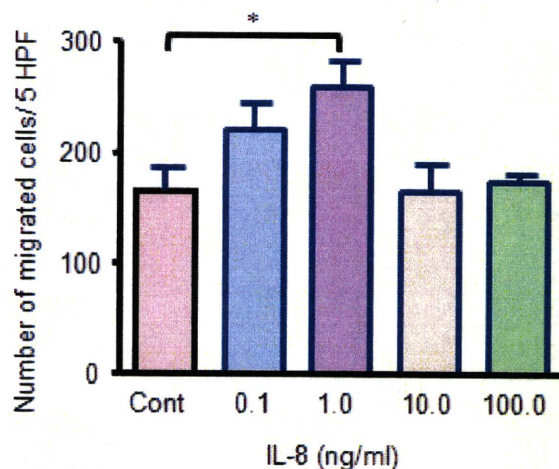


図 24. IL-8 に応答した CD14 陽性細胞の遊走

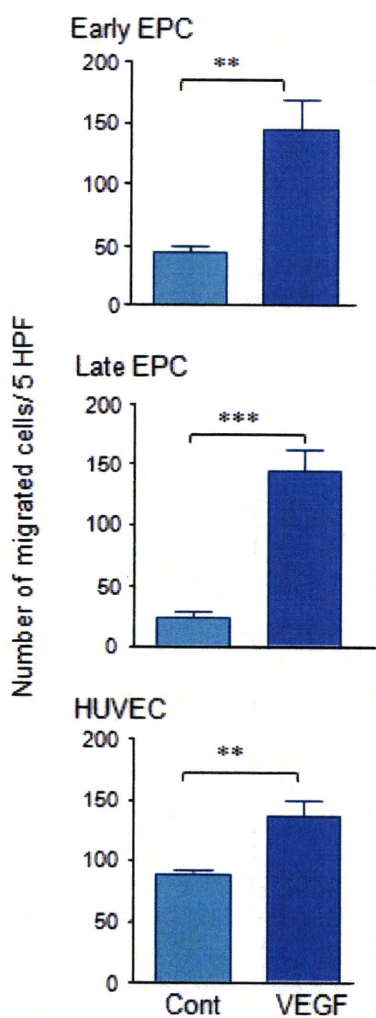


図 25. VEGF に応答した EPC の遊走

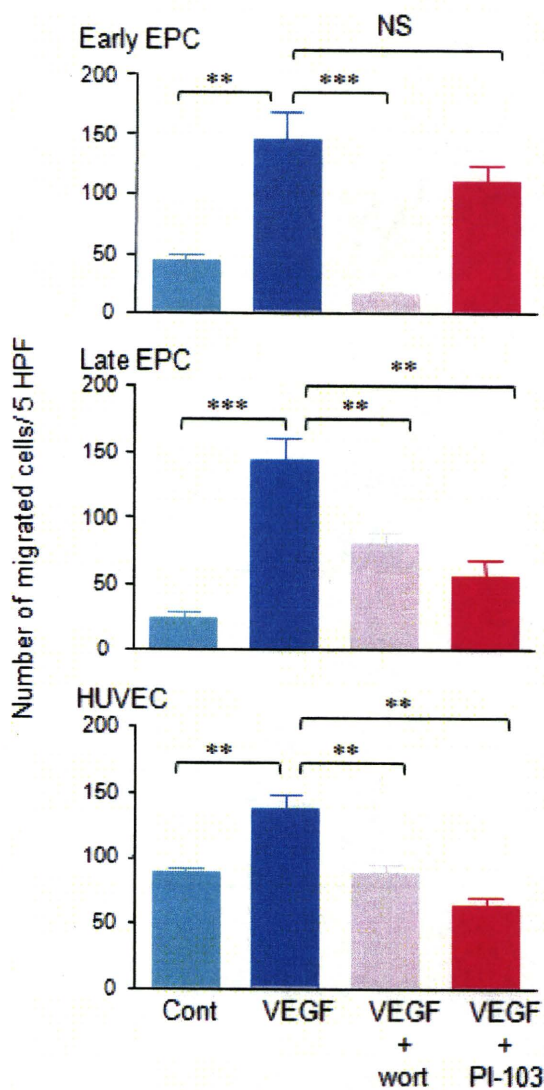


図 26. VEGF により惹起される遊走に対する PI3K 阻害剤の効果