

Mini Review

骨髄由来血管前駆細胞と血管リモデリング

佐田政隆, 永井良三

東京大学大学院医学系研究科循環器内科

Bone marrow-derived vascular progenitor cells contribute to vascular remodeling

Exuberant accumulation of smooth muscle cells plays a principal role in the pathogenesis of vascular diseases. It has been assumed that smooth muscle cells derived from the adjacent medial layer migrate, proliferate and synthesize extracellular matrix. Although a lot of effort has been devoted targeting migration and proliferation of medial smooth muscle cells, no effective therapy to prevent occlusive vascular remodeling has been established. Here, we show that bone marrow cells give rise to the majority of smooth muscle cells that contribute to arterial remodeling in models of post-angioplasty restenosis, graft vasculopathy and hyperlipidemia-induced atherosclerosis. Notably, purified hematopoietic stem cells differentiated into smooth muscle cells *in vitro* and *in vivo*. Our findings suggest that somatic stem cells contribute to pathological remodeling of remote organs. Our study provides the basis for the development of a new therapeutic strategies for vascular diseases, targeting mobilization, homing, differentiation and proliferation of bone marrow-derived vascular progenitor cells.

Rec. 9/30/2002, Acc. 10/25/2002, pp44-50

Masataka Sata, Ryoza Nagai

Department of Cardiovascular Medicine,
University of Tokyo Graduate School of Medicine**Key words** stem cell, vascular remodeling, atherosclerosis, smooth muscle cells

はじめに

従来の血管医学, 特に閉塞性血管病の病態に関する研究は, 糖尿病や高脂血症といった代謝疾患と関連して進められてきた. 一方, 血栓形成などを除いては血液学との関連はあまり重要視されていなかった. ところが, この数年の幹細胞研究の急速な発展によって, 血管のリモデリング, 再生, 新生に遠隔の幹細胞が関与することが明らかとなってきた. 本稿では, 骨髄幹細胞が血管のリモデリングに関与するという最新の知見について紹介し, 今後の研究の展望について紹介する^{1,2)}.

動脈硬化と平滑筋細胞

動脈硬化において粥腫と呼ばれる隆起物が血管内腔を狭窄する. 粥腫の中心部は脂質コアと呼ばれ, マクロファージとその泡沫化によるコレステロールなどの沈着が認められる. その周辺には平滑筋細胞が存在し, 細胞外基質やサイトカインを合成, 放出して動脈硬化の病態生理に重要な役割を担っている. この動脈硬化巣で認められる平滑筋細胞は, 筋細胞本来の「収縮型」の機能を

失い細胞外基質などを合成する能力が亢進しており「合成型」と呼ばれる³⁾.

動脈硬化による虚血疾患の治療として現在, バルーンやステントを用いた経皮的血管形成術ならびに自己の血管を用いたバイパス手術が行われているが, 血行再建した血管もある一定の確立で再狭窄, 再閉塞を生じる. 再度の治療が必要となり, 患者の予後を制限すると同時に国民医療費の増大につながっているが有効な予防法は確立していない. 再狭窄の機序は不明であるが, 合成型平滑筋細胞の過増殖による内膜増殖が主体であることが報告されている³⁾.

欧米では, 重症心疾患の治療として心臓移植が広く行われているが, 「移植後動脈硬化」とよばれる原因不明の血管病変が生じ, 再移植や死亡の原因となっている. この移植後動脈硬化症も平滑筋細胞の過増殖が原因である⁴⁾.

近接した血管中膜の平滑筋細胞が増殖するという仮説

各種血管病において平滑筋が内腔側へ蓄積する機序は不明であるが, Ross によって唱えられた仮説が広く受け入

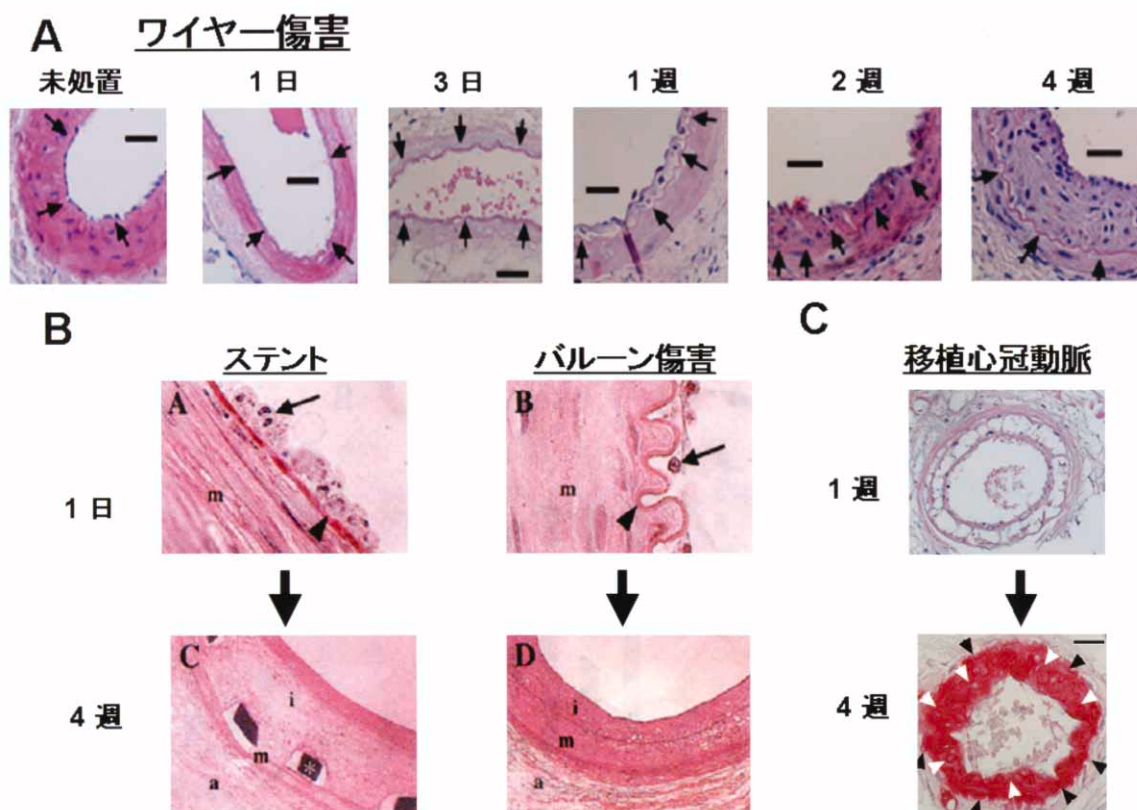


図1 Rossの仮説では説明しにくい現象

- A: マウス大腿動脈のガイドワイヤー傷害後の新生内膜形成過程。拡張傷害によって中膜のほとんどの細胞が失われる。術後一週目、中膜の平滑筋細胞群が回復していないのに、内膜が形成されている(矢印は内弾性板を示す。スケールバー25 μ m)。
- B: スtentやバルーン傷害後に平滑筋細胞の過増殖が認められる。傷害直後にみられるのは、平滑筋細胞の中膜からの遊走より炎症細胞の接着である(矢印)。
- C: 移植グラフトの冠動脈には平滑筋細胞を中心とする内膜増殖が生じる。それに先立ち蜘蛛の巣状構造物に炎症細胞が捕捉されている像が認められる(スケールバー20 μ m)。

られている⁵⁾。血管の内腔は一層の内皮細胞から覆われているが、その周りの中膜と呼ばれる平滑筋の筋肉層が囲んで補強している。中膜は収縮弛緩によって、血圧や血流を調整している。酸化脂質や免疫反応によって血管内皮が傷害されるといろいろな走化遊走因子(ケモカイン)や接着因子を発現するようになり、炎症細胞が血管壁へ浸潤する⁶⁾。そして、各種サイトカインを放出し血管局所での慢性炎症反応を惹起する。そこで、動脈硬化病変で認められる平滑筋細胞は、もともと中膜にあった平滑筋細胞が炎症をきっかけとして形質転換し、内皮下に移動して増殖したものであると考えられてきた⁶⁾。血管形成術後再狭窄や移植後動脈硬化症における内膜平滑筋細胞も同様に中膜平滑筋細胞に由来すると想定されてきた⁷⁾。

Rossの仮説では説明に苦慮する現象

Rossの仮説をもとに中膜平滑筋細胞の脱分化、遊走、増

殖を標的とした薬物療法や遺伝子治療がいろいろ考案されてきた。しかし、この仮説では説明できない点も指摘されている。第一に、正常の血管に機械的な傷害を加えるとほぼ100%平滑筋細胞から構成される新生内膜が形成される。この病変形成初期に中膜平滑筋細胞が内弾性板を超えての内腔側への遊走する現象をとらえた報告はほとんどみられない。一方、マクロファージや好中球といった血球の傷害血管への接着は必ず観察される(図1B)。移植後動脈硬化においても最初にみられるのは内皮細胞のアポトーシスやその後の炎症細胞の接着である(図1C)^{8,9)}。血管にバルーン傷害を加えると中膜平滑筋細胞がアポトーシスで一旦失われる。その後内腔側に新生内膜が形成される(図1A)。この時点では中膜の細胞成分が回復していないことがしばしば認められ、中膜平滑筋細胞が初期の新生内膜を形成するとは考えづらい¹⁰⁾。第二に、100%平滑筋細胞で構成される新生内膜がケモカインや接着因子を阻害するこ

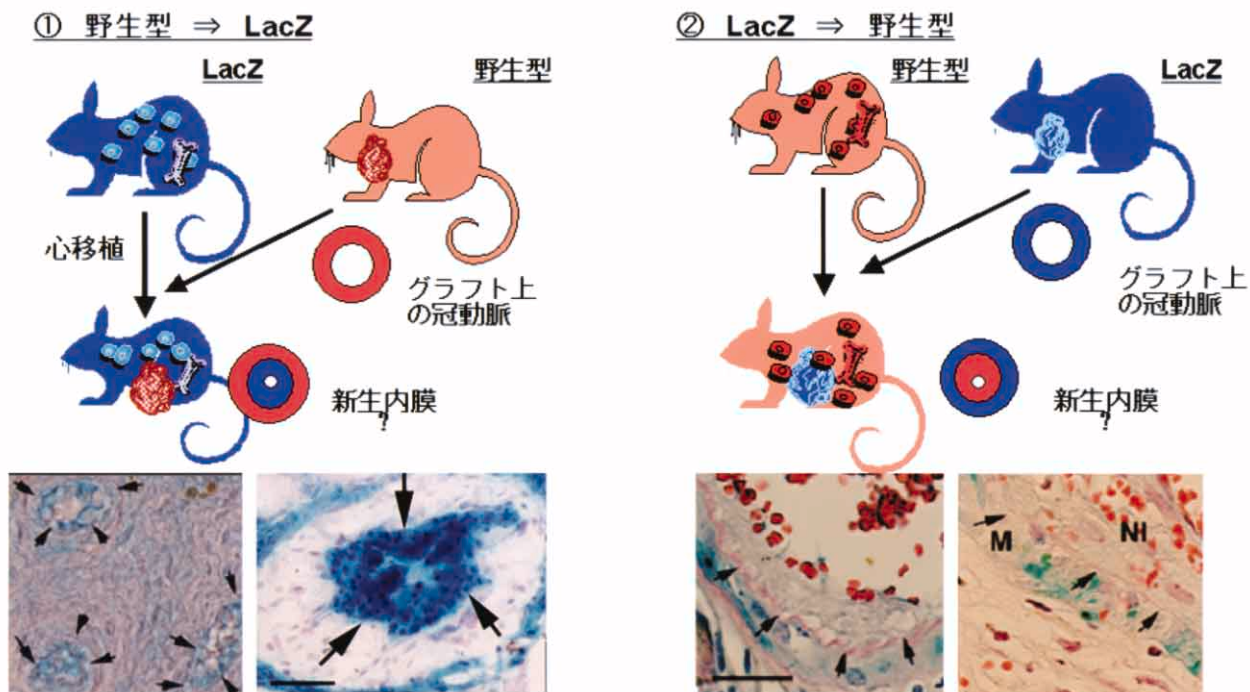


図2 レシピエント由来細胞によって形成される移植後動脈硬化（マウス心臓移植モデル）

野生型マウスの心臓がLacZマウスに移植された場合には、グラフト上の冠動脈に形成される新生内膜はLacZ陽性細胞で形成されていた(①)。逆に、LacZマウスの心臓が野生型マウスに移植された場合には、グラフト冠動脈の中膜平滑筋細胞は遊走することではなく、新生内膜はLacZ陰性のレシピエント細胞で構成されていた(②)。矢印は内弾性板を示す。NI 新生内膜, M 中膜。

とで抑制されることが報告されている^{11,12)}。ところがこれらの因子は、白血球の誘導には重要であるが、分化した平滑筋細胞には何も作用を有さない¹¹⁾。第三に、遺伝子チップなどの解析により、新生内膜の平滑筋細胞は、消化管や血管中膜の平滑筋細胞とは遺伝子発現パターンが著しく異なり、炎症細胞に酷似している^{13,14)}。

以上の所見より筆者は、内膜の平滑筋細胞の一部は中膜平滑筋の脱分化したものではなく、血球系細胞が傷害血管に定着したのち、機械的、液性因子に応答して平滑筋細胞様に分化するという仮説をもった¹⁾。

骨髄由来細胞の移植後動脈硬化への関与

まず、この仮説をマウス心臓移植モデルで検討した。まず、野生型のマウスの心臓を全身にマーカー遺伝子 LacZ (β -galactosidase, β -ガラクトシダーゼ)を発現するマウス (LacZ マウス) に移植した (図 2)²⁾。野生型のグラフト冠動脈にヒトと同様の求心性の動脈硬化が生じた。この新生内膜の 9 割以上は LacZ 陽性であった。つまりグラフト上の冠動脈の中膜を起源としたものでなく、レシピエントの血流中の細胞を起源としていることが明らかとなった。この逆に、LacZ マウスの心臓を野生型マウスに移植

した場合は、LacZ陽性の中膜平滑筋細胞は中膜に留まり、新生内膜はレシピエント由来の細胞で構成されていた。同様の現象は、性不一致個体間心臓移植後の動脈硬化病変においても、Y染色体をマーカーとした *in situ hybridization* によって確認された。この新生内膜は、平滑筋細胞に特異的なミオシン重鎖、カルポニン、h-カルデスモン、 α アクチンを発現していた¹⁾。

以上の実験結果により流血中の前駆細胞が付着することで病変が形成されることが明らかとなった。筆者らの報告のあと、ヒトの移植後動脈硬化でも同様の現象が生じていることが最近報告された^{15,16)}。

さらに、レシピエント中の平滑筋前駆細胞の起源を同定するために、野生型マウスの骨髄を致死量X線で照射しLacZ マウスもしくはGFP マウス（全身に蛍光物質 GFP (green fluorescent protein, 緑色蛍光蛋白)を発現するトランスジェニックマウス）の骨髄を移植した。骨髄、脾臓、胸腺などでは移植骨髄細胞が同定されたが、無傷の血管には骨髄細胞は定着していなかった。この骨髄移植マウスに野生型マウスの心臓を移植したところ、グラフト動脈硬化病変の8割以上の細胞は骨髄由来であった。

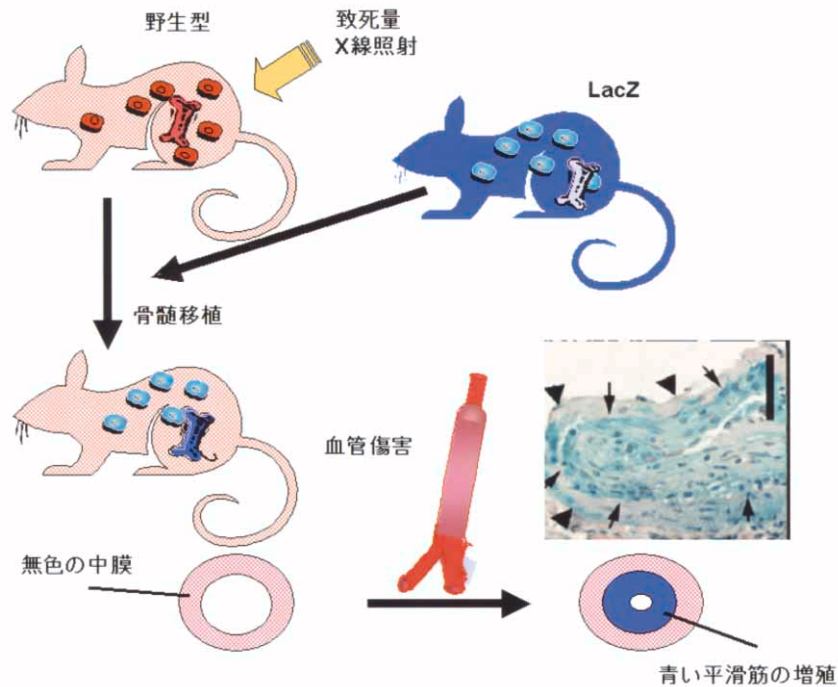


図3 血管形成術後病変形成への骨髄細胞の関与

LacZマウスの骨髄を移植した野生型マウスの大腿動脈をガイドワイヤーを用いて拡張傷害した。4週後の形成された新生内膜と一部の中膜は骨髄由来で青色であった。矢印は内弾性板、矢印頭は外弾性板を示す。スケールバー 50 μm 。

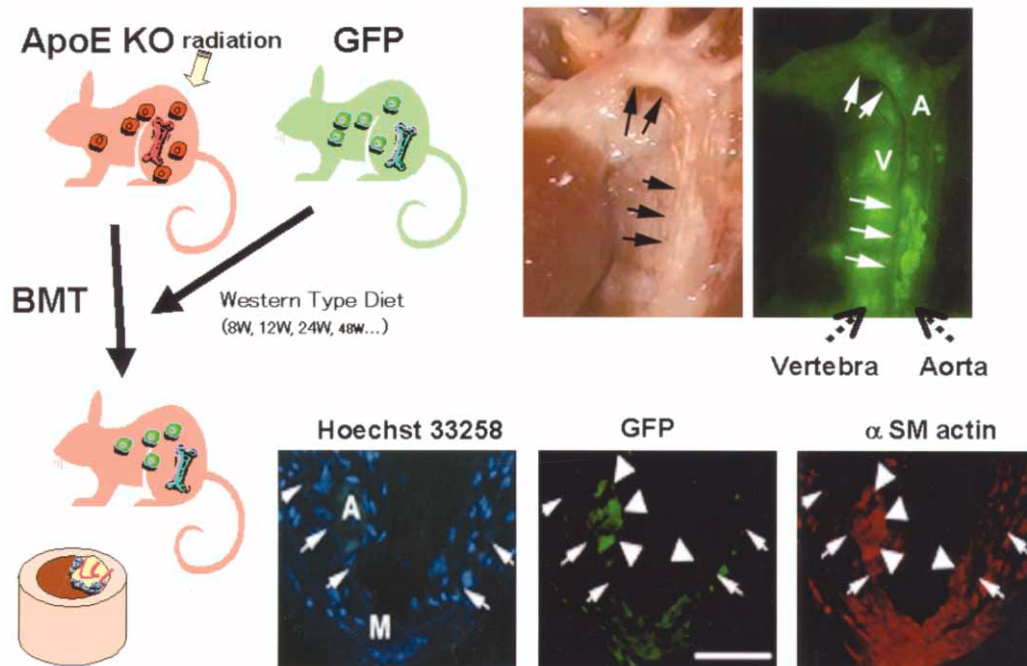


図4 高脂血症性動脈硬化病変にみられる平滑筋細胞の起源

緑色マウスの骨髄を高脂血症マウスへ移植した。動脈硬化の部位に一致して骨髄細胞が血管に取り込まれていた。切片では骨髄由来の GFP 陽性平滑筋細胞が認められた。

血管形成術後の内膜肥厚、再生内皮への骨髄細胞の関与

次に、筆者らは野生型マウスの骨髄をLacZマウスの骨髄で置換したのち、大腿動脈にワイヤーを挿入し、内皮の剥離と血管の拡張を行った(図3)。傷害後4週後に形成された新生内膜の大部分と中膜の一部は骨髄由来のLacZ陽性細胞で構成されていた。注目すべきことには再内皮化された内皮細胞も骨髄由来のものが大部分をしめていた。

以上より、流血中に骨髄由来「血管前駆細胞」が存在し、血管形成術後の再狭窄部の平滑筋細胞や再生内皮細胞へも分化していることが明らかになった。

粥状動脈硬化病変への骨髄細胞の関与

さらに、通常の動脈硬化(粥状動脈硬化)巣における平滑筋細胞の起源について探索した。アポE欠損マウスでは著明な高脂血症を来し、ヒトと同様の動脈硬化が生じる。動脈硬化の生じていない8週例において、アポE欠損マウスの骨髄をLacZマウスもしくはGFPマウスのものと置換した(図4)。20週令で大腿動脈に形成された粥腫の周辺部には平滑筋細胞が認められたが、その半数は移植された骨髄細胞由来のものであった。この骨髄由来平滑筋細胞は、各種の平滑筋細胞のマーカーを発現していた。電子顕微鏡による形態観察では、「合成型」平滑筋細胞に特異的な分泌顆粒の存在と筋線維成分の減少を認めた。

造血幹細胞から平滑筋細胞への分化

近年、骨髄中には神経、肝臓、骨、内皮、心臓といった様々な臓器への分化能を有する成体幹細胞が存在することが報告されている¹⁷⁾。従来、骨髄幹細胞は血球系へ分化する造血幹細胞と骨、軟骨、筋肉などに分化する間葉系幹細胞に分類されていた。ところが最近の知見によると、「造血」幹細胞の潜在分化能力は考えられた以上に大きく、肝細胞や心筋細胞への分化能も有することが明らかになっている¹⁸⁻²¹⁾。

筆者らは、GFPマウスから造血幹細胞(Lin⁻, Sca-1⁺, c-Kit⁺)分画を分離した¹⁾。この細胞をラット血管平滑筋細胞上で培養したところ、平滑筋細胞様の形態を示し、 α 平滑筋型アクチン、カルボニンの発現を認めた¹⁾。さらに、致死量照射したマウスに純化した造血幹細胞移植を行った。大腿動脈にワイヤーによる傷害を加えたところ、新生内膜の中膜平滑筋細胞の半数近くは移植した造血幹細胞由来であった¹⁾。また、再生した内皮の大半は移植した造血幹細胞由来であった。つまり、造血幹細胞が平滑筋細胞と内皮細胞に分化し血管リモデリングに重要な役割を演じることが明らかとなった。

骨髄細胞関与のモデルによる相違

以上のように私たちは、骨髄、特に造血幹細胞が血管病の病変形成に重要であることを報告した。ところが最近、血管移植モデルにおける病変部平滑筋細胞はレシピエント由来であるものの、骨髄以外の前駆細胞を起源にすると報告された²²⁾。各種の機械的血管障害モデルを用いた私たちの実験でも、平滑筋主体の同様の病変でも骨髄細胞の関与に大きな相違があることが明らかとなっている。血管移植モデルでは免疫抑制剤は使用されておらず、大動脈の移植後病変である。移植心の最小血管に生じる移植後冠動脈病変とは病理学的にも大きな違いがみられる。このため、レシピエントの骨髄由来平滑筋細胞が病変でわずか10%しか認められなかったと考えられる²²⁾。

一方、最近造血幹細胞が他系統の細胞に形質転換分化することは非常に稀であると報告された²³⁾。この論文で筆者らは一個の造血幹細胞によって骨髄を置換したマウスを用いていろいろな臓器を無傷害の状態で検索している。そして、造血幹細胞由来の細胞がほとんど認められていないと報告している。しかし、ターンオーバーの盛んな血液系細胞に比して実質臓器細胞の寿命は通常長い。遠隔の幹細胞が定着して分化する確率が低いのは当然である。実際、強い傷害を加えた場合に、効率に骨髄由来細胞の筋肉や消化管上皮の組織修復への関与が認められる^{24,25)}。

以上のように、モデルによっては成体幹細胞の可塑性を過小評価して全く異なる結論に達する可能性があり注意を要する。

血管病における細胞蓄積に関する新しい仮説

ある臓器のリモデリングは局所実質細胞の増殖と細胞死によると従来考えられてきた。ところが、体内には骨髄をはじめとしている臓器に幹細胞が存在し、遠隔臓器の損傷を感知して、動員分化増殖して、修復に関与していることが明らかになりつつある^{18,19)}。血管に関しても、免疫学的、機械的、液性(サイトカインや酸化脂質)傷害が血管に加わると骨髄から未分化細胞が動員され、傷害血管に定着して平滑筋ないし内皮細胞に分化しようと考えられる(図5)²⁶⁾。そして、その修復反応が過剰になると病変形成にも関与すると思われる。

おわりに

「平滑筋前駆細胞」がどのような性質の細胞であるのか、どのように骨髄から動員されるのか、どのように血管壁に定着し分化、増殖するのかについて今後研究が発展すると思われる。平滑筋前駆細胞を標的として、骨髄からの動員

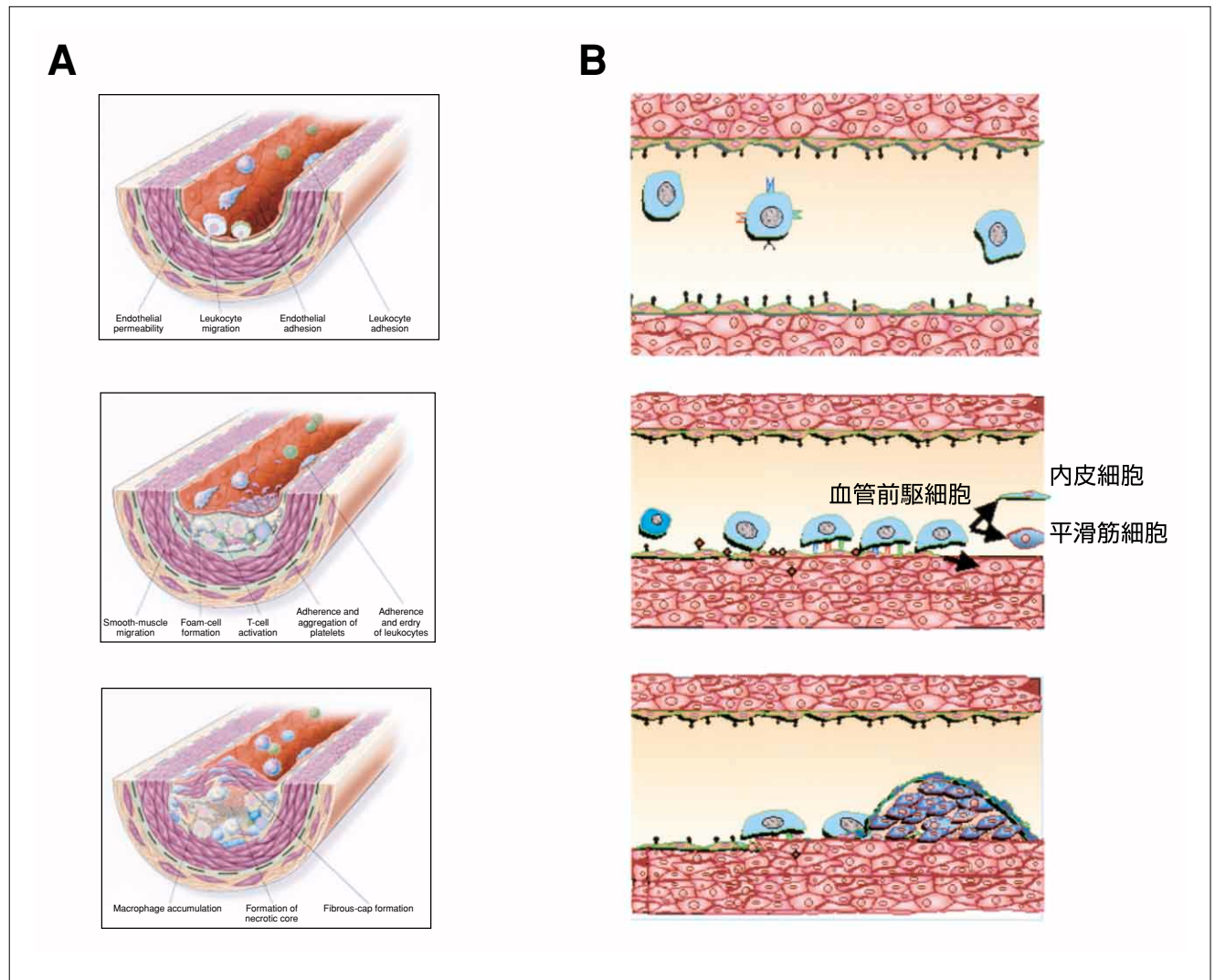


図5 動脈硬化の機序に関する新しい説

従来、動脈硬化巣でみられる平滑筋細胞は炎症細胞浸潤を契機に遊走、形質転換した中膜由来細胞であると考えられた (A)。筆者らの実験結果によると、血管が傷害されると未分化細胞が血管前駆細胞として骨髄から動員されて定着し、平滑筋もしくは内皮細胞に分化して血管のリモデリングに関与すると思われる (B)。

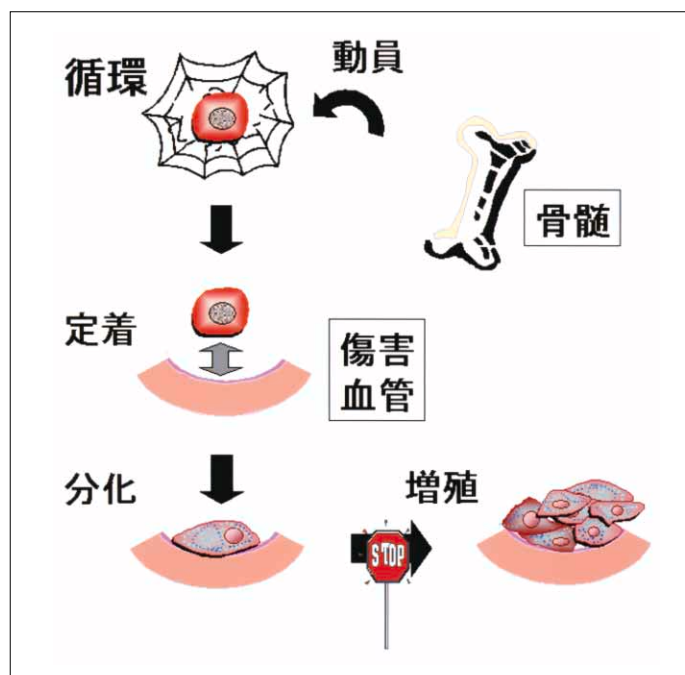


図6 平滑筋前駆細胞を標的とした血管病の治療

傷害修復のために未分化細胞が骨髄から動員され血管に定着する。平滑筋細胞に分化して増殖性血管リモデリングを生ずる。前駆細胞の動員、循環、定着、分化、増殖などへの介入が血管病克服のために有効であるかもしれない。

の抑制, 循環中の吸着, 血管への定着の抑制などが血管病の治療法として開発されることが望まれる (図6)。再狭窄の防止に薬剤溶出型ステントが期待されている。現在有効性が確認されている薬剤は, 免疫抑制剤 (ラパマイシン) と抗癌剤 (タキソール) である。これらは, 筆者ら提唱する「平滑筋前駆細胞」を標的としているのかもしれない。

一方, 骨髄幹細胞から平滑筋細胞, 内皮細胞を分化させ再構築することによって試験管内でバイオ人工血管を創生することも可能と考えられる。このバイオ人工血管は, 血栓症を生じやすいという人工素材の欠点を克服すると同時に, 成長に伴う生理的形態変化も期待でき, 特に小児で有用である。また, ヒト胚性幹細胞を用いる場合に生じる倫理的問題や免疫反応を回避することが可能である。今後, 骨髄幹細胞研究が血管病治療法の開発へ応用されることが期待される。

文 献

- 1) Sata M, et al: Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*, 8: 403-409, 2002.
- 2) Saiura A, et al: Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nat Med*, 7: 382-383, 2001.
- 3) Walsh K, et al: Molecular strategies to inhibit restenosis: modulation of the vascular myocyte phenotype. *Semin Interv Cardiol*, 1: 173-179, 1996.
- 4) Billingham ME: Cardiac transplant atherosclerosis. *Transplant Proc*, 19(4 Suppl 5): 19-25, 1987.
- 5) Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362: 801-809, 1993.
- 6) Ross R: Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340: 115-126, 1999.
- 7) Ross R: Genetically modified mice as models of transplant atherosclerosis. *Nature Med*, 2: 527-528, 1996.
- 8) Feldman LJ, et al: Differential expression of matrix metalloproteinases after stent implantation and balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit. *Circulation*, 103: 3117-3122, 2001.
- 9) Roque M, et al: Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 335-342, 2000.
- 10) Sata M, et al: A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia. *J Mol Cell Cardiol*, 32: 2097-2104, 2000.
- 11) Furukawa Y, et al: Anti-monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries. *Circ Res*, 84: 306-314, 1999.
- 12) Hayashi S, et al: Roles of P-selectin in inflammation, neointimal formation, and vascular remodeling in balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*, 102: 1710-1717, 2000.
- 13) Zohlnhofer D, et al: Gene expression profiling of human stent-induced neointima by cDNA array analysis of microscopic specimens retrieved by helix cutter atherectomy: Detection of FK506-binding protein 12 upregulation. *Circulation*, 103: 1396-1402, 2001.
- 14) Zohlnhofer D, et al: Transcriptome analysis reveals a role of interferon-gamma in human neointima formation. *Mol Cell*, 7: 1059-1069, 2001.
- 15) Grimm PC, et al: Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *N Engl J Med*, 345: 93-97, 2001.
- 16) Lagaaij EL, et al: Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet*, 357: 33-37, 2001.
- 17) McKay R: Stem cells—hype and hope. *Nature*, 406: 361-364, 2000.
- 18) Alison MR, et al: Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*, 406: 257, 2000.
- 19) Lagasse E, et al: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*, 2000: 1229-1234, 2000.
- 20) Orlic D, et al: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410: 701-705, 2001.
- 21) Orlic D, et al: Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 10344-10349, 2001.
- 22) Hu Y, et al: Smooth muscle cells in transplant atherosclerotic lesions are originated from recipients, but not bone marrow progenitor cells. *Circulation*, 106: 1834-1839, 2002.
- 23) Wagers AJ, et al: Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*, 297: 2256-2259, 2002.
- 24) Castro RF, et al: Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. *Science*, 297: 1299, 2002.
- 25) Okamoto R, et al: Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med*, 8: 1011-1017, 2002.
- 26) Yamashita J, et al: Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, 408: 92-96, 2000.