

主論文の要旨

**Therapeutic Reendothelialization by Induced
Pluripotent Stem Cells After Vascular Injury**

〔 人工多能性幹細胞を用いた、血管傷害後の再内皮化 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 循環器内科学分野

(指導：室原 豊明 教授)

山本 崇之

【諸言】

人工多能性幹細胞（iPS細胞）は、これまでの各種幹細胞と異なり何度も使用することができ、またさまざまな種類の細胞に分化誘導することが可能な細胞である。京都大学の山下らによって、さまざまな心血管系の細胞がマウスあるいはヒトiPS細胞から誘導し得ることが確認されている。われわれの研究室においても、*in vitro*の実験で血管内皮あるいは血球系細胞の初期段階のマーカーであるFlk-1の陽性細胞が、血管系の細胞に分化することを確認している。加えて、マウス下肢虚血モデルの虚血部位にFlk-1陽性細胞を移植すると、血流が回復することも確認している。

しかしながら、血管系へ分化しうるiPS細胞が、動脈硬化や血管リモデリングに対してなんらかの影響を及ぼすか否かについてはいまだ不明な点が多い。そこで今回われわれは、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞の投与が、新生内膜増殖や血管の再内皮化に対して影響を及ぼすか否か、マウス大腿動脈擦過モデルを用いて検討を行った。

【対象及び方法】

本実験ではマウス胎児線維芽細胞に山中4因子を導入して作成されたiPS細胞を使用した。白血病阻止因子（LIF）がない状態で、コラーゲンIVでコートされたディッシュ上で5日間培養することでFlk-1陽性細胞を分化誘導し、誘導されたFlk-1陽性あるいは陰性細胞のソーティングを行い、各細胞を 1×10^6 ずつ収集。新生内膜増殖への効果を見るために、これらの細胞を前日に左大腿動脈に0.38mmのワイヤーで擦過をほどこしたKSNヌードマウスに内頸静脈より経静脈的に投与。21日後に血管断面積の評価を行った。一部のマウスでは7日後にエバンスブルー染色を用いることで再内皮化について評価した。

【結果】

Figure1Aでは、コントロールとしてPBS投与を行ったマウス、Flk-1陽性細胞あるいは陰性細胞の投与を行ったマウスの代表的な大腿動脈のHE染色の写真を示している。Flk-1陽性細胞の投与を受けたマウスでは、コントロールのPBS投与群やFlk-1陰性細胞投与群と比して、血管障害後の新生内膜形成の抑制効果が見られた。定量評価でも同様の結果を認めた。中膜の面積に関して3群間で有意差を認めなかった（Figure1B）。

血管障害後の再内皮化は、新生内膜増殖の調節において重要な役割を果たしている。そこで、iPS細胞由来のFlk-1陽性細胞の投与が、血管障害後の新生内膜増殖を抑制する機序として、血管傷害後の再内皮化の関与を検討した。Figure1Cは血管傷害後7日目の血管にエバンスブルー染色を行うことで再内皮化を検討した結果である。Flk-1陽性細胞の投与を受けた群では、陰性細胞の投与群及びコントロール群と比して有意に内皮化の促進を認めた。定量評価でも同様の結果を得た（Figure1D）。さらに、血管内皮マーカーの一つであるCD31で免疫染色を行うことで再内皮化の検討を行ったところ、同様にFlk-1陽性細胞の投与群で、CD31陽性細胞が血管内腔側にて広範囲に認められた。

次に、投与されたFlk-1陽性細胞が、血管傷害後の再内皮化に直接関与しているのか

どうかを検討するために、Flk-1陽性細胞をPKHでラベルした後、マウスの内頸静脈より投与し、投与後の細胞をトレースした (Figure2A)。特に傷害血管への集積等に関しての検討を行った。蛍光顕微鏡による観察では、PKHラベルされたFlk-1陽性細胞 (赤色にて確認される部分)が傷害血管部に集積していることが確認できた。これに比し、Flk-1陰性細胞ではほとんど集積は認められなかった。また傷害を受けていない部分の血管や、対側血管でも細胞の集積は認めなかった。

次に、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞が傷害血管に集積する機序を細胞実験にて検討した。同細胞の接着能や遊走能に着目し検討を行った。CXCR-4はvascular progenitor cellのhomingにおいて重要な因子とされている。そこでフローサイトメトリーを用いて、Flk-1陽性細胞および陰性細胞のCXCR-4の発現に関して比較検討を行った。その結果、Flk-1陽性細胞では、陰性細胞に比して有意にその発現が亢進していることが確認できた (Figure2B)。リアルタイムPCRを用いた検討でも同様の結果が確認された (Figure2C)。

Flk-1陽性細胞にてCXCR-4の発現が亢進していることから、CXCR-4に関連した傷害血管へのhomingを検討するためにAdhesion assayを行った。ベースラインでのAdhesion capacityはFlk-1陽性細胞および陰性細胞の間で有意差を認めなかった。CXCR-4のリガンドであるSDF-1 α により細胞刺激を行ったところ、Flk-1陽性細胞は陰性細胞と比して接着能の亢進を認めた。この亢進効果はCXCR4の中和抗体による前処置にてキャンセルされた (Figure2D)。Trans-well migration assayにて細胞遊走能について検討を行った。ベースラインでの遊走能については2群間で変化を認めなかったが、SDF-1 α の添加によってFlk-1陽性細胞では陰性細胞と比して有意に遊走能の亢進を認めた。この効果も同様に抗CXCR4中和抗体によって打ち消された (Figure2E)。

【考察】

本研究は、iPS細胞由来のFlk1陽性細胞が、傷害血管の新生内膜増殖を抑制するという結果を示した初めての報告である。経静脈的に投与されたiPS細胞由来のFlk-1陽性細胞は、機械的に傷害された血管内腔の再内皮化を促進し、新生内膜増殖を抑制した。投与されたFlk-1陽性細胞は傷害血管部位に集積することも確認することができた。こうした結果から、Flk-1をマーカーとしたiPS細胞のソーティングは、過去に報告されてきた血管新生効果に加え、再内皮化をターゲットとした血管再生医療において有用な治療戦略の一つとなりうるものと考えられる。

過去の報告において、CXCR4は血管内皮前駆細胞のホーミングにおいて重要な役割を果たしていることが知られている。CXCR4のブロックは、血管内皮前駆細胞の傷害血管部位への集積を阻害し、逆にアデノウイルスを用いて血管内皮前駆細胞にCXCR4を高発現させると、傷害血管の再内皮化が促進されることが報告されている。CXCR4のリガンドであるSDF-1 α は傷害血管に高発現し、血管内皮前駆細胞のhomingおよび再内皮化作用に関わっている。本研究では、iPS由来のFlk-1陽性細胞がCXCR-4を高発現しているものの、Flk-1陰性細胞ではほとんどその発現が認められないことを確認することがで

きた。また投与されたiPS細胞由来Flk-1陽性細胞が傷害血管部位に集積することがin vivoの実験で確認された。in vitroの実験においては、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞が、陰性細胞と比較してより強固な接着能および遊走能を持つことが確認された。これらの結果から、SDF-1 α /CXCR-4の系はiPS細胞由来Flk-1陽性細胞の傷害血管部位への集積、さらに内皮化および新生内膜増殖抑制において重要な役割を果たしていることが考えられる。iPS細胞を用いた細胞治療において、血管ステントおよびグラフトに対するiPS細胞由来Flk-1陽性細胞のコーティングが、再内皮化を促進し、血管再狭窄や閉塞予防に寄与する可能性があると考えられる。

【結語】

iPS細胞由来Flk-1陽性細胞は、血管病治療や血管形成術後の再狭窄予防に対する有用なソースとなりうる。