

動脈硬化プラーク構成細胞の由来とその臨床的意義

佐田 政隆 平田 恭信 永井 良三

要 旨：動脈硬化，血管形成術後再狭窄，移植後動脈硬化といった増殖性血管病変において平滑筋細胞の増殖が認められる。平滑筋細胞の蓄積に関して詳細な機序は不明であり，有効な治療法は確立していない。出生時，血管は内腔を覆う一層の内皮とその周りを覆う中膜から構成される。病変部の平滑筋細胞は，中膜平滑筋細胞が形質転換し，内皮下へ遊走したものであると従来考えられていた。著者らは各種動脈硬化モデルを用いて，骨髓細胞が流血中に前駆細胞として動員されたのち傷害血管に定着し，平滑筋に分化し増殖する現象を報告した。骨髓由来血管前駆細胞が，血管病の新たな治療標的として期待されている。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003, 43: 143-147)

Key words: Stem cells, Smooth muscle cells, Differentiation, Progenitor, Endothelial cells

序 言

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，骨髓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)}。

1. 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。

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，再開塞を生じる。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。

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」と呼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。

2. 近接した血管中膜の平滑筋細胞が増殖するという仮説

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れられている³⁾。血管の内腔は一層の内皮細胞から覆われているが，その周りを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。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。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ものがすべてであると想定されてきた。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。

一方で、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見られない。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。筆者は、内膜の平滑筋細胞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、液性因子に反応して平滑筋細胞様に分化するという仮説をもった¹⁾。

3. 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。そして、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(Fig. 1)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。著者らの報告のあと、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^{4,5)}。

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, 緑色蛍光タンパク)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。

4. 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(Fig. 2)。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占めていた。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内皮化内皮細胞へも分化していることが明らかになった。

5. 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)症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きたし、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。20週令で大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(Fig. 3)。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。

6. 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、心臓といったさまざま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⁶⁾。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

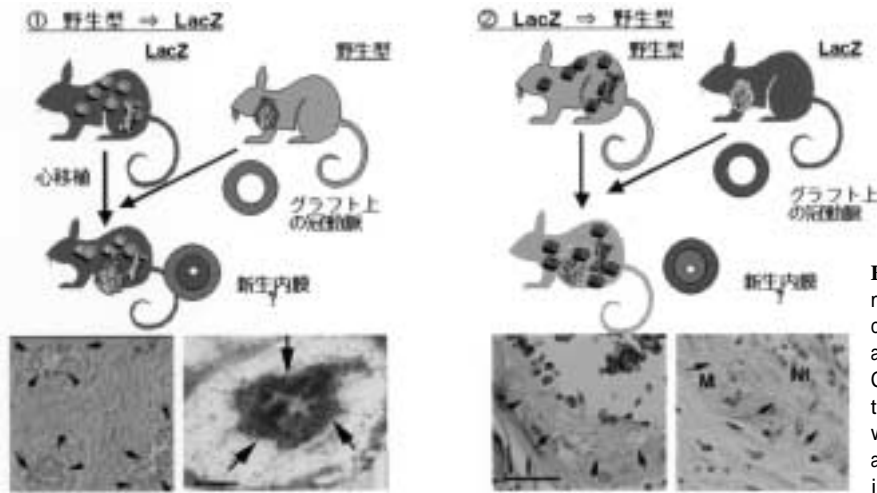


Figure 1 Detection of bone marrow-derived smooth muscle cells in transplant-associated arteriosclerosis. Cardiac allografts from wild-type mice to ROSA26 mice were harvested at four weeks and stained with X-gal. Arrows indicate internal lamina.

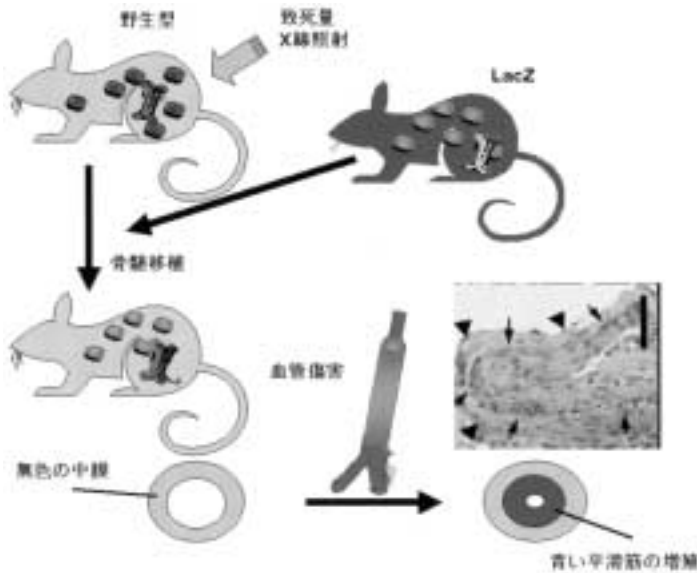


Figure 2 Contribution of bone marrow cells to healing and lesion formation after mechanical injury. Cross-sections of femoral arteries of BMT^{LacZ wild} mice. The injured artery was harvested at the indicated time points and stained with X-gal to detect LacZ-positive cells. Arrows and arrowheads indicate internal and external elastic lamina, respectively.

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⁷⁻¹⁰。著者らは、GFPマウスから造血幹細胞(Lin⁻Sca-1⁺, c-Kit⁺)分画を分離した。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。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。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。

7. 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いろいろ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、

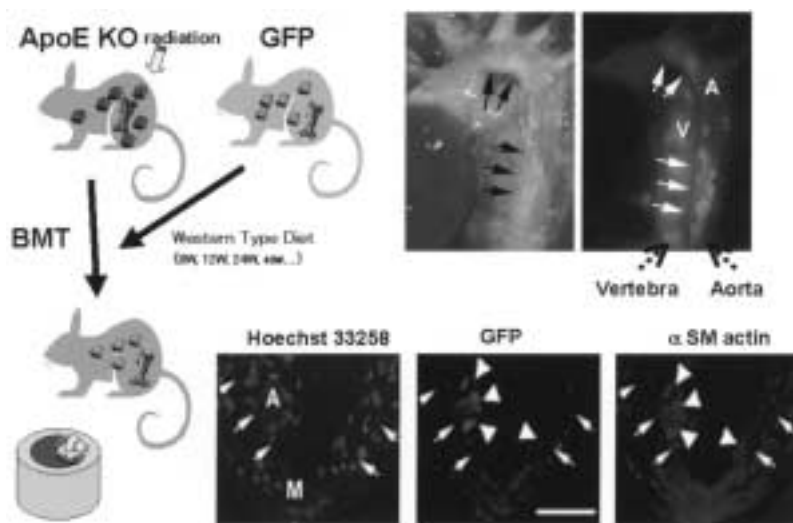


Figure 3 Bone marrow-derived smooth muscle cells detected in atherosclerotic plaques.

The bone marrow of ApoE^{-/-} mice was replaced with that of GFP-mice. After the mice had fed on a Western-type diet, the aortas were observed under a xenon fiber-optic light source. Arrows indicate atherosclerotic plaques. A: aorta; V: vertebra. Cross-sections of aorta were stained with Cy3-conjugated anti- α -smooth muscle actin antibody (red) and Hoechst 33258 (blue). Arrows indicate internal elastic lamina. Arrowheads indicate GFP-positive cells expressing α -smooth muscle actin (α -SM actin, red) in atherosclerotic lesions. Bar, 50 μ m.

修復に関与していることが明らかになりつつある^{7,8)}。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、平滑筋ないし内皮細胞に分化しうると考えられる¹¹⁾。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考えられる。

8. 血管病治療法開発への応用

「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、増殖するのに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。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(パクリタキセル)である。これらは、筆者らが提唱する「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, Saiura A, Kunisato A, et al: Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*, 2002, **8**: 403.
- 2) Saiura A, Sata M, Hirata Y, et al: Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nat Med*, 2001, **7**: 382.
- 3) Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801.
- 4) Grimm P C, Nickerson P, Jeffery J, et al: Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *N. Engl. J. Med*, 2001, **345**: 93.
- 5) Lagaaij E L, Cramer-Knijnenburg G F, van Kemenade F J, et al: Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet*, 2001, **357**: 33.
- 6) McKay R: Stem cells-hype and hope. *Nature*, 2000, **406**: 361.
- 7) Alison M R, Poulsom R, Jeffery R, et al: Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*, 2000, **406**: 257.
- 8) Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*, 2000, **2000**: 1229.
- 9) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001, **410**: 701.

10 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al: Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, **98**: 10344.

11 Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al: Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, 2000, **408**: 92.

Bone Marrow-Derived Vascular Progenitor Cells Contribute to Vascular Remodeling

Masataka Sata, Yasunobu Hirata, and Ryozo Nagai

Department of Cardiovascular Medicine, University of Tokyo Graduate School of Medicine

Key words: Stem cells, Smooth muscle cells, Differentiation, Progenitor, Endothelial cells

Active 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 much effort has been devoted to targeting the 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. Surprisingly, purified hematopoietic stem cells differentiated into smooth muscle cells *in vitro* and *in vivo*. Our findings provide evidence that somatic stem cells contribute to pathological remodeling of remote organs and are the basis for the development of new therapeutic strategies for vascular diseases, targeting mobilization, homing, differentiation, and proliferation of bone marrow-derived vascular progenitor cells.

(*J. Jpn. Coll. Angiol.*, 2003, **43**: 143-147)