

## 特集

酸化ストレスにおける  
endothelial progenitor cells の機能

今西敏雄\*

## はじめに

血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells: EPCs) とは、未分化で分化能・増殖能に富み、血管内皮へ分化し始めた細胞 (血管の幹細胞) である。1997 年浅原ら<sup>1)</sup>により成人の末梢血から初めて EPCs が CD34 陽性細胞として発見されて以来、EPCs の生物学的動態に関する研究が進み、今日では EPCs の臨床的重要性が深く認識されている。最近では、虚血性心疾患患者に対する血管内皮細胞移植治療の臨床応用が始まっている。しかしながら、この治療の対象となる患者の多くは、健常者に比して EPCs 機能が低下しており、血管再生治療の効果にも限界があると考えられる。再生医療の観点から、骨髄由来の EPCs の機能低下の病態的機序の解明および、それに対する治療法の確立が望まれる。

## EPCs の細胞生物学的特性

従来、骨髄由来血液幹細胞として認識されていた末梢血 CD34 陽性細胞は *in vivo* 内皮細胞培養系において、血管新生能や血管内皮細胞成長因子 (VEGF) に対する増殖能、遊走能を有すること、また *in vivo* 虚血動物モデルにおいて本細胞を投与すると局所血管形成部位に集積し、新生血管構築に貢献することから、生体内 EPCs の存在<sup>2)</sup>が明らかになった。

未分化 EPCs は、VEGF などの血管形成局所から産生されるケモカイン因子により骨髄から動員され局所に到達し、接着、遊走、さらには増殖、分化を遂げ局所血管内皮細胞と協調して血管形成

に貢献する (図1)。

EPCs は心血管イベントを予測するバイオマーカーである

Hill ら<sup>2)</sup>は冠動脈疾患の既往のない 45 人の男性 (平均年齢 50 歳) の末梢血単核球細胞培養法による EPCs コロニー形成数と、冠動脈硬化の危険因子 (framingham risk score: FRS) および前腕の反応性充血による動脈の内皮機能 (flow-mediated dilation: FMD) との関連を調べた。その結果、末梢血の EPCs コロニー数は FRS の程度と有意な負の相関を呈した。また末梢血の EPCs コロニー数と FMD には有意な正の相関を認めた。以上のことは循環血中の EPCs 数が粥状動脈硬化リスクと関連していること、危険因子の多いヒトでは EPCs の機能そのものが低下していることを示している。次に循環血中の EPCs 数は心血管イベントにどのように関連するかが临床上、重要である。Werner ら<sup>3)</sup>は、507 人の冠動脈疾患を対象に、末梢血中の EPCs を CD34<sup>+</sup>Flk-1<sup>+</sup>細胞としてフローサイトメトリーで測定した。EPC 数に応じて Group 1~3 の 3 群に分類し、心血管イベントとの関連を検討した。その結果、研究開始時の末梢血中の EPC 数が多い人ほど、心血管イベントは少なかった。この研究の結果、末梢血中の EPCs 細胞の数は、将来の心血管イベントを予測できる優れたバイオマーカーである可能性が示唆された。

EPCs 移植による血管再生療法の現状およびその問題点

EPCs の細胞生物学的特性を基盤に、従来の投薬治療による改善が望めない心血管系虚血性疾患を

\*和歌山県立医科大学循環器内科

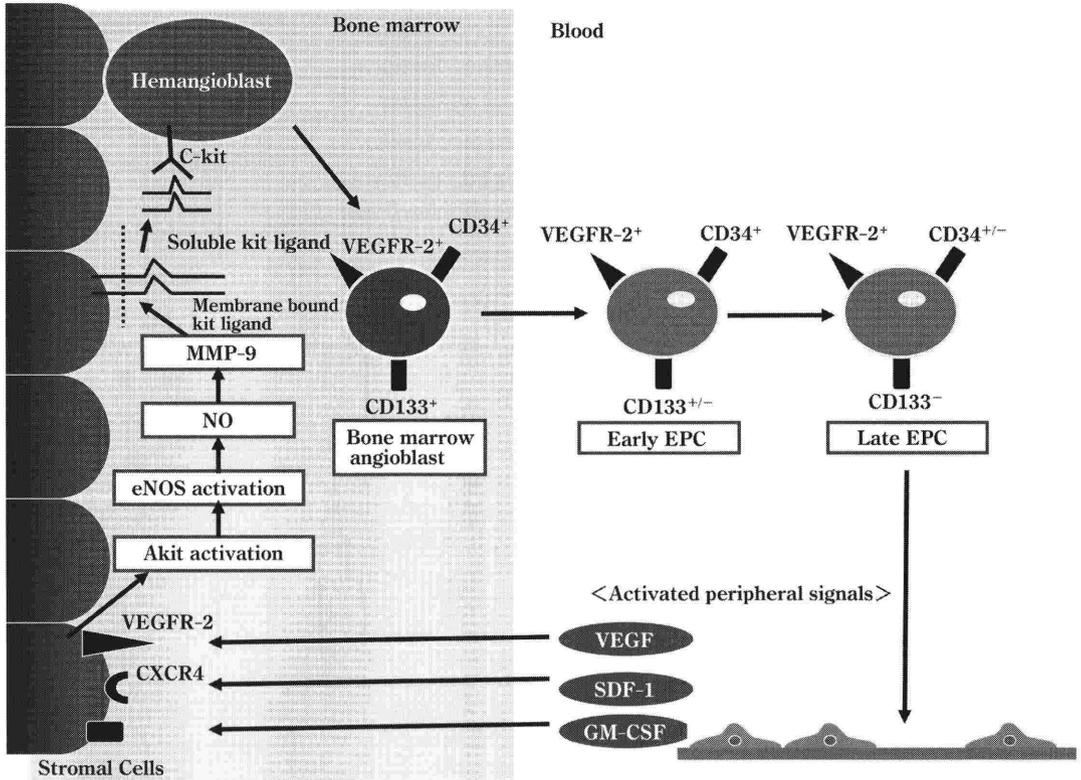


図1 血管内皮前駆細胞の骨髄からの遊走・分化

組織傷害により vascular endothelial growth factor (VEGF), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) などのサイトカインが産生され、骨髄にシグナルを伝達する。このため、Akt/NO pathway を介して MMP-9 の活性化が起こる。MMP-9 は膜結合型 kit-ligand を可溶型 kit-ligand に変換させる。可溶型 kit-ligand は c-kit 陽性 hemangioblast に作用し、骨髄ニッチから遊離させ、EPCs の前駆細胞を産生させる。循環血中へ遊走された EPCs はさらに分化し組織血流の改善および組織修復が行われる。

対象として EPCs 移植による血管再生療法<sup>4)</sup>が施行されている。

血管形成に伴う未分化 EPCs を病変局所へ移植し、EPCs の増殖能・分化能を利用し、積極的に機能的血管形成を促進することで局所血流を改善し組織機能を回復させることが目標となる。この EPCs による血管再生療法の問題点は、症例ごとに有効性に差違がみられる点である。これは、生活習慣病を基礎疾患にもつ患者において、冠危険因子である糖尿病、喫煙、高脂血症、肥満といった酸化ストレスや慢性炎症の環境下では、骨髄から EPCs の動員が減少していること、また EPCs 自体の機能が低下していることが原因と考えられる。

我々はこれらの EPCs の質および量の低下に細胞老化 (senescence) が関与すると考え、研究を進めてきた。

### EPCs の細胞老化

#### A. 高血圧症

Vasa ら<sup>5)</sup>は、高血圧症患者において末梢血 EPCs の数に有意な変化を認めなかったが、培養実験において有意な遊走能の低下を認めたと報告している。我々は、遺伝的高血圧ラットや実験的高血圧モデルラットの末梢血より培養した EPCs では、対照群に比べてテロメラーゼ活性の低下と senescence (細胞老化) が進行していることを明らかにした<sup>6)</sup>。また臨床研究において、本態性高血圧患者の末梢血から EPCs を培養すると、臓器障害の程度に比例してテロメラーゼ活性の低下および senescence の割合の増加がみられた<sup>6)</sup>。一方、過去の研究<sup>5)</sup>と一致して、高血圧と末梢血 EPCs 数との間に関連を認めなかった。これは、テロメラーゼ活性

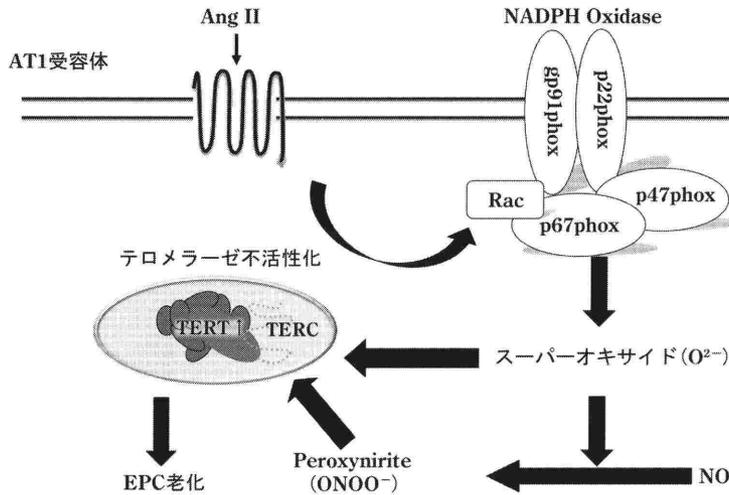


図2 Angiotensin IIによるEPCs老化的機序

Angiotensin II (Ang II) は AT<sub>1</sub> 受容体を介して、血管における最も重要な酸化ストレス産生系である NADPH oxidase を活性化し、スーパーオキシドを産生する。スーパーオキシドはテロメラーゼ活性を不活性化し、EPCs 老化を促進する。

の低下と senescence の進行を考慮すると、血管内皮の turn over 亢進に伴う、EPCs 消費の増加がマスクされている可能性も考えられた。

### B. Angiotensin II・高血糖・酸化 LDL

我々は、angiotensin II (Ang II) は細胞内の酸化ストレスを高め、EPCs の細胞老化 (premature senescence) を促進することを明らかにした (図2)<sup>7)</sup>。健康者由来の EPCs を Ang II により刺激すると、濃度依存性にテロメラーゼ活性が低下し、細胞老化 (acidic  $\beta$ -galactosidase staining で評価) の割合が増加した。この Ang II 誘導による EPC の細胞老化の機序として、酸化ストレスの関与が示唆された。すなわち、EPC は Ang II により刺激されると、活性酸素種の合成系の一つである NADPH の構成要素の一つである gp91phox mRNA および蛋白の発現は増強した。一方、その増強効果は AT<sub>1</sub> 受容体拮抗剤 (Valsartan) または抗酸化剤 (tempol) により、抑制された。また、酸化 LDL<sup>8)</sup> および高血糖<sup>9)</sup> は Ang II と同様に、酸化ストレスの増強を介して EPCs の細胞老化を促進した。以上より、酸化ストレスは EPC のテロメラーゼ活性の低下を介して、細胞老化を促進する可能性が示唆された。

酸化ストレス改善作用薬、因子による EPCs 増幅分化・誘導

酸化ストレスや慢性炎症は、EPCs の骨髄からの

動員、局所における血管形成に貢献する細胞特性に細胞老化を介して抑制的に作用する (図3)。したがって薬物療法等による EPCs 増殖分化能の改善効果が期待される (図4)。

### A. HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン)

HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン) は、PI3 キナーゼ/Akt 経路を介しての eNOS の発現を上昇させ EPCs の増幅分化を促進させる。またスタチンはフォークヘッド転写因子の FOXO4/Bim 経路の不活性化を通じて酸化ストレスを抑制すると報告<sup>10)</sup>されている。スタチンの有効性は臨床研究においても証明されている。TOPCARE-AMI 研究において、培養下でアトロバスタチンを作用させた EPCs は無処置の EPCs に比し、より有効な血管再生効果が得られたと報告<sup>11)</sup>されている。

### B. ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体

#### — $\gamma$ 作動薬 (PPAR $\gamma$ agonist)

PPAR $\gamma$  agonist であるピオグリタゾン<sup>12)</sup> は、PI3 キナーゼ/Akt 経路を介して eNOS 発現を上昇させ、NADPH オキシダーゼ活性を抑制し EPCs の増殖分化能を改善させると考えられる。

### C. Angiotensin II (Ang II)-type 1 receptor blocker (ARBs)

ARBs は血管壁のスーパーオキシド産生を低下させることが明らかにされている。Bahlmann ら<sup>13)</sup> は II 型糖尿病患者において ARBs は EPCs の数を

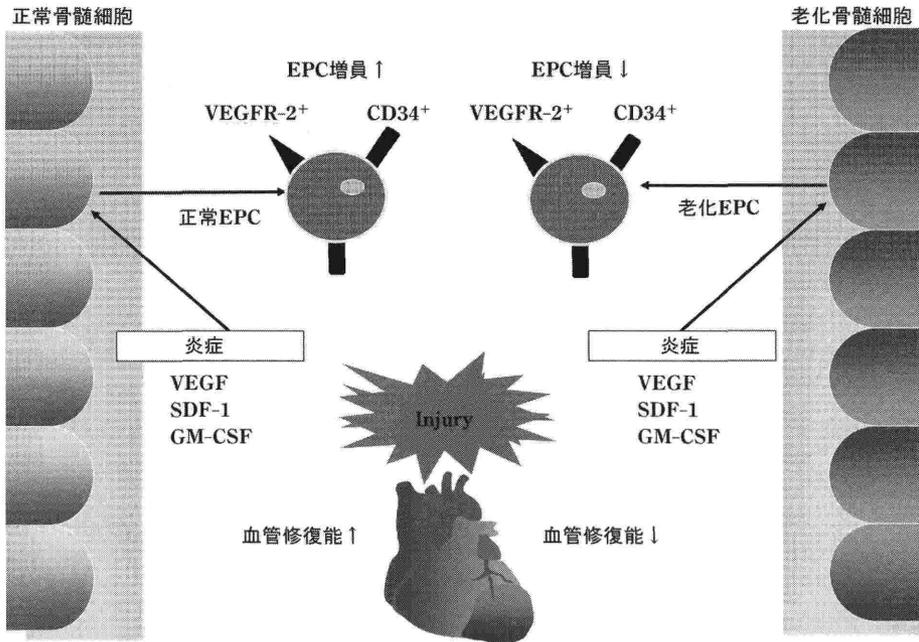


図3 EPCs による血管再生療法の問題点

血管再生療法を必要とする患者では、動脈硬化危険因子の集積がみられる。その際、EPCsの産生のある場である骨髄の老化およびEPCsの老化により血管修復能の低下が起こる。

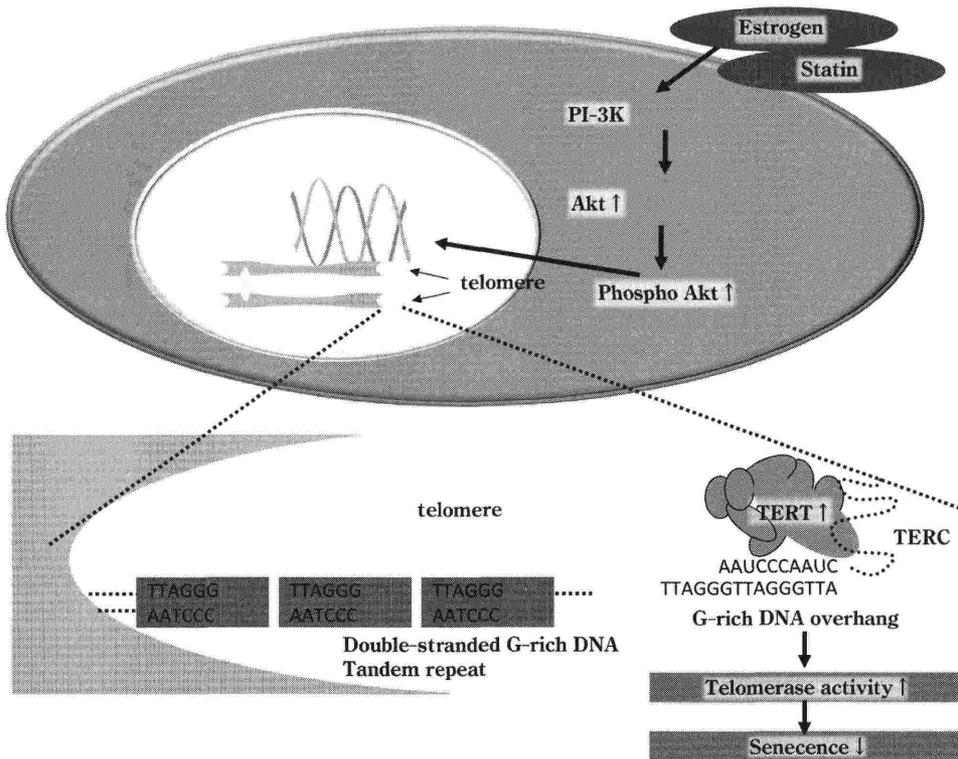


図4 EPCsの細胞老化抑制

スタチンやエストロゲンはPI-3/Aktシグナル伝達系の活性化を介して、テロメラーゼ活性を亢進し、EPCsの細胞老化を抑制する。

増加させることを示した。我々のグループは培養実験において、Ang II により誘導される EPCs の細胞老化は ARBs (valsartan) により抑制できることを報告<sup>7)</sup>している。

#### D. エストロゲン

加齢に伴い骨髄由来の EPCs の数や機能が低下しており、血管新生能は低下する。さらに EPCs の数や機能においても性差が存在することが最近明らかになった。同年の男性に比べて、女性の方で EPCs のマーカーである CD34/KDR 陽性細胞が有意に多く、閉経後ではその差が消失する。また、エストロゲンは EPCs の産生や接着を刺激することや、女性の EPCs の血管新生能が高いことからエストロゲンの EPCs に対する作用が明確になった。

EPCs の機能には PI3 キナーゼ/Akt/eNOS の経路が中心的な役割を果たしており、EPCs の老化には reactive oxygen species (ROS) の蓄積が関係していることが示された。エストロゲンは酸化ストレスの抑制作用とテロメラーゼの活性化作用により、アンジオテンシン II の SA- $\beta$ -gal 陽性の老化 EPCs 増加を濃度依存的に抑制することを我々のグループは報告<sup>14)</sup>した。エストロゲンは PI3 キナーゼ/Akt のシグナルを介して、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) の発現を増加させ、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の分泌を促し、EPCs の増殖能を改善させた。以上のことより、エストロゲンは EPC の機能活性を増加させる可能性を有しており、EPCs を用いる細胞移植治療の際の補助手段として臨床応用が期待される。

#### おわりに

EPCs は、実臨床の場で EPCs 移植血管再生療法として利用されている。しかしながら、移植 EPCs の機能は酸化ストレスの影響により細胞老化を呈し、その機能に低下がみられる。したがって、EPCs の機能回復を目指した増幅分化誘導法の更なる進歩が期待される。

#### 文 献

1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-7.

2) Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al: Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348: 593-600.

3) Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al: Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005; 353: 999-1007.

4) Assmus B, Honold J, Zeiher AM, et al: Transcatheter transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1222-32.

5) Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al: Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; 89: E1-7.

6) Imanishi T, Moriwaki C, Hano T, et al: Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension. *J Hypertens* 2005; 23: 1831-7.

7) Imanishi T, Hano T, Nishio I: Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens* 2005; 23: 97-104.

8) Imanishi T, Hano T, Sawamura T, et al: Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31: 407-13.

9) Kuki S, Imanishi T, Kobayashi K, et al: Hyperglycemia accelerated endothelial progenitor cell senescence via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Circ J* 2006; 70: 1076-81.

10) Urbich C, Knau A, Fichtlscherer S, et al: FOXO-dependent expression of the proapoptotic protein Bim: pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells. *FASEB J* 2005; 19: 974-6.

11) Assmus B, Schächinger V, Teupe C, et al: Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106: 3009-17.

12) Werner C, Kamani CH, Gensch C, et al: The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone increases number and function of endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease and normal glucose tolerance. *Diabetes* 2007; 56: 2609-15.

13) Bahlmann FH, de Groot K, Mueller OH, et al: Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists. *Hypertension* 2005; 45: 526-9.

14) Imanishi T, Hano T, Nishio I: Estrogen reduces endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity. *J Hypertens* 2005; 23: 1699-706.