

特集

循環血流障害による血管内皮細胞脱落と progenitor cells

都 築 通 孝*, 市 川 崇*, 田 村 哲 也*
足 立 裕 史*, 松 田 直 之*

はじめに

血管内皮の機能と疾病の関連に関しては、血液凝固や出血の諸問題を念頭においた血液学や血栓形成の結果生じる臓器虚血を念頭においた循環器学といった分野において研究されてきたが、近年では炎症やその原因となっている自己免疫疾患の一部、感染の観点やそれに引き続いて生じる急性呼吸窮迫症候群や敗血症/敗血症性ショックなどの分野でも研究がされるようになった。循環器学領域では、血管内皮機能は粥状動脈硬化や血管内に留置したステントの再狭窄または血栓による再閉塞といった諸問題とともに議論されている。

特に血管内皮細胞脱落という現象に関しては動物実験を含め、報告は決して多くない¹⁻³⁾。その一方で冠動脈の血栓形成による突然死の解析にて約40%がプラークの破綻を伴わない内皮のびらんにより生じていたとする報告もあり⁴⁾、臨床的に重要なものであることが示唆される。In vitro の研究においては血管内皮細胞脱落の理由として、zymosan や IL-1 により活性化された血管内皮細胞が白血球に接触することにより生じることが示されている^{5,6)}。ラットを用いた動物実験では血管障害の後に¹⁾、ウサギを用いた動物実験ではバルーンによる血管障害に加え血管狭窄を作成した際に³⁾認められたことが報告されている。これらの結果より血管内皮細胞脱落の原因として炎症や血管障害、血流速度低下に伴う血管内皮におけるズリ応力の減少といった要素の関連が示唆されるが、特に in vivo では現時

点においてははっきりした理由が示されたとは言えない。

その一方で、血管内皮障害と progenitor cell との関連を示唆する研究が多数報告されている。内皮細胞の progenitor cell として骨髄由来細胞由来のものが報告されているが^{7,8)}、その一方で、骨髄由来細胞は内皮細胞にならないとする報告も認められる⁹⁻¹¹⁾。血管内皮障害の際の骨髄由来細胞の役割はパラクライン的に作用すると考えられているが、未だ明確ではない。

今回、我々は今まで行ってきた実験結果より、血管内皮細胞脱落が血管内皮におけるズリ応力低下と関連することが示唆されること、また、骨髄由来細胞が内皮細胞に非常になりにくいこと、敗血症ショック状態においては内皮細胞のアポトーシスやオートファジー現象が内皮細胞脱落に関連することを論じたい。

血管障害と内皮の脱落

我々の実験結果からは、血管障害より内皮の脱落の現象が生じる可能性があるが、直接的な影響というよりは血管内皮におけるズリ応力の減少により生じることが示唆された。また、血管障害と progenitor cell の関連に関しては、動脈内膜擦過モデルにおいて少なくとも骨髄由来細胞の血管内皮への変化は見られなかった。

我々はマウス総頸動脈に対し単純内膜擦過モデル(総頸動脈本幹内腔を外頸動脈の枝から挿入した経皮的冠動脈インターベンション用のガイドワイヤーで擦過する。2週間程度で再内皮化するがこのとき新生内膜肥厚の生成はない)を作成し、骨髄由来細胞が再内皮化の際に内皮細胞に変化するか

*名古屋大学大学院医学系研究科救急・集中治療医学分野

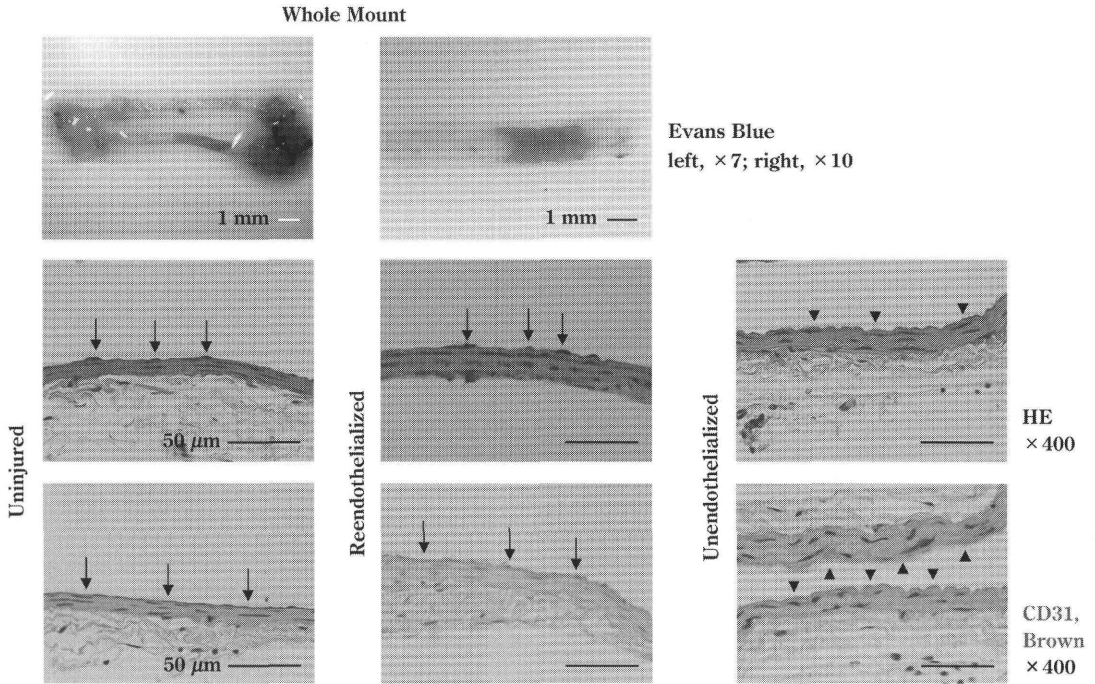
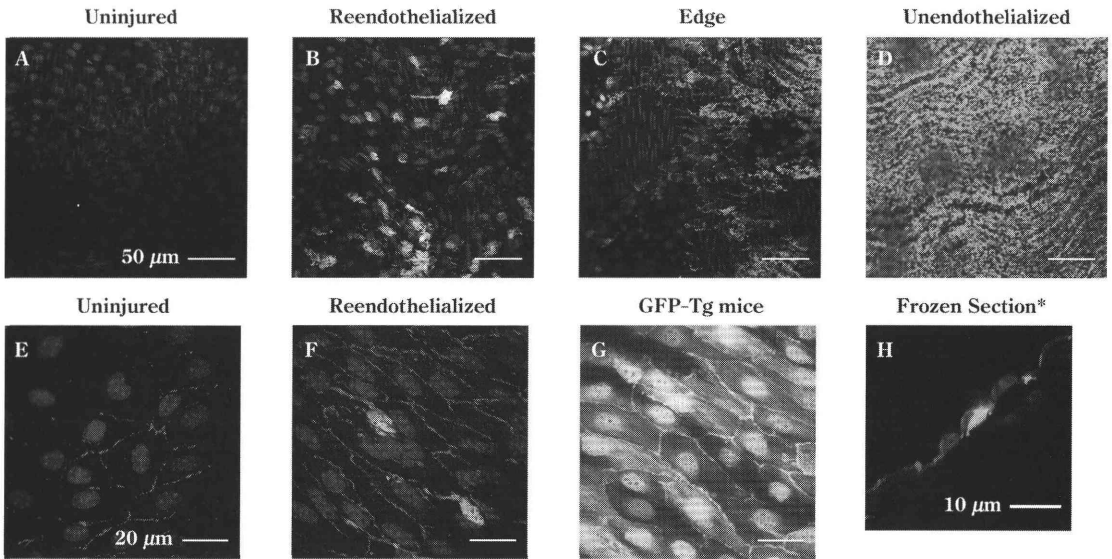


図1 総頸動脈単純内膜擦過モデル, 術後7日¹²⁾
矢印(↓): 内皮細胞, 矢印の頭(▼): 内皮の欠損.



Red, CD31; Green, GFP; Blue, TO-PRO 3(nuclear stain).

* The sections were made after anti-mouse CD31 antibody was applied.

図2 骨髄移植マウスを用いた総頸動脈単純内膜擦過モデル, 術後7日¹²⁾
Whole-mount CD31 染色.

どうか検討した¹²⁾. 術後7日では一部再内皮化が生じていない部分があるが, 再内皮化したところでは新生内膜は見られなかった(図1). 次に,

green fluorescent protein(GFP)トランスジェニックマウス骨髄細胞を用いた骨髄移植モデルマウスを用い単純内皮擦過モデルを作成したが, 図2Gの

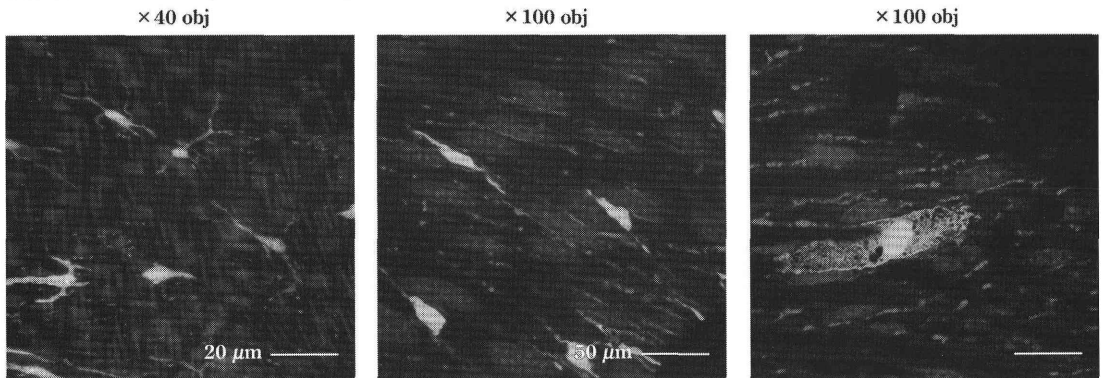
GFP トランスジェニックマウス内皮細胞のような骨髄由来 GFP 陽性である血管内皮細胞は見つけることができなかつた(図2B, F). その一方, 血管内膜下に内皮細胞とは形態の明らかに異なる GFP 陽性の樹状細胞様細胞が見られた(図2B, F, H). また, 再内皮化されていない部分では GFP 陽性の血小板の様な付着が見られた(図2D).

また, 新生内膜が生じる擦過モデル(大腿動脈単純内膜擦過モデル)を用い¹³⁾, より障害の強いモデルにて骨髄由来細胞が内皮細胞に変化するか検討した. このモデルにおいても GFP 陽性の内皮細胞は認められず, GFP 陽性の樹状細胞様細胞の浸潤が見られた(図3). 一見内皮のように見える GFP 陽性細胞も見られたが, 内皮細胞に特有な CD31 の染色像は見られなかつた(図3上段右).

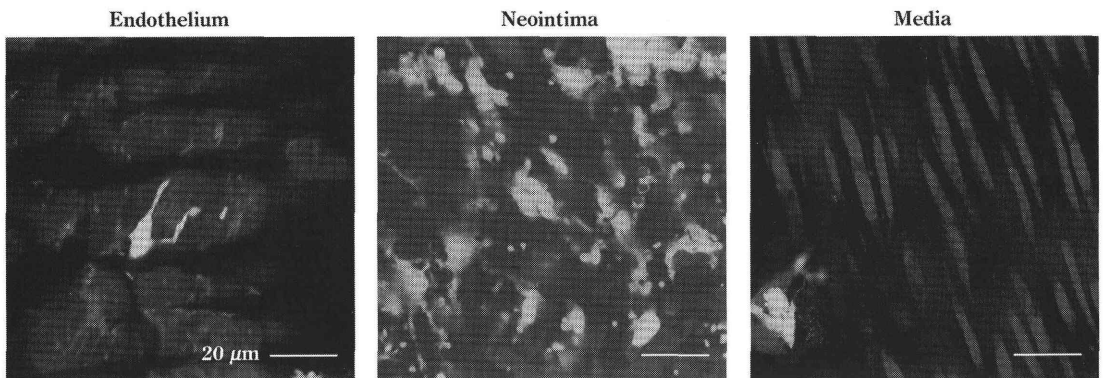
その一方で, 内皮細胞脱落現象はいずれの擦過モデルでも見られた. 総頸動脈単純内膜擦過モデル

では外頸動脈起始部外側¹²⁾に(図4上段, 5), 大腿動脈モデルでは術後 1 週間程度で大腿動脈中央部に見られた(図6). 総頸動脈モデルではシャム手術マウスでも同様の所見が見られたため(図4下段), 血管結紮による血流速低下→ずり応力の低下の影響が示唆された. 内皮細胞脱落部に一致して内皮下に細胞の集簇および樹状細胞に見られる S100 の発現が確認された(図5). 前述の骨髄由来 GFP 陽性樹状細胞様細胞が障害血管のみならず, 血管分岐部¹²⁾や血管のバンデージ等の血流速低下モデル(未発表データ)でも内皮下に集まることが観察されたため樹状細胞様細胞の集簇に内皮細胞におけるずり応力の低下との関連が示唆された. 大腿動脈においては内皮細胞脱落現象の見られた部位と新生内膜生成部位とがほぼ一致することから(未発表データ), 内皮細胞脱落現象と新生内膜生成とは関連があることが示唆された.

Reendothelialized area, neointima (-)



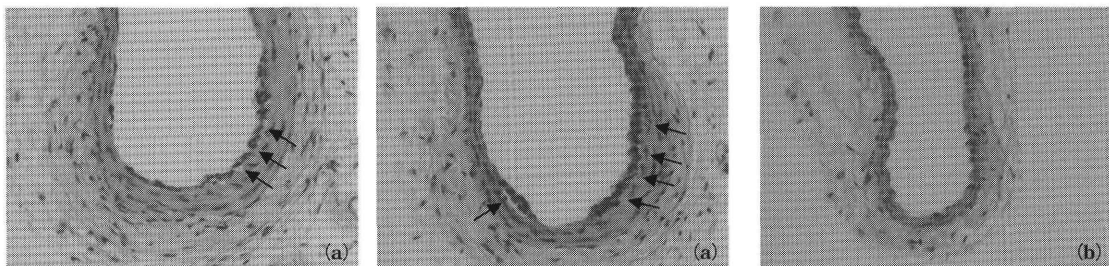
Neointimal lesion (×100 obj)



Red, CD31; Green, GFP; Blue, TO-PRO 3 (nuclear stain).

図3 骨髄移植マウスを用いた大腿動脈単純内膜擦過モデル, 術後 28 日
Whole-mount CD31 染色.

Reendothelialized area, HE, ×400



Sham-operated ECA, HE, ×400

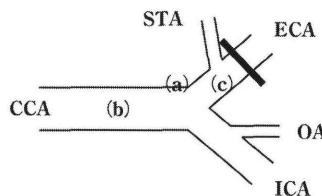
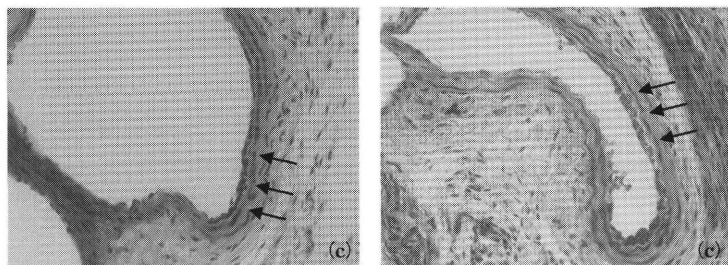
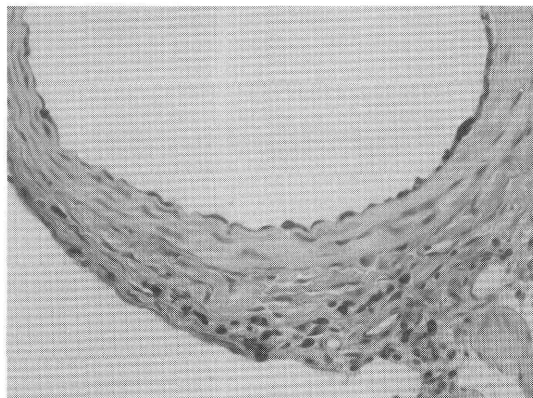


図4 総頸動脈単純内膜擦過モデル(上段)およびシャム手術(下段), 術後 14 日
矢印は内膜の脱落.



S100, paraffin section, ×400

図5 総頸動脈単純内膜擦過モデル, 術後 7 日
S100 免疫染色.

敗血症と内皮の脱落

敗血症における内皮の脱落に関しては, まず我々の実験から, 炎症性サイトカインに対する内皮細胞のアポトーシス, オートファジーといった反応との関連が示唆された.

我々は敗血症モデルとして盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture: CLP) モデル¹⁴⁾を用いて研究を進めてきた(図7左). このモデルでは敗血症により

血管の NF- κ B が活性化され, NF- κ B デコイオリゴデオキシヌクレオチドを導入することによりマウスの生存率が改善されたことが示されている(図7右, 9左). 同様に, caspase-3 および -8 が大動脈血管内皮において活性化されており, これらに対する siRNA を投与することにより生存率が改善されたので¹⁵⁾, 内皮のアポトーシスが敗血症のメカニズムに関与していることが示唆された. さらに Fas-associated death domain (FADD) に対する siRNA

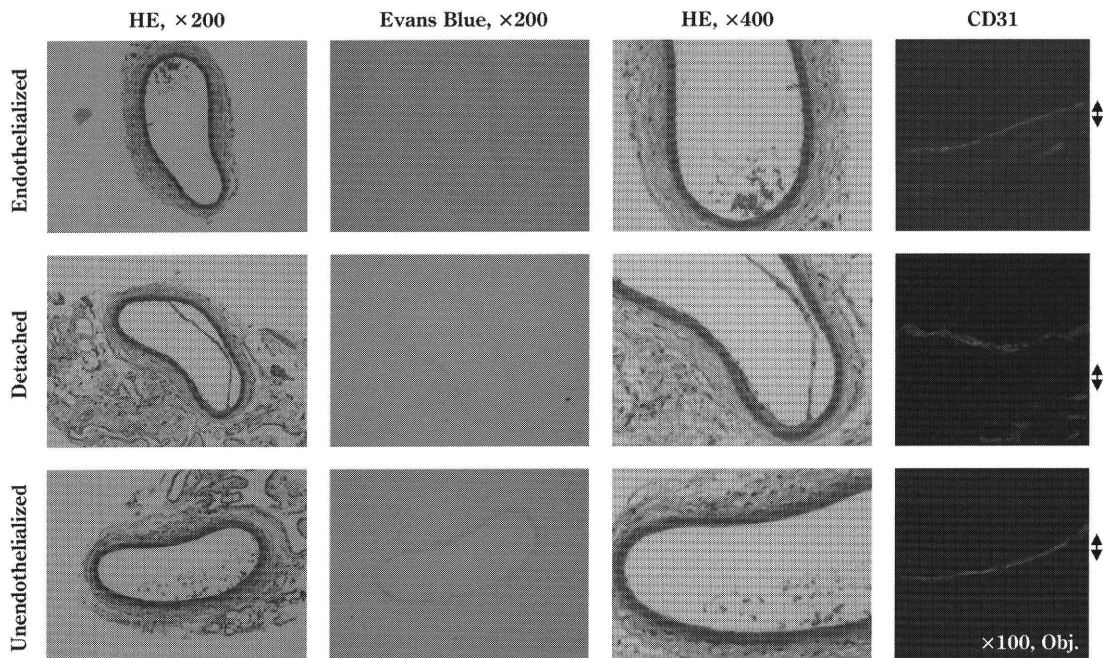


図6 大腿動脈単純内膜擦過モデル, 術後7日
矢印(↕)は内弾性板の位置.

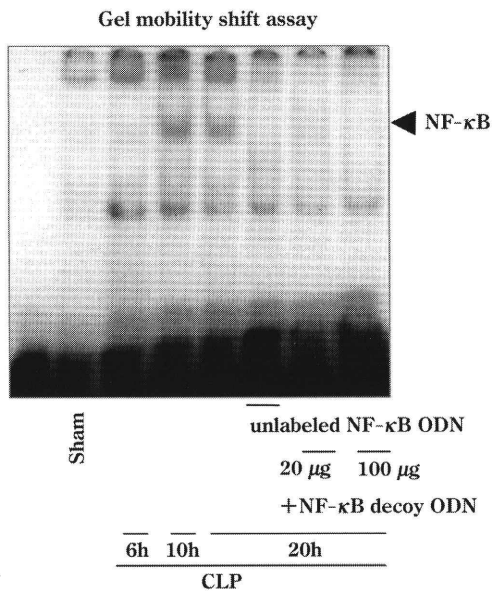
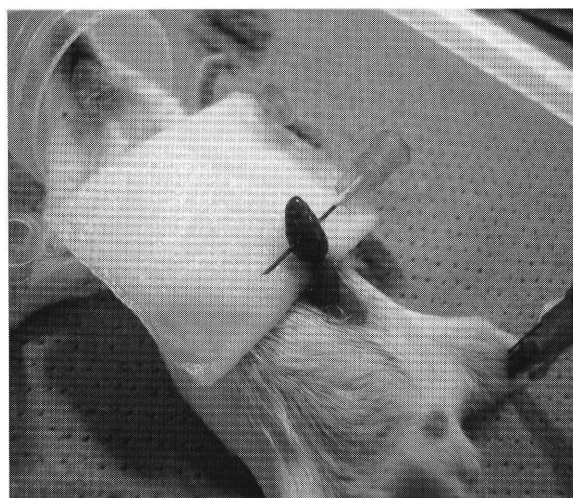


図7 盲腸結紮穿孔モデルマウス(左)および大動脈におけるNF-κBの発現(右)

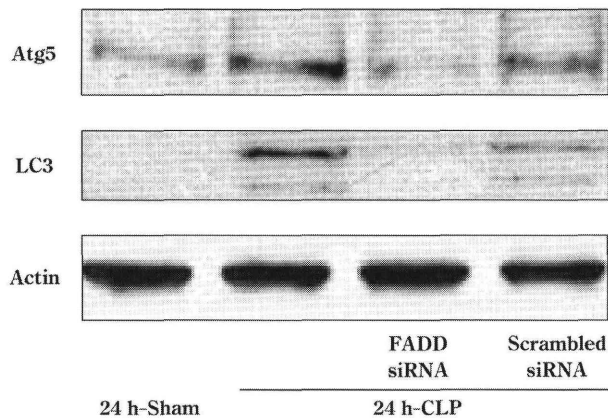


図8 大動脈における FADD を介した ATG の活性化

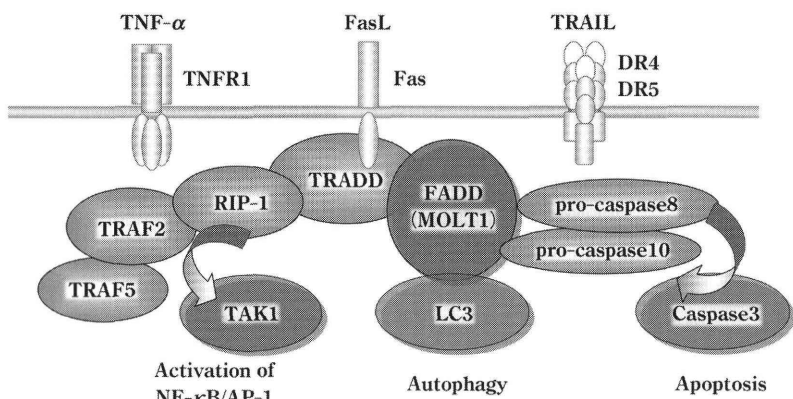


図9 炎症と内皮細胞の死

Transmission electron microscopy

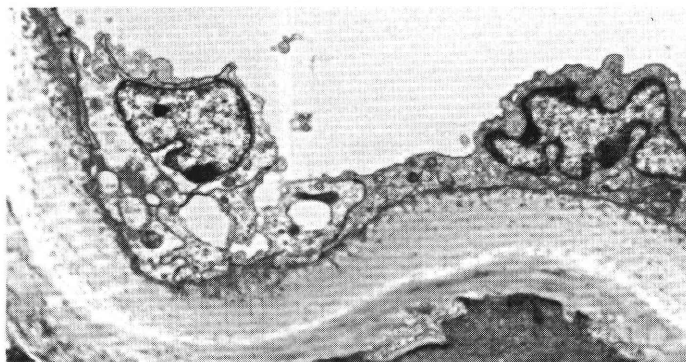


図10 盲腸結紮穿孔モデルマウス、術後 24 時間の大動脈内皮細胞、透過型電子顕微鏡所見¹⁶⁾

を投与すると内皮細胞のアポトーシスを抑える¹⁶⁾だけでなく(図9右)、LC3の活性を抑える(図8)ことによりオートファジーを抑制し(図9中)生存率が改善された。

このような実験の中で、大動脈内皮が CLP モデ

ル作成後 24 時間で基底膜より部分的に脱落することが観察された(図10)¹⁶⁾。このような現象は、caspase-3/caspase-8あるいはFADDに対するsiRNAを投与した群では認められなかった。

「循環血流障害による血管内皮細胞脱落と progenitor cells」と今後

今回の研究で我々はマウスを用いた2種類の単純内膜擦過モデルを作成し骨髄由来細胞が内皮細胞に変化するかどうか検討した。GFP トランスジェニックマウス骨髄細胞を用いた骨髄移植モデルマウスを用いたところ、内皮細胞に変化したと思われる GFP 陽性骨髄由来細胞は観察されなかった。その一方、内皮下には GFP 陽性樹状細胞様細胞の集簇を認めた。樹状細胞様細胞は血管障害のみならず内皮におけるずり応力低下部位にも集簇し、内皮細胞脱落と関連した。敗血症モデルとして CLP モデルを作成したが、caspase-3/caspase-8 もしくは FADD に対する siRNA 投与により生存率が上昇した。In vitro の実験よりこれらの siRNA より内皮細胞のアポトーシスやオートファジーが抑制されたためこれらは敗血症性ショックの予後悪化のメカニズムの一部と考えられた。大動脈内皮細胞を観察すると CLP モデルでは内皮細胞脱落が認められたが、同様の siRNA を投与すると内皮細胞脱落は抑制された。

既存の血管内皮細胞脱落を扱った研究では、動物実験では血管障害モデルにて観察されたことが報告されている^{1,3)}。マウス¹²⁾やラット¹⁾の内膜擦過/剥離モデルの場合デバイスを挿入する血管は後に結紮されるため、評価対象血管の血流速度が減少する可能性が示唆される。我々と同じように Sumi T ら³⁾は内皮細胞脱落の理由としてずり応力の低下を理由に挙げている。樹状細胞は動脈硬化病変を生じやすい領域に集まりやすいことが指摘されており¹⁷⁾、樹状細胞の集簇は低ずり応力との関連が示唆される。炎症と内皮細胞脱落の関連は in vitro での実験成果が散見される^{5,6)}一方、in vivo での検討が待たれる。

重症敗血症、敗血症性ショックという観点から血管内皮細胞脱落という現象を考察すると、surviving sepsis campaign において早期に広いスペクトラムを持つ抗菌薬を投与開始することともに early-goal directed resuscitation を達成することを推奨するエビデンスがあること¹⁸⁾より、感染による炎症のみならず血行動態の破綻していることそのものも関連していることが示唆される。すなわち早期の血

行動態の蘇生をすることが抗菌薬投与している状態における生存率を改善するのであれば、血行動態の破綻そのものも重症敗血症・敗血症性ショックの悪化要因であることが示唆される。したがって、重症敗血症・敗血症性ショックの病態の解明には血行力学的な要素につき評価することも必要と思われた。

Progenitor cell の観点からは、既存の報告^{9~11)}および今回の実験結果¹²⁾等により生理的・病理的モデルから骨髄由来細胞が内皮細胞になり血管を修復することは可能性として非常に少ないと考えられる一方、骨髄由来細胞がパラクライン的に血管障害からの修復等、内皮細胞の増殖や脱落に関与していることは考えられる。また、骨髄由来細胞が内皮細胞のソースとして直接関与していない可能性が示された一方、血液内に存在する progenitor cell を内皮細胞に分化させることが出来ることは示されている¹⁹⁾ことから、これらの細胞を in vitro で分化させインターベンションに用いる方法を確立すること、血液内に存在する非骨髄由来 progenitor cell の存在を解明することの2点について十分検討する必要があると思われた。

文 献

- 1) Fujiyama S, Amano K, Uehira K, et al: Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res* 2003; 93: 980-9.
- 2) Nuotio K, Mäyränpää MI, Saksi J, et al: Endothelial apoptosis does not determine symptom status in carotid artery disease. *Cerebrovasc Dis* 2007; 23: 27-34.
- 3) Sumi T, Yamashita A, Goto S, et al: Disturbed blood flow induces erosive injury to smooth muscle cell-rich neointima and promotes thrombus formation in rabbit femoral arteries. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 1394-402.
- 4) Farb A, Burke AP, Tang AL, et al: Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation* 1996; 93: 1354-63.
- 5) Harlan JM, Killen PD, Harker LA, et al: Neutrophil-mediated endothelial injury in vitro. Mechanisms of cell detachment. *J Clin Invest* 1981; 68: 1394-403.
- 6) Westlin WF, Gimbrone MA Jr: Neutrophil-mediated damage to human vascular endothelium. Role of cytokine activation. *Am J Pathol* 1993; 142: 117-28.
- 7) Isner JM, Asahara T: Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovasculariza-

- tion. *J Clin Invest* 1999; 103: 1231-6.
- 8) Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, et al: Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002; 105: 3017-24.
 - 9) Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, et al: Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res* 2004; 94: 230-8.
 - 10) De Palma M, Venneri MA, Galli R, et al: Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 2005; 8: 211-26.
 - 11) Perry TE, Song M, Despres DJ, et al: Bone marrow-derived cells do not repair endothelium in a mouse model of chronic endothelial cell dysfunction. *Cardiovasc Res* 2009; 84: 317-25.
 - 12) Tsuzuki M: Bone marrow-derived cells are not involved in reendothelialized endothelium as endothelial cells after simple endothelial denudation in mice. *Basic Res Cardiol* 2009; 104: 601-11.
 - 13) Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, 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* 2000; 20: 335-42.
 - 14) Matsuda N, Hattori Y, Jesmin S, et al: Nuclear factor-kappaB decoy oligodeoxynucleotides prevent acute lung injury in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Mol Pharmacol* 2005; 67: 1018-25.
 - 15) Matsuda N, Takano Y, Kageyama S, et al: Silencing of caspase-8 and caspase-3 by RNA interference prevents vascular endothelial cell injury in mice with endotoxic shock. *Cardiovasc Res* 2007; 76: 132-40.
 - 16) Matsuda N, Teramae H, Yamamoto S, et al: Increased death receptor pathway of apoptotic signaling in septic mouse aorta: effect of a systemic delivery of FADD siRNA. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298: H92-101.
 - 17) Bobrychev YV: Dendritic cells and their role in atherogenesis. *Lab Invest* 2010; 90: 970-84.
 - 18) Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al: Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 2008; 36: 296-327.
 - 19) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-7.