

# 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	山内敦司
<b>Apurinic/aprimidinic Endonuclease 1 (APE1) enhances Endothelial Progenitor Cells-mediated Inhibition of Neointimal Formation.</b> (APE1は血管内皮前駆細胞の新生内膜形成抑制効果を増強させる) 共 著 者 名 川辺淳一、長谷部直幸 未 公 表  研 究 目 的  骨髄由来の血管内皮前駆細胞 (EPCs) は、骨髄から末梢血液中に動員され、障害血管の修復や虚血組織の血管新生に寄与し、心血管循環維持に重要な役割をもつ細胞である <sup>[1]</sup> 。最近、難治性虚血疾患に対する患者由来のEPCs細胞導入療法が臨床試験されている。同療法の安全性と持続的効果が確認され、今後の臨床応用が期待されているが、一方で効果が不十分な症例が存在し、方法論の改良が必要とされている。治療抵抗性の原因として、「患者由来のEPCsの細胞数や機能低下」が指摘され、骨髄からのEPCs動員促進や増殖能やサイトカイン産生能など特定のEPCsの機能を改善する方法が考案されているが、実際の <i>in vivo</i> 病態モデルでの効果は十分とはいえない。 APE1は、核内において、障害DNAの修復や酸化ストレス消去 (Redox) に関わるHif1 $\alpha$ などの多くの転写因子の働きを促進させ、核外においても酸化ストレス産生の抑制作用を介して、酸化ストレスから細胞を守る多機能蛋白である <sup>[2]</sup> 。実際、酸化ストレス環境下で働く炎症細胞や癌細胞、さらに幹細胞において重要な役割を果たすことが知られている。最近、APE1は、血管内皮細胞の酸化ストレス抵抗性を高め、平滑筋細胞の異常増殖・遊走を抑制し、血管の構造・機能的恒常性の維持に寄与することが報告されている <sup>[3]</sup> 。本研究では、「虚血・炎症が存在する酸化ストレス環境局所への集積が必要な未分化細胞」であるEPCsにおいて、APE1の役割を明らかにし、現状のEPCs細胞導入療法の問題を克服する可能性について検討した。  材 料 ・ 方 法 実験動物；当大学の遺伝子および動物実験に関する倫理規定に則り研究実験を行った。C57BL6雄性マウス (12-16週齢) およびGFP発現トランスジェニックマウス (C57BL6系) を用いた。 内皮前駆細胞 (EPCs) の調製；マウス骨髄より単核球 (MNCs) を調製し、さらにMACS (Magnetic-activated cell sorting) を用いてLin <sup>-</sup> ckit <sup>+</sup> Flk <sup>+</sup> 細胞を分離調整した。 末梢血管内皮細胞株 (CECs) の樹立；温度感受性SV40T抗原発現マウスの毛細血管組織からCD146 <sup>+</sup> 細胞をMACSで分離したのち、不死化した血管内皮細胞株を樹立した。 EPCs遺伝子導入実験；ヒト末梢白血球ゲノムからクローニングしたAPE1を遺伝子発現用アデノウイルスに組み入れた。これを用いてAPE1過剰発現 (APE-OE) 細胞を調整した。また、APE1特異的siRNAを作製し、lipofectamin法にて核酸導入することによりAPE1発現抑制 (APE-KD) 細胞を調整した。Ad-LacZおよびcontrol-siRNAを用いた細胞を各対照細胞群として用いた。 遺伝子発現量評価；細胞・組織内のmRNA発現量の評価は、総RNAを精製した後、Reverse transcription-PCRまたはreal-time quantitative PCR法を用いて行った。 細胞内ROS量評価；細胞内ROS (reactive oxygen species) 産生度は、total ROS detection kitを用いて細胞内ROSを標識し、フローサイトメトリにて評価した。 <i>In vitro</i> EPCs機能評価法；EPCsをFibronectin (FN)-coating培養プレート上で、一定時間 (16時間) インキュベートした後、Acetyl-LDL吸着性およびLectin結合陽性を示す接着EPCs数を計測した。浮遊および接着細胞の生存性 (viability) はWST (water-soluble tetrazolium salt) アッセイを用いて評価した。 <i>In vivo</i> EPCs機能評価法；マウス大腿動脈内腔をワイヤ (外径0.5 mm) により傷害させた後、EPCs (1 $\times$ 10 <sup>4</sup> ) を尾静脈より導入。血管障害1、4週後に、障害血管壁へのEPCsの集積度および新生内膜肥厚度を組織学的に評価した。導入細胞の組織内局在評価のために、GFP発現トランスジェ			

ニックマウスから分離したGFP<sup>+</sup>EPCsを利用した。

統計学的分析;平均±標準誤差を用いて表示し、2群間の平均値の差に関してはunpaired student's testを、多群間の比較はANOVAを用いて評価し、Pが0.05未満を有意とした。

## 成 績

### I. EPCsは酸化ストレスに対して抵抗性の高い細胞である

EPCsとCECsに過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;100~1000 μM)を暴露し、24時間後に細胞のviabilityを評価した。CECsは500 μM以上のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>において濃度依存性に細胞障害が誘導されたが、EPCsでは1000 μMの高濃度のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>においても明らかな細胞障害が認められなかった。EPCs内のROS除去に関わる因子(MnSOD, Catalase, glutathione peroxidase(GPX))の発現量は、CECsに比べすべて有意に高かった。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>暴露による細胞内ROS産生量は、CECsにおいて著明に上昇するのに対して、EPCsでは認められなかった。

### II. EPCsの接着能は酸化ストレスに脆弱である

EPCsの重要な細胞機能の一つである接着能(adhesion)は、興味深いことに、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>低濃度(100 μM)レベルから濃度依存性に低下した。なお、細胞viabilityは、接着前の浮遊EPCsにおいてもH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の影響を受けなかった。

### III. APE1は酸化ストレス下におけるEPCs接着機能維持に重要である

骨髄MNCsからEPCsを精製する過程の各細胞分画内APE1発現量を測定したところ、骨髄MNCsの中でEPCsは、APE1を強く発現する細胞であることが確認できた。

細胞viabilityは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>存在下においてもAPE1選択的阻害剤E3330の影響を受けなかった。一方、細胞adhesionはE3330により著明に低下した。APE-OEおよびAPE-KD細胞を用いてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(100 μM)存在下でのadhesion能を評価すると、APE-KD細胞において著明に抑制された。一方、APE-OE細胞において、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるadhesion低下は有意に軽減された。

### IV. APE1は障害血管壁内へのEPCs集積を促進する

*in vitro*実験で観察されたEPCs接着能におけるAPE1の作用が、疾患病態下においても反映するのか確認するため、大腿動脈障害マウスにGFP<sup>+</sup>EPCsを尾静脈から導入した。細胞導入一週間後、障害血管壁へのGFP陽性細胞の集積度は、対照細胞に比べ、APE-OE細胞において著明(~150%)に亢進した。

### V. APE1はEPCsの障害血管リモデリング改善効果を著明に高める

大腿動脈障害・細胞導入の4週間後に新生内膜肥厚度を内膜/中膜面積比(I/M ratio)で評価した。対照EPCsの大量(1~5X10<sup>5</sup> cells/mouse)導入でも、50%程度に新生内膜肥厚が改善することを確認しているが、あえて少量(1X10<sup>4</sup> cells/mouse)の細胞導入実験を行った。同条件において、対照細胞導入により細胞非導入群に比べ20%程度のI/M ratio改善効果を認めたが、APE-OE細胞では対照細胞導入群に比べても著明な(~250%)血管リモデリング抑制効果を示した。

## 考 案

EPCsは、血管内皮細胞に比べROS消去系蛋白の発現が高く、酸化ストレスに対して抵抗性の高い細胞であることが確認された。一方で、EPCsの接着能に関しては、酸化ストレスに対して脆弱であることを見出した。APE1は、酸化ストレスによる細胞死を防ぐ点では大きく寄与しないが、酸化ストレス下でのEPCs接着能維持に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

組織局所への「接着・集積後」に発揮される特定EPCs機能を亢進させる既報のEPCs機能改善法に比べ、我々の「酸化ストレス環境局所でのEPCs接着・集積性を高める」方法が、生体の疾患病態におけるEPCsの効果を高めるために非常に有効であることを示した。限られたEPCs量でも治療効果が発揮されるため、特にEPCs発現量が低下している心血管疾患患者に対する臨床応用の上でも期待できる方法と考えられる。

我々は、EPCsの血管リモデリング抑制作用に、EPCsの接着分子integrinsが重要な役割を果たすことを報告している(参考論文-1,2)。しかし、本研究でH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>あるいはAPE1発現の有無でintegrins発現変化は認められなかった。網羅的解析により、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>存在下でAPE1により発現維持される接着分子として、EPCsの接着性に重要な因子であるconnective tissue growth factor(CTGF)やvascular cell adhesion molecule 1(VCAM1)を同定している。明らかなROS産生がない程度の軽

微な酸化ストレスによるEPCs接着性低下と、それに対するAPE1による防御作用の詳細な機序解明は今後の課題である。

## 結 論

APE1は、酸化ストレス下でのEPCs接着能の維持に寄与し、過剰な酸化ストレス環境である障害血管への接着・集積を促進させ、EPCsの血管修復作用に重要な役割をはたしていることを明らかにした。本研究知見から、より効果的な細胞導入療法の開発にむけて、APE1が魅力的な治療標的遺伝子として期待できる。




## 引 用 文 献

- 1) Shantsila E, Watson T, Lip GY. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. Vascular repair by endothelial progenitor cells. J Am Coll Cardiol. 2007, 49(7), 741-52.
- 2) Tell G, et al. The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme. Antioxid Redox Signal. 2009, 11(3), 601-20
- 3) Jeon BH, et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 regulates endothelial NO production and vascular tone. Circ Res. 2004, 95(9), 902-10.

## 参 考 論 文

- 1) Kawabe J, Yuhki K, Okada M, Kanno T, Yamauchi A, Tashiro N, Sasaki T, Okumura S, Nakagawa N, Aburakawa Y, Takehara N, Fujino T, Hasebe N, Narumiya S, Ushikubi F. Prostaglandin I2 promotes recruitment of endothelial progenitor cells and limits vascular remodeling. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010, 30(3), 464-70.
- 2) Aburakawa Y, Kawabe J, Okada M, Yamauchi A, Asanome A, Matsuki M, Takehara N, Nakagawa N, Kobayashi M, Okumura S, Minami T, Mizukami Y, Yuhki K, Ushikubi F, Hasebe N. Prostacyclin stimulated Integrin-dependent Angiogenic Effects of Endothelial Progenitor Cells and mediated Potent Circulation Recovery in Ischemic Hindlimb Model. Circulation Journal (accepted).
- 3) Yamauchi A, Nakagawa N, Kawamura Y, Hasebe N. Incomplete Kawasaki disease manifesting as transient heart failure in a previously healthy adolescent. Intern Med. 2012, 51(16), 2169-73.
- 4) 山内敦司、巢山環、西浦 猛、田中秀一、赤石直之、急性心筋梗塞後亜急性期に心室細動で心突然死に至った一症例。名寄市立病院医誌 11 巻 1 号 Page37-40(2003.03)
- 5) 山内敦司、離島医療を経験して 地域医学 19 巻 8 号 Page451-454(2005.08)

# 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	山内 敦司
<p>審査委員長 <u>牙省文隆</u> </p> <p>審査委員 <u>東 信良</u> </p> <p>審査委員 <u>長谷部直幸</u> </p>			
<p>学位論文題目</p> <p><b>Apurinic/apyrimidinic Endonuclease 1 (APE1) enhances Endothelial Progenitor Cells-mediated Inhibition of Neointimal Formation</b></p> <p>(APE1 は血管内皮前駆細胞の新生内膜形成抑制効果を増強させる)</p>			

血管内皮前駆細胞（EPCs）は、障害血管の修復や虚血組織の血管新生に重要な役割を果たす細胞である。このため、虚血性疾患に対する EPC 導入療法の臨床応用が期待されている。一方、APE1 は障害 DNA の修復や Redox 関連因子の発現制御を介し、酸化ストレスから細胞を保護する多機能蛋白質である。本研究は、酸化ストレス下で働く EPCs の機能発現における APE1 の役割を解明し、より効果的な EPC 導入療法を模索することを目指した。

EPCs の細胞外マトリックスへの接着能は、障害組織への EPCs のリクルートにとって必須の細胞機能である。本研究では、まず APE1 が EPCs の接着機能の維持に重要な役割を果たすことを、*in vitro* 実験系で確認した。ついで、*wire-injury* による血管内膜肥厚モデルを用い、*in vivo* での APE1 の役割を解析した。その結果、APE1 を遺伝子導入した EPCs の導入では、EPCs の障害血管壁内への集積は有意に促進され、血管内膜肥厚の程度は著明に抑制された。

本研究の結果、APE1 は、EPCs の接着能調節を介し、EPCs の機能発現に重要な役割を果たすことが解明された。また、患者由来の EPCs には機能低下が認められ、EPCs 導入療法抵抗性の原因となる。したがって、本研究で示された EPCs への APE1 遺伝子導入の有効性は、より効果的な EPC 導入療法の可能性を示すものであり、その臨床的意義は大きいと思われる。

なお、論文提出者に対し各審査委員より、本論文とその関連領域に関して試問が行われ、適切な回答が得られた。

以上より、本論文は博士の学位論文として適切であると判定した。