

骨髓由来血管内皮前駆細胞株の PDGF 応答性と血管構成細胞への分化

○宮田隆志¹⁾, 飯笹 久¹⁾, 崔 吉道¹⁾, 藤井 常¹⁾, 寺崎哲也²⁾, 中島恵美¹⁾
(共立薬大¹⁾, 東北大院薬²⁾)

Bone marrow-derived endothelial progenitor cell line responds to PDGF and differentiates into vascular cells

Takashi Miyata¹⁾, Hisashi Iizasa¹⁾, Yoshimichi Sai¹⁾, Jo Fujii¹⁾,
Tetsuya Terasaki²⁾ and Emi Nakashima¹⁾

*Department of Pharmaceutics, Kyoritsu University of Pharmacy, 1-5-30 Shiba-koen, Minato-ku,
Tokyo 105-8512, Japan¹⁾*

*Department of Molecular Biopharmacy and Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Tohoku University, Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan²⁾*

Endothelial progenitor cells (EPC) express CD34, Flk-1 and CD133 and differentiate into endothelial cells (EC) where neovascularization occurs. Recently, we established a conditionally immortalized bone marrow EPC-derived EC line, TR-BME, from temperature sensitive-SV40 T-antigen gene transgenic rats. TR-BME forms a network in Matrigel and expresses EPC markers. To analyze the difference between EPC and mature EC, we identified EPC-specific genes by means of subtractive hybridization between TR-BME and brain capillary EC line, TR-BBB as a mature EC model. There was no significant difference between TR-BME and TR-BBB in the expression of EC marker. In contrast, the expression of smooth muscle cells (SMC) markers was higher in TR-BME than in TR-BBB. Moreover, the expression of contractile SMC markers was increased in the absence of the EC growth factors, such as vascular endothelial growth factor. The expression of synthetic SMC markers was increased by the addition of PDGF-BB. The SMC derived from TR-BME showed an altered phenotype, from contractile type to synthetic type, when they were cultured in the absence of PDGF-BB. These results show that TR-BME cells express higher levels of SMC markers as compared with mature EC, and can differentiate into contractile- and synthetic-type SMC.

Key words: endothelial progenitor cell, endothelial cell, mural cell, platelet-derived growth factor-BB, differentiation

【緒言】

血管内皮前駆細胞(EPC)は、腫瘍、虚血部位で血管内皮細胞(EC)に分化し、血管を形成する¹⁾。骨髓に由来する未成熟 EPC は、CD34, Flk-1, CD133 を発現し、成熟化に伴い CD133

の発現が減少し、成熟 EC のマーカーを発現する。しかし、EPC と成熟 EC は、類似した遺伝子発現や同様の性質を示し、その違いはほとんど明らかになっていない。我々は、温度感受性 SV40 遺伝子導入ラットより成体骨髓由来

EPC を分離し、条件的不死化血管内皮前駆細胞株(TR-BME)を樹立した²。TR-BME は、EPC と同様、VEGF 存在下で、アセチル化 LDL を取り込み、マトリゲル中で管腔を形成する。更に TR-BME は、*in vivo* において腫瘍部位に取り込まれ、EC に分化する^{3,4}。

EPC から分化した成熟 EC は、血液と組織間のバリアーとして機能し、物質の選択的透過に関与する。特に脳毛細血管内皮細胞は、隣り合った EC が tight junction をもち、様々な輸送担体を発現している。近年、条件的不死化脳毛細血管内皮細胞株(TR-BBB)が樹立され、成熟 EC として解析が行われている⁵。

EPC から EC への分化、成熟化には、血管平滑筋細胞(SMC)とペリサイトからなる壁細胞が関与する。SMC には、smooth muscle α -actin (SMA), smooth muscle protein 22 (SM22)を発現する収縮型と matrix Gla protein (MGP)を発現する合成型の 2 つのタイプが存在する。壁細胞は、血管の成熟化に関与しているが、壁細胞の前駆細胞は明らかではない。ES 細胞から分化した血管前駆細胞(VPC)は、EC と壁細胞の両方にする。また、腫瘍血管新生部位では、VEGF レセプター陽性細胞に由来する EC と壁細胞が存在する。これらのことから、EC と壁細胞は同じ細胞から分化する可能性が考えられる。

TR-BME, TR-BBB は、それぞれ EPC, 成熟 EC の性質を保持しており、TR-BME, TR-BBB を用いることで、EPC と成熟 EC の違いや EPC の分化メカニズムを明らかにできる。EPC の機能を理解することは、腫瘍や虚血で生じる血管形成のメカニズムを解明するために重要であり、血管新生に対する新たな治療法の開発に貢献できる。

本研究において、我々は EPC の多分化能を解析することを目的として、TR-BME と成熟

EC である TR-BBB とのサブトラクション PCR により EPC 特異的遺伝子の同定を試みた。さらに、PDGF-BB を用いて TR-BME の SMC への分化誘導を行い、EPC の分化能を明らかにすることを目的とした。

【実験の部】

TR-BME を EGM-2 で培養後、RNA を回収し、EPC マーカーの発現を RT-PCR により解析した。

TR-BME を tester, TR-BBB を driver としてサブトラクション PCR を行った。サブトラクション cDNA は、クローニングし、遺伝子配列を解析した。サブトラクション PCR により得られた遺伝子の発現量を半定量的 RT-PCR により解析した。

TR-BME の SMC への分化能を解析するために、growth factor を添加していない培養液と PDGF-BB を添加した培養液で TR-BME を培養した。コントロールとして EGM-2 で培養した TR-BME を用いた。分化誘導した TR-BME における EC, 収縮型 SMC, 合成型 SMC マーカーの発現量を RT-PCR により解析した。

SMC に分化した TR-BME の PDGF-BB による形質変換を解析するため PDGF-BB 処理後、growth factor を添加していない培養液で培養し、SMA のタンパク量を western blotting 法により解析した。

【結果および考察】

未成熟 EPC は、CD34, Flk-1, CD133 を発現している。CD133 は、骨髄由来未成熟 EPC に発現し、成熟化に伴い消失する。TR-BME における EPC マーカーを RT-PCR により解析した。TR-BME は、CD34, Flk-1, CD133 を発現していた。TR-BME は、管腔形成能を保持した細胞株であり、*in vivo* においても腫瘍血管新生部位に取り込まれ、腫瘍増殖を促進する。こ

これらの結果から、TR-BME は、未成熟 EPC の性質を維持しており、EPC のモデルとして有用であると考えられる。

EPC 特異的な遺伝子を探索するため、EPC として TR-BME、成熟 EC として TR-BBB を用いて、サブトラクション PCR を行った。サブトラクション cDNA には、Annexin II、Calvasclin、SM22 が含まれていた。次に、TR-BME と TR-BBB における Annexin II、Calvasculin、SM22 の発現量を半定量的 RT-PCR で解析した。TR-BME における Annexin II の発現量は TR-BBB と比較して有意な差は認められなかった。一方、TR-BBB と比較して、TR-BME における Calvasculin の発現量は、約 45 倍、SM22 の発現量は、約 6 倍多かった。Annexin II は、EC に発現し、Calvasculin、SM22 は、SMC に発現する。したがって、TR-BME は、EC のマーカーを成熟 EC と同程度発現し、SMC のマーカーを成熟 EC よりも多く発現している可能性が考えられる。次に、SMC に発現し、分化、増殖に関与する PDGF-BB のレセプターである PDGFR- β の TR-BME における発現量を TR-BBB と比較した。TR-BME における PDGFR- β の発現量は、TR-BBB と比較して約 6 倍多かった。これらの結果から、EPC は、成熟 EC と比較して、SMC に発現する遺伝子を多く発現していることが示唆される。

ES 細胞に由来する VPC は、VEGF により EC に分化し、PDGF-BB により、壁細胞に分化する。TR-BME を培養している EGM-2 は、EC の growth factor である VEGF を含んでおり、TR-BME は、EGM-2 で培養することで EPC の性質を保持する。また TR-BME を VEGF 産生腫瘍に投与すると EC に分化し、血管を形成する。本研究において TR-BME は、成熟 EC と比較して PDGFR- β が多く発現しており、PDGF-BB に対して応答性を示し、壁細胞へ分化する可能性がある。次に TR-BME を

growth factor を添加していない培養液と PDGF-BB を添加した培養液で培養し、TR-BME の SMC への分化誘導を試みた。PDGF-BB を添加して培養した TR-BME (PDGF-treated TR-BME) は、円形の細胞に変化し、growth factor を添加しないで培養した TR-BME (non-treated TR-BME) は、EC 用培養液で培養した TR-BME (EGM-2-treated TR-BME) よりも長い紡錘系の細胞に変化した。

壁細胞のうち収縮型は、収縮能をもつ分化した SMC であり、合成型は、増殖能をもつ未分化な SMC である。さらに、PDGF-BB は、収縮型 SMC から合成型 SMC に形質変換させ、細胞の形態やマーカーの発現を変化させることが報告されている。次に我々は、PDGF-treated TR-BME、non-treated TR-BME、EGM-2-treated TR-BME において、EC のマーカーとして Annexin II、収縮型 SMC のマーカーとして SMA、SM22、合成型 SMC のマーカーとして MGP の発現量を比較した (Fig. 1)。Annexin II は、EGM-2-treated TR-BME と比較して、PDGF-treated TR-BME、non-treated TR-BME で減少していた。SMA、SM22 は、PDGF-treated TR-BME、EGM-2-treated TR-BME と比較して、non-treated TR-BME で増加していた。MGP は、non-treated TR-BME、EGM-2-treated TR-BME と比較して、PDGF-treated TR-BME で増加していた。

合成型 SMC への形質変換が PDGF-BB によることを明らかにするため、我々は、PDGF-BB 処理後、PDGF を除いた培養液で培養した TR-BME の SMA タンパク量を western blotting 法を用いて non-treated TR-BME と比較した。PDGF-treated TR-BME は、SMA 量が減少したが、PDGF-BB 処理後、DMEM で培養した TR-BME は、non-treated TR-BME と同程度 SMA が発現していた。これらの結果は、TR-BME の EPC と類似した遺伝子発現は

EGM-2 に依存的であり, TR-BME は, growth factor の非存在下で収縮型 SMC へ分化し, PDGF-BB の存在下で合成型 SMC へ可逆的に形質変換したことを示している。

以上のことから, EPC は, EC と SMC の共通の前駆細胞であり, 血管新生部位において, EC に分化すると共に SMC に分化し, angiogenesis と比べてより効率的に血管構造を形成している可能性がある。

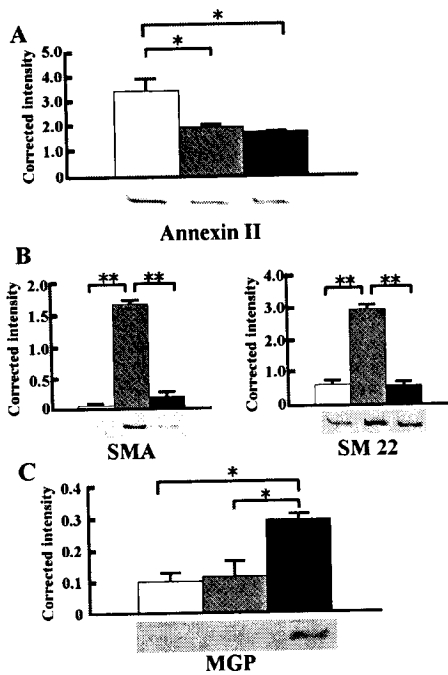


Fig. 1 mRNA expression of markers for EC (A), contractile SMC (B) and synthetic SMC (C) in EGM-2-treated TR-BME cells (open bars), non-treated TR-BME cells (hatched bars) and PDGF-treated TR-BME cells (solid bars). The significance of differences was evaluated by means of the *t*-test and all data are shown as mean +/- SEM. (n=3). **p* < 0.05; ***p* < 0.01.

【結論】

TR-BME は, EPC のマーカーを発現していた。また, TR-BME は, 成熟 EC である

TR-BBBと比較して, SMCのマーカーを多く発現していた。TR-BMEは, VEGFを含むEGM-2で培養することでEPCと類似した性質を維持し, growth factorの非存在下で収縮型SMCへ分化し, PDGF-BBの存在下で合成型SMCへ形質変換した。TR-BMEは性状の安定した細胞株であり, 今後も骨髄由来EPCの詳細な解析に利用可能である。

【参考文献】

1. Asahara, T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964-967 (1997).
2. Hattori, K. et al. Establishment of bone marrow-derived endothelial cell lines from ts-SV40 T-antigen gene transgenic rats. *Pharm Res* **18**, 9-15 (2001).
3. Muta, M., Matsumoto, G., Hiruma, K., Nakashima, E. & Toi, M. Study of cancer gene therapy using IL-12-secreting endothelial progenitor cells in a rat solid tumor model. *Oncol Rep* **10**, 1765-1769 (2003).
4. Muta, M. et al. Impact of vasculogenesis on solid tumor growth in a rat model. *Oncol Rep* **10**, 1213-1218 (2003).
5. Hosoya, K. et al. mRNA expression and transport characterization of conditionally immortalized rat brain capillary endothelial cell lines; a new in vitro BBB model for drug targeting. *J Drug Target* **8**, 357-370 (2000).