

コラーゲン誘導性関節炎モデルマウスにおける 関節局所での骨髄由来血管内皮細胞の検討

安 田 千 穂

東京慈恵会医科大学内科学講座リウマチ・膠原病内科

(受付 平成 21 年 6 月 15 日)

INVESTIGATION OF BONE MARROW-DERIVED ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS IN MICE WITH COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS

Chiho YASUDA

Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, The Jikei University School of Medicine

Recently, new system of neovascularization called 'vasculogenesis' has been reported. In vasculogenesis, endothelial progenitor cells (EPCs) which are mobilized from bone marrow to peripheral blood home to the local sites of ischemia, and differentiate into mature endothelial cells to be involved in the neovascularization. I investigated whether vasculogenesis would take place in the local joints of mice with collagen-induced arthritis (CIA). Bone marrow chimera mice created by bone marrow transplantation between different sexes were divided into two groups, and CIA was prepared in one group. The other group were regarded as control. Samples of peripheral blood and specimens of the bilateral ankle joints were collected as arthritis developed. Cells positive for CD34, Flk-1, and CD117 in peripheral blood were counted with fluorescence activated cell sorting (FACS), and regarded as circulating endothelial progenitor cells (cEPCs). The ankle joints were subjected to simultaneous immunohistological staining and fluorescence in situ hybridization (FISH), and CD45⁻, CD31⁺, Y chromosome⁺ cells were identified and regarded as bone marrow-derived endothelial cells. The number of cEPCs in peripheral blood was increased as arthritis developed in the CIA mice, compared with that in the control mice. Bone marrow-derived endothelial cells were noted in areas of the ankle joints with marked synovial proliferation in the CIA mice. No bone marrow-derived endothelial cell was noted in the control mice.

These results suggest that cEPCs mobilized from bone marrow to peripheral blood differentiated into endothelial cells in the local inflammatory joints, and are involved in the vasculogenesis of arthritis.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2009;124:191-200)

Key words: angiogenesis, endothelial progenitor cells, arthritis, bone marrow transplantation, fluorescence *in situ* hybridization

I. 緒 言

成熟個体に起こる血管新生は、従来、既存血管の血管内皮細胞が増殖、遊走して成立する angiogenesis によって起こると考えられてきた。しかし近年、血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells; EPCs) が発見され、vasculogenesis

という新たな機構が存在することが分かった¹⁾。vasculogenesis においては骨髄から動員された EPCs が未分化のまま局所にたどり着き、増殖、分化することで血管を構築する。この EPCs が関与する vasculogenesis は、癌や糖尿病性網膜症等の様々な病的状態においても重要であることが報告されている²⁾⁻⁴⁾。

一方、関節リウマチ (rheumatoid arthritis ; RA) は、関節内滑膜組織を病変の首座とした慢性炎症性の疾患である。RA では炎症性滑膜組織に多数の血管新生を認め、これは増殖する滑膜組織の栄養に必須と考えられている。関節炎における血管新生は以前から重要性を強調されているが⁵⁾⁶⁾、vasculogenesis の観点から検討した報告は少なく、明確に同定された骨髄由来細胞が成熟個体の関節炎局所で血管新生に関与することを示した報告はない。

そこで今回、異性間骨髄移植を行い、骨髄由来細胞のみ Y 染色体を有する骨髄キメラマウスを作成し、これを用いて関節炎における骨髄由来血管内皮細胞の動向を検討した。

II. 対象と方法

1. 対象

骨髄移植のレシピエントとして4週齢雌 DBA/1J マウス (Seac Yoshitomi, Ltd. Fukuoka, Japan) (n=26) , ドナーとして同週齢雄 DBA/1J (Seac Yoshitomi, Ltd.) マウス (n=30) を用いた。以下の方法で骨髄移植を行い、コラーゲン誘導性関節炎 (collagen-induced arthritis : CIA) を発症させたが、CIA を発症したマウスを CIA 群 (n=13) , CIA を導入しなかったマウスをコントロール群 (n=10) とし、最終的なすべての解析に用いた。

なお、すべての動物実験は研究機関における実験等の実施に関する基本指針 (文部科学省) を遵守し、東京慈恵会医科大学動物実験委員会によって承認された計画に従って行った。

2. 方法

1) 骨髄移植モデルの作製

(1) ドナー細胞の調整

ドナーをジエチルエーテルの過剰吸入にて安楽死させ、大腿骨と脛骨を採取した後、Dulbecco's modified eagle medium (Invitrogen Co., Grand Island, NY) を骨髄腔にフラッシュして骨髄を洗い出した。骨髄細胞浮遊液をナイロンメッシュに通して回収した後、phosphate buffered saline (PBS) にて2回洗浄した。PBS で再懸濁してからナイロンメッシュを通して単細胞浮遊液とした。

(2) レシピエントの X 線照射

レシピエントに X 線照射装置 (MBR-1520R, Hitachi Medical Corporation, Tokyo, Japan) を用いて 4.0 Gy の X 線を照射した。さらに3時間後、4.0 Gy の追加照射を行い、総照射量 8.0 Gy とした。

(3) 骨髄移植

追加照射終了直後のレシピエントに、ヘパリン化した注射器にて、 5.0×10^6 cells / 0.5 ml に調整したドナー骨髄細胞浮遊液を経尾静脈投与した。

(4) 移植効率の評価

① 末梢血標本の作製

骨髄移植後5週間経過したマウスの尾静脈から、ジエチルエーテルの吸入麻酔下にて、末梢血 60 μ l を毛細管採血した。サンプルを溶血させ、洗浄した後、カルノア液にて固定し、スライドグラスに滴下して標本作製した。

② Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法

スライド標本を 10mM sodium citrate にて 96°C, 15 分間インキュベートした。室温に 20 分間放置した後、2 \times Sodium chloride-sodium citrate buffer (SSC) にて洗浄し、4% パラホルムアルデヒド / PBS 内にて 2 分間インキュベートした。エタノールにて脱水後、風乾した。StarFISH Mouse Whole Chromosome-Specific Probes (Fluorescein isothiocyanate labelled Y-chromosome paint, Cambio Ltd, Cambridge, UK) を専用希釈 buffer にて 1/10 希釈し、10 μ l をスライドに載せた。カバーガラスを載せ、ラバーセメントで封入した後、60°C で 10 分間変性させ、湿潤箱に入れて 37°C で一晩ハイブリダイズさせた。ラバーセメントとカバーガラスを除去し、50% ホルムアミド / 2 \times SSC で余剰プローブを洗浄した後、2 \times SSC, 4 \times SSC / 0.005% Tween20 で順に洗浄し、DAPI I counter stain (VYSIS, Downers Grove, IL) で対比染色およびマウントを行った。

③ シグナルの観察とキメリズムの評価

AxioVision4.2 (Carl Zeiss, Germany) を用いて有核細胞 100 個中の Y 染色体陽性細胞をカウントし、そのパーセンテージを算出した。

2) 関節炎部における骨髄由来血管内皮前駆細胞の動向

(1) 骨髄移植モデルへの関節炎誘導

骨髄移植後5週間経過したマウスを、コラーゲン誘導性関節炎 (CIA) 群と、コントロール群の

2群に分けた。CIA群には初回免疫として、尾根部に、等量の0.3%ウシII型コラーゲン(COSMO BIO Co, Tokyo, Japan)と完全フロイントアジュバント(Difco Laboratories, Detroit, Michigan)を混合したエマルジョン0.1ml(コラーゲン150 μ g相当)を皮内投与した。3週間後にブースターとしてウシII型コラーゲンと不完全フロイントアジュバントで作製したエマルジョンを同様に投与した。

(2) 関節炎の評価

前肢と後肢の計4足関節について、関節炎点数(0点:腫脹無し, 1点:軽度の腫脹と発赤, 2点:明瞭な腫脹, 3点:高度の腫脹・浮腫, 4点:関節の拘縮, の5段階)による評価を行った。各個体において、4関節すべての平均関節炎点数および後肢2関節のみの平均関節炎点数を算出し、足関節サンプルを採取するまでの期間(day28もしくはday35)の経時変化を検討した。

(3) 骨髄由来血管内皮前駆細胞の同定

① 標本の作製

ブースター投与後1週間目(初回免疫後day28), または2週間目(day35)に、マウスをペントバルビタールにて深麻酔し、右室よりヘパリン採血した。さらに左室よりPBSで血管内を灌流洗浄した。ついで4%パラホルムアルデヒド/PBSで灌流固定し、両側後肢を足関節から5mm中枢側で採取した。切断した検体を4℃にて4%パラホルムアルデヒド/PBSを用いて48時間浸漬固定した後、100%エタノールにて24時間脱脂した。さらに10%EDTA脱灰液にて室温で48時間脱灰した後、パラフィン切片を作製した。

② 骨髄由来血管内皮細胞の染色

骨髄由来血管内皮細胞を同定するためCD45, CD31の二重免疫染色に引き続いて、FISH法でY染色体陽性細胞を検出する方法を用いた¹⁰⁾。

a. 免疫染色

パラフィン切片をTris-buffered saline(TBS)にて洗浄後、正常ウサギ血清(ニチレイ)を滴下し、10分間ブロックした。1次抗体として1/25希釈したラット抗マウスCD31抗体(BD Pharmingen)を滴下し、4℃にて一晩インキュベートした。洗浄後、2次抗体として1/100希釈したビオチン標識ウサギ抗ラットIgG抗体(DAKO Cytomation

Co, Ltd.)を滴下し、室温で30分反応させた。洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン(ニチレイ)を滴下し、室温で30分反応させた後、Vector Blue alkalinephosphatase substrate kit(Vector Laboratories, Inc.)を用いて発色させた。標本をTBSにて洗浄後、Peroxidase blocking reagent(DAKO Cytomation Co, Ltd.)を滴下し、5分間ブロックした。1次抗体として1/50希釈したラット抗マウスCD45抗体(BD Pharmingen)を滴下し、室温にて1時間反応させた。洗浄後、2次抗体としてヒストファインシンプルステインマウスMAX-PO(Rat)(ニチレイ)を滴下し、30分間反応させた。洗浄後、シンプルステインDAB溶液(ニチレイ)にて発色させた。

b. FISH法

免疫組織染色後、II-2-1)-(4)-(②)と同様にStarFISH Mouse Whole Chromosome-Specific Probes(Indodicarbocyanin [Cy5] labelled Y-chromosome paint, Cambio Ltd, Cambridge, UK)を用いてドナー由来細胞中のY染色体を染色した。

③ 骨髄由来血管内皮前駆細胞の評価

各個体につき、後肢足関節切片を左右1枚ずつ用いて、それぞれ全滑膜部を免疫染色と蛍光染色の両方で撮影し、AxioVison4.2を用いて合成像を作製した。合成像にてCD45陰性CD31陽性Y染色体陽性細胞を確認し、ドナー骨髄由来血管内皮細胞とした。1つの足関節において、滑膜内の全血管数と、ドナー骨髄由来血管内皮細胞を含有するすべての血管数とをそれぞれ計測した。

3) 循環血管内皮前駆細胞の評価

day28, day35に足関節を採取した際、右室よりヘパリン採血した末梢血100 μ lから血球成分をフィコールにて遠心分離し、溶血、洗浄した。fluorescein isothiocyanate標識ラット抗マウスCD34モノクローナル抗体(BD Bioscience), phycoerythrin標識抗マウスFlk-1抗体(eBioscience, San Diego, CA), allophycocyanin標識抗マウスCD117モノクローナル抗体(eBioscience)を加え、4℃にて3時間反応させた。洗浄後、1%パラホルムアルデヒド/PBSにて固定し、FACS Callibur flow cytometer(BD Bioscience, San Jose, CA)にて各サンプルの50000細胞を測

定した。各サンプルは IgG isotype control によるネガティブコントロールと比較し、陽性細胞を検出した。

測定したデータは CELLQuest (BD Bioscience) を用いて解析した。まず、forward light scatter と side light scatter にて死細胞や血小板、debris を除外した。さらに、CD34 陽性 Flk-1 陽性となる細胞を選別し、その細胞群内で CD117 陽性となる細胞を循環血管内皮前駆細胞とした。各個体について死細胞や血小板、debris を除外した全細胞数に対する循環血管内皮前駆細胞数のパーセンテージを算出し、統計学的評価に用いた。

4) 統計学的解析

骨髓キメリズム、末梢血中 cEPCs のパーセンテージの各測定項目については、CIA 群とコントロール群間の統計学的解析に Mann-Whitney の U 検定を用いた。

実験全体の概要を Fig.1 に示す。

4 週齢 DBA/1j マウスの異性間骨髓移植によって得られた骨髓キメラマウスにコラーゲン誘導性関節炎を誘導し、関節炎点数を経時的に評価した。初回免疫施行日を day0 とし、day28 と day35 に末梢血と両側足関節を採取した。末梢血は FACS を用いて CD34 陽性 Flk-1 陽性 CD117 陽性細胞を計測し、循環血管内皮前駆細胞とした⁸⁾⁻¹⁰⁾。足関節については免疫組織学的検索と FISH 法を同時に施行して CD45 陰性 CD31 陽性 Y 染色体陽性細胞を同定し、これを骨髓由来血管内皮細胞とした⁷⁾。

III. 結 果

1. 骨髓移植効率

骨髓移植後 5 週間経過した時点におけるマウス末梢血キメリズム (Y 染色体含有率) は、 80.20 ± 0.73 (mean \pm SEM) % であった。CIA 群、コントロール群のキメリズムは、それぞれ 79.99 ± 1.01 %, 80.51 ± 1.08 (mean \pm SEM) % であった。両群間には Mann-Whitney の U 検定にて有意差を認めなかった ($p=0.8674$)。

2. 骨髓移植マウスにおける関節炎点数の推移

CIA 群において、関節炎は追加免疫後 2-3 日 (day24 前後) で発症した。day28 に足関節を採取

した群と day35 に採取した群の両群において、平均関節炎点数は、4 関節の平均および後肢 2 関節のみの平均のいずれも経時的に増加した。足関節採取時の平均関節炎点数 (mean \pm SEM) は、4 関節平均、後肢 2 関節平均の順で 4.71 ± 0.68 および 3.14 ± 0.51 (day28), 4.80 ± 0.49 および 3.40 ± 0.40 (day35) であった (Fig.2)。

3. 末梢血循環血管内皮前駆細胞数の検討

コントロール群と比較し CIA 群では、末梢血において全細胞数に対する循環血管内皮前駆細胞数のパーセンテージの平均が day28, day35 とも増加していた。CIA 群およびコントロール群において循環血管内皮前駆細胞の占めるパーセンテージの平均 (mean \pm SEM) は、順に 3.20 ± 0.45 および 1.75 ± 0.62 (day28), 15.75 ± 0.49 および 9.66 ± 1.14 (day35) であった。day35 では Mann-Whitney の U 検定にて統計学的に有意な増加を認めた ($p=0.0090$) (Fig.3)。

4. 関節滑膜内における骨髓由来血管内皮細胞の観察

後肢足関節滑膜内で CD31 陽性となる細胞のうち、血管の一部を形成していると形態が確認できるもの (管腔状または線状) について評価した¹¹⁾ (Fig.4a)。これらの細胞のうち、CD45 陽性となるものに関しては、血管壁に付着した白血球である可能性がある。CIA モデルでは炎症細胞の浸潤が多いことから、まず白血球の可能性を否定することを優先し、CD45 陽性細胞は血管内皮細胞から除外して観察した⁷⁾。また、Y 染色体については、核を DAPI で対比染色することで核内に存在することを確認した (Fig.4b)。

合成像を用いて、これらの条件を同時に満たす CD45 陰性 CD31 陽性 Y 染色体陽性細胞を骨髓由来血管内皮細胞とした (Fig.4 c-j)。

コントロール群では関節炎部に骨髓由来血管内皮細胞は認められなかった。CIA 群においては、day28 ではコントロール群と同様に滑膜内に骨髓由来血管内皮細胞は認められなかったが、day35 では滑膜増殖の強い部分で骨髓由来血管内皮細胞が認められた。しかし、その数は少なく、1 切片で 6 個であった。

一方、末梢血中の循環血管内皮前駆細胞では、CD45 陽性のもも報告されている¹²⁾¹³⁾。したがっ

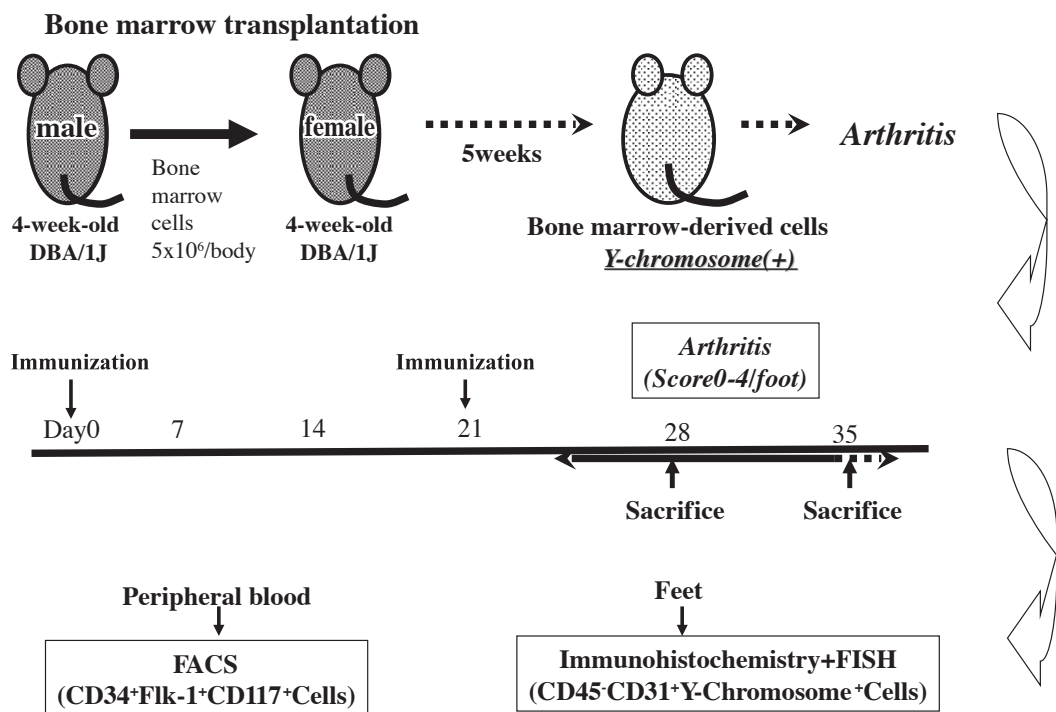


Fig. 1. Overall summary of the experiments

Collagen-induced arthritis was prepared in bone marrow chimera DBA/1j mice created by bone marrow transplantation between different sexes at 4 weeks of age, and the arthritis score was determined over time. Peripheral blood samples were collected, and the bilateral ankle joints were excised on days 28 and 35. CD34⁺, Flk-1⁺, CD117⁺ cells in peripheral blood were counted using fluorescence activated cell sorting(FACS), and regarded as circulating endothelial progenitor cells. The ankle joints were subjected to simultaneous immunohistological staining and fluorescence in situ hybridization(FISH), and CD45⁺, CD31⁺, Y chromosome-cells were identified and regarded as bone marrow-derived endothelial cells.

て循環血管内皮前駆細胞が血管内皮細胞に分化する過程では、CD45 弱陽性の血管内皮細胞となる可能性がある。このような CD45 弱陽性 CD31 陽性 Y 染色体陽性細胞を骨髄由来血管内皮細胞とすると、骨髄由来血管内皮前駆細胞を含む血管は血管全体の $3.74 \pm 1.57\%$ (mean \pm SEM) に観察された。

IV. 考 察

これまでに関節炎の分野で血管内皮前駆細胞について検討した報告には R ger らの報告がある¹⁴⁾。R ger らは CXCR-4 を発現している CD34 陽性 CD31 陰性細胞を血管内皮前駆細胞と考え、この細胞の存在を組織学的に関節リウマチ患者滑

膜中において検索した。その結果、滑膜内にこの細胞の集団の形成を見いだした。また、これらの細胞は、STRO-1, α -smooth actin (α -SMA) 等の間葉系マーカー陽性の壁細胞と考えられる細胞群に囲まれていた。このことから、観察した血管内皮前駆細胞は、壁細胞に裏打ちされた新生血管を形成する過程にあると彼らは考察した。しかし、血管内皮前駆細胞の由来については、局所の既存血管内皮細胞か、骨髄由来か、不明であるとしている。

一方、これまで明確に同定された骨髄由来細胞が成熟個体の関節炎部局所で血管新生に関与することを示した報告はない。そこで今回の実験ではこの点を明らかにすべく、骨髄キメラマウスを用いて標識した骨髄由来細胞を関節炎部局所の組織

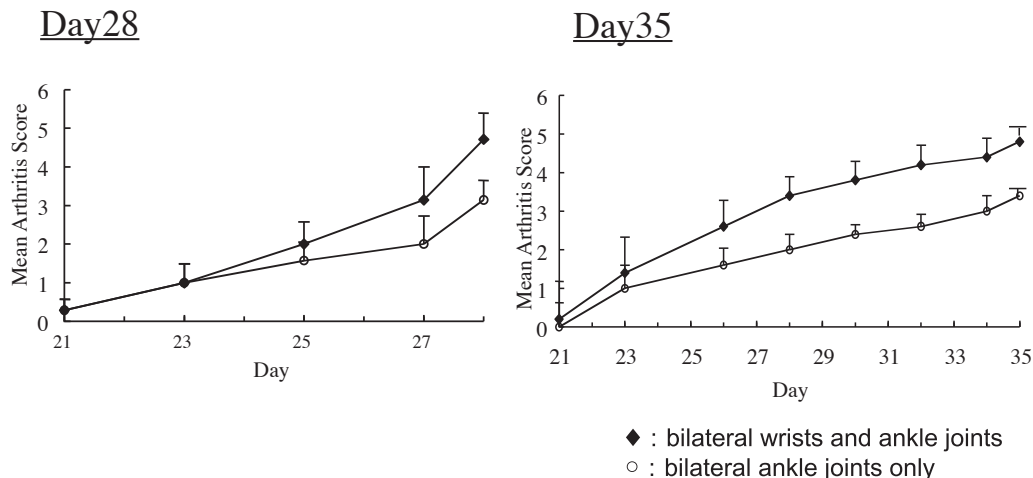


Fig. 2. Time course of mean arthritis score

Four ankle joints (fore- and hind legs) were evaluated with a 5-step arthritis score (0: no swelling, 1: mild swelling and flare, 2: apparent swelling, 3: severe swelling/edema, 4: joint contracture) in bone marrow chimera mice with collagen-induced arthritis (CIA) from the time of CIA induction to the collection of ankle joint specimens. In each animal, the mean arthritis score of the 4 joints and that of the 2 hind-leg joints were calculated, and time-course changes were investigated. In CIA mice, arthritis developed about 3 days after the booster on day 21. Both the mean arthritis scores of the 4 and 2 joints increased with time in both groups in which the joints were excised on days 28 and 35. At the point of the collection of joint specimens, the mean arthritis score of the 4 joints and that of the 2 joints were 4.71 ± 0.68 and 3.14 ± 0.51 (day 28), 4.80 ± 0.49 and 3.40 ± 0.40 (day 35), respectively. The data were expressed as mean \pm SEM.

で解析した。また、同一個体の循環血中血管内皮前駆細胞を関節炎発症後、経時的に解析した。

まず、関節炎発症後の day 28 と day 35 において、末梢血における循環血管内皮前駆細胞数を検討した。その結果、day 28 および day 35 において末梢血循環血管内皮前駆細胞数は、CIA マウス群ではコントロール群と比べて増加傾向を認めた。day 35 では統計学的に有意差が認められた (Fig. 3)。次に、関節局所における骨髄由来血管内皮細胞を組織学的に検討した。day 28 では、CIA マウス群において関節滑膜内の骨髄由来血管内皮細胞は認められなかった。一方、day 35 においては、CIA マウス群の関節滑膜内に骨髄由来血管内皮細胞を同定することができた (Fig. 4)。

しかし、多重染色については、今回の実験系では評価が難しい点があった。CD45 の染色性については、はっきりと染色される細胞からわずかに染色が認められるものまで混在して観察された。このため、わずかに染色が認められる細胞を弱陽

性とするか、非特異的な発色とするか、解釈するのが困難であった。とくに CD31 陽性細胞での評価が難しいため、蛍光多重染色法も検討したが、高温処理を含む FISH 法を行うと CD31 と CD45 の蛍光染色が弱まってしまい、多重染色を同時に評価することが困難であった。このような制限のもと、今回の評価は炎症細胞を除外することを優先した。すなわち、わずかでも CD45 陽性を示す細胞は骨髄由来血管内皮細胞から除外した。この条件で血管内皮細胞を観察すると、CIA 群においては day 35 に血管内皮前駆細胞をわずかに証明できるのみであった。

一方、前述の通り末梢血中の循環血管内皮前駆細胞では、CD45 陽性のものも報告されており¹²⁾、循環血管内皮前駆細胞が血管内皮細胞に分化する過程では、CD45 弱陽性の血管内皮細胞となる可能性がある、CD45 弱陽性 CD31 陽性 Y 染色体陽性細胞を骨髄由来血管内皮細胞として計測した場合、骨髄由来血管内皮前駆細胞を含む血管は

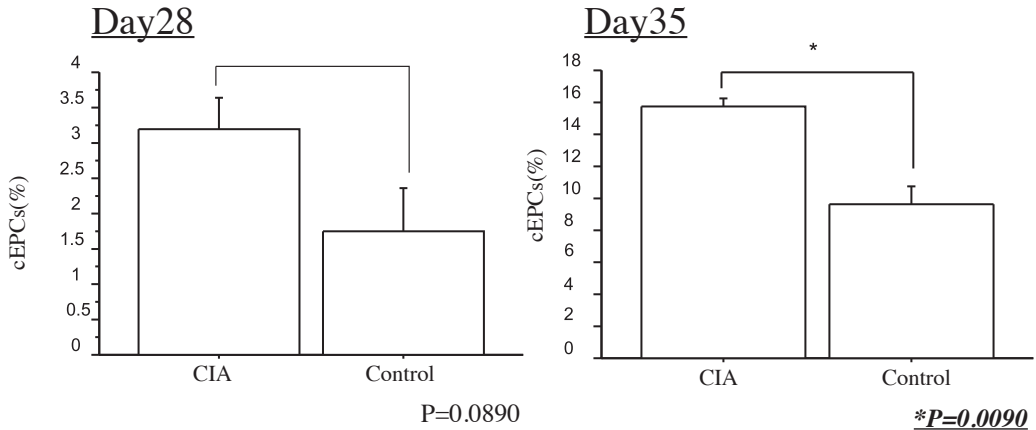


Fig. 3. Percentages of circulating endothelial progenitor cells in peripheral blood

The blood cell fraction was separated from 100µl of heparin-treated peripheral blood collected from the right ventricle on days 28 and 35, hemolyzed, and washed. After reactions with fluorescein isothiocyanate-conjugated rat anti-mouse CD34 monoclonal antibodies, phycoerythrin-conjugated anti-mouse Flk-1 antibodies, and allophycocyanin-conjugated anti-mouse CD117 monoclonal antibodies, 50,000 cells/sample were subjected to flow cytometry with a FACS Calibur flow cytometer. Each sample was compared with the negative control and the IgG isotype control, and positive cells were detected. .

The measured data were analyzed with CELL Quest. Dead cells, platelets, and debris were excluded based on forward and side light scattering, and cells positive for CD34, Flk-1, and CD117 were regarded as circulating endothelial progenitor cells (cEPCs). The percentage of cEPCs [cEPCs(%)] relative to the total number of cells excluding dead cells, platelets, and debris was calculated, and subjected to statistical analysis.

Compared with those in the control mice, cEPCs(%) were increased in the collagen-induced arthritis(CIA) mice on days 28 and 35. cEPCs(%) in the CIA mice and those in the control mice were 3.20±0.45 and 1.75±0.62 on day28, and 15.75±0.49 and 9.66±1.14 on day 35, respectively. The data were expressed as mean±SEM. The difference on day 35 was significant according to the Mann-Whitney test (p=0.0090).

血管全体の 3.74 ± 1.57% (mean ± SEM) であった。

悪性腫瘍の分野でも、骨髄由来血管内皮前駆細胞の関与する vasculogenesis が今までにいろいろ検討されている²⁾¹⁵⁾。当初、悪性腫瘍領域では、新生血管に組み込まれる血管内皮前駆細胞の割合は低いとする報告が相次ぎ、病態への関与も少ないと予想されていた¹⁶⁾。しかし、近年 Shaked らにより興味深い報告が出され、再び注目されている¹⁷⁾。彼らは腫瘍移植マウスに化学療法を施行し、末梢血における循環血管内皮前駆細胞の動向を観察した。末梢血循環血管内皮前駆細胞は化学療法直後に急増した。そこで彼らは、化学療法を施行する 24 時間前に抗マウス vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) モノクローナル抗体を用いて、循環血管内皮前駆細胞の増加を

ブロックした。結果は、残存腫瘍周囲への血管内皮前駆細胞の動員は抑制され、腫瘍は有意に縮小していた。つまり、血管内皮前駆細胞は腫瘍の再発に関与していたこととなる。彼らの報告は、血管内皮前駆細胞が病態へ関与する機序は、単に新生血管へ直接取り込まれる数だけでは評価できないことを示していると言えよう。

なお、これまでの関節炎と血管内皮前駆細胞に関する報告には、関節炎患者の循環血管内皮前駆細胞が減少していたというものがある。Grisar らは、投薬治療中の関節リウマチ患者を疾患活動性の有無で 2 群に分割し、それぞれの群で末梢血中の CD34 陽性 VEGFR-2 陽性 AC133 陽性細胞を循環血管内皮前駆細胞として測定した。また、末梢血単核球を血管内皮細胞培養条件下にて培養し、形成したコロニー数を定量する colony

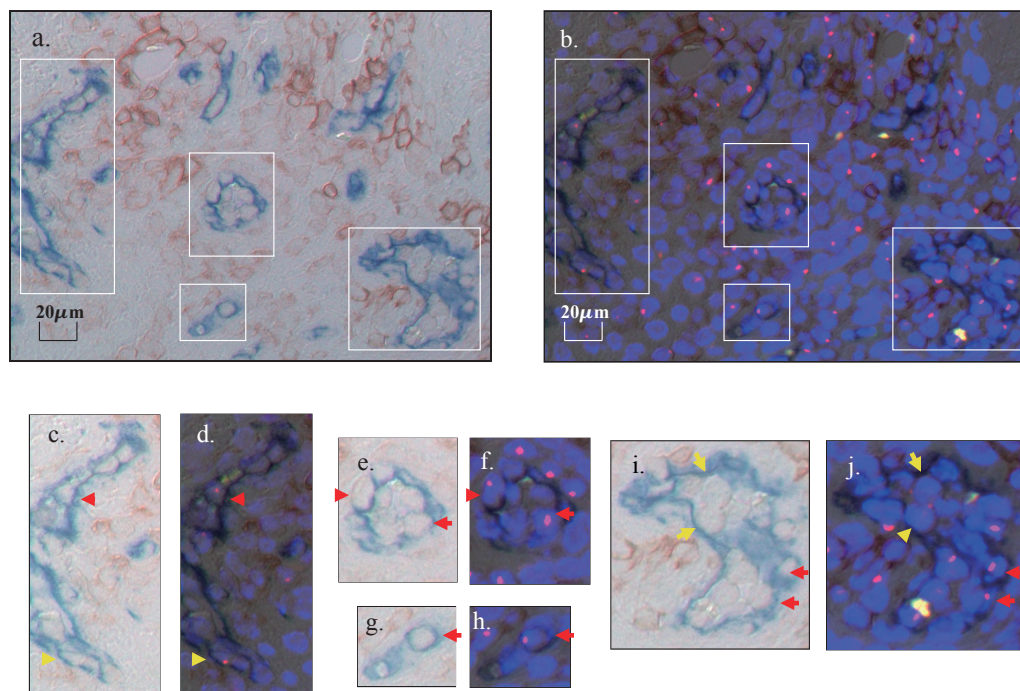


Fig. 4. Determination of Bone Marrow-Derived Endothelial Cells

Observation of endothelial progenitor cells in the synovial membrane with arthritis

Histology of the hind leg ankle joint in mice with collagen-induced arthritis (CIA) (400 x)

a: Immunohistological staining with anti-CD31 and CD45 antibodies. Cells positive for CD31 and CD45 were stained blue and brown, respectively.

b: Composite image of a Y-chromosome-stained image. The Y chromosome was stained with fluorescence in situ hybridization. The nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole, resulting in a red-stained Y chromosome and blue-stained nuclei.

CD31-positive, CD45-negative, Y chromosome-positive cells were regarded as bone marrow-derived endothelial cells.

c, e, g, and i: Regions enclosed with a line in a.

d, f, h, and j: Composite image of c, e, g, and i.

Cells assumed to be bone marrow-derived endothelial cells are indicated with red arrows. Cells indicated by yellow arrows were positive for CD31, CD45, and Y chromosome. CD45-positive, Y chromosome-positive cells were considered likely to be white blood cells adhering to the vascular wall, and were excluded from vascular endothelial progenitor cells.

forming unit (CFU) assay を施行した。その結果、活動性のある RA 患者では、健常人や非活動性 RA 患者と比較して、循環血管内皮細胞数と CFU assay の両者において低下していたと報告した¹⁸⁾。関節炎の増悪に伴って血管新生促進因子である血中 VEGF や basic fibroblast growth factor (bFGF)、erythropoietin は上昇しているにもかかわらず、循環血管内皮前駆細胞は減少していたとしている。血管新生が強い時期に循環血管内皮前駆細胞が減

少しているという矛盾は、さまざまに議論されていたが、最近では Paleolog らの報告にあるように関節炎部局所での消費によって循環中の血管内皮前駆細胞が減少しているとする説が有力である¹⁹⁾。

さらに、実際の RA 患者では慢性的な経過中に関節炎の様々なフェーズが混在していると考えられ、循環血管内皮前駆細胞の増加が予想される初期の段階を分離して捉えることが困難だと考えら

れる。その点、今回の実験は CIA モデルを用いているため、追加免疫施行後に一斉に関節炎が発症しており、病態を形成する初期段階をより厳密に観察していると言える。したがって、関節炎発症後に循環血管内皮前駆細胞が上昇するという今回の結果は、これまでのヒトでの報告と矛盾するものではなく、ヒトで解析困難な関節炎の病態形成初期をより厳密に捉えた結果であると考えられた。

近年、血管新生を制御することが関節炎のコントロールにつながるということが明らかになってきている⁵⁾⁶⁾¹⁹⁾。今回、CIA モデルマウスでは、関節炎発症に伴って末梢血循環血管内皮前駆細胞が増加し、少数ではあるが関節滑膜部の骨髄由来血管内皮細胞が証明できた。このことから、関節炎では血管内皮前駆細胞が骨髄から循環血中に動員され、関節炎部局所で血管内皮細胞に分化し、関節炎部の血管新生に関与していると考えられた。したがって、関節炎をコントロールするための血管新生制御においては、血管内皮前駆細胞の制御がそのターゲットとなる可能性があると考えられた。

V. 結 語

CIA モデルマウスにおける、末梢血循環血管内皮前駆細胞および関節局所での骨髄由来血管内皮細胞の動向を観察した。

CIA モデルマウスでは、関節炎発症に伴って末梢血循環血管内皮前駆細胞は増加し、少数ではあるが関節滑膜部の骨髄由来血管内皮細胞が証明できた。このことから、CIA モデルマウスでは関節炎の発症に伴い、血管内皮前駆細胞が骨髄から循環血中に動員され、関節炎部局所で血管内皮細胞に分化し、関節炎部の血管新生に関与していると考えられた。

近年、血管新生を制御することが関節炎のコントロールにつながるということが明らかになってきている⁵⁾⁶⁾¹⁹⁾が、血管内皮前駆細胞の制御がそのターゲットとなる可能性があると考えられた。

稿を終えるに臨み、ご校閲を賜りました東京慈恵会医科大学内科学講座リウマチ・膠原病内科 山田昭夫教授に

深く感謝致します。また、ご教授を賜りました同内科学講座糖尿病・代謝・内分泌内科 田嶋尚子教授、同 DNA 医学研究所分子免疫学研究部門 斎藤三郎准教授に深く感謝致します。さらに、本研究において、ご指導ご協力頂きました下記の諸先生方に感謝致します。同 DNA 医学研究所分子免疫学研究部門 大野裕治講師、池島宏子助教、秋山暢丈助教。同内科学講座リウマチ・膠原病内科 金月勇講師、吉田健助教、安田淳医員、浮地太郎医員、野田健太郎医員、古谷和裕医員、柳町麻衣美医員。最後に終始ご指導をして下さった内科学講座リウマチ・膠原病内科 黒坂大太郎准教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-6.
- 2) Peters A, Diaz LA Jr, Polyak K, Meszler L, Romans K, Guinan E, et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med* 2005;11:261-2.
- 3) Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002;8:607-2.
- 4) Santarelli J, Udani V, Yung C, Cheshier S, Wagers A, Brekken R, et al. Incorporation of bone marrow-derived Flk-1-expressing CD34 cells in the endothelium of tumor vessels in the mouse brain. *Neurosurgery* 2006;59:374-82.
- 5) Firestein GS. Starving the synovium: angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1999;103:3-4.
- 6) Storgard CM, Stupack DG, Jonczyk A, Goodman SL, Fox RI, Cheresch DA. Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with alpha v beta 3 antagonist. *J Clin Invest* 1999; 103:47-54.
- 7) Jiang S, Walker L, Afentoulis M, Anderson DA, Jauron-Mills LL, Corless CS, et al. Transplanted human bone marrow contributes to vascular endothelium. *PNAS* 2004;101:16891-6.
- 8) Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang JS, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7:430-6.
- 9) Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams MM, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133

- by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000;95:952-8.
- 10) Massa M, Rosti V, Ramajoli I, Campanelli R, Pecci A, Viarengo G, et al. Circulating CD34+, CD133+, and vascular endothelial growth factor receptor 2-positive endothelial progenitor cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol* 2005;23:5688-95.
 - 11) Hirohata S, Yanagida T, Nampei A, Kunugiza Y, Hasimoto H, Tomita T, et al. Enhanced generation of endothelial cells from CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:3888-96.
 - 12) Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:288-93.
 - 13) Delorme B, Basire A, Gentile C, Sabatier F, Monsonis F, Desouches C, et al. Presence of endothelial progenitor cells, distinct from mature endothelial cells, within human CD146+ blood cells. *Thromb Haemost* 2005; 94: 1270-9.
 - 14) Ruger B, Giurea A, Wanivenhaus A, Zehetgruber H, Hollemann D, Yanagida G, et al. Endothelial precursor cells in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:2157-66.
 - 15) Rafi S, Lyden D, Benzra R, Hattori K, Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2002;11:826-35.
 - 16) De Palma M, Venneri MA, Roca C, Naldini L. Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2003;9:789-95.
 - 17) Shaked Y, Ciarrocchi A, Franco M, Lee C, Man S, Cheung A, et al. Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors. *Science* 2006;313:1785-7.
 - 18) Grisar J, Aletaha D, Steiner C, Kapral T, Steiner S, Seidinger D, et al. Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients of rheumatoid arthritis. *Circulation* 2005;111:204-11.
 - 19) Paleolog E. It's all in the blood: circulating endothelial progenitor cells link synovial vascularity with cardiovascular mortality in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther* 2005;7:270-2.