

23. 天然物による血管系前駆細胞分化の検討

田邊 宏樹

Key words: 骨髄由来前駆細胞, 血管内皮細胞,
分化誘導, 天然物

愛知学院大学 薬学部 医療薬学科
薬用資源学講座

緒 言

世界に類をみないスピードで高齢化する我が国において、動脈硬化性疾患、ことに心筋梗塞を中心とした虚血性心疾患と、脳梗塞・脳出血を中心とした脳血管障害による死亡は、日本人の死因統計上、ガンと並んで大きな位置を占め、死因の30%にも及んでいる。今後、益々その頻度の増加が予想されるため、有効な予防、さらにその治療対策の確立は、喫緊の課題となっている。

動脈硬化病変において、その初期に存在している細胞は、内皮下に進入した単球由来のマクロファージである。更にある程度進行した病変では、内皮細胞の剥離が生じ、むき出しになった中膜層の平滑筋細胞が刺激され、病変を構成する細胞が平滑筋細胞に置きかわってくることになる。この内皮細胞の脱落の際、多少の脱落では周囲の内皮細胞が遊走・増殖し、再内皮形成を行った結果、病変進行を抑制する。しかしながら、脱落した内皮細胞が多い場合には、これでは修復しきれず、更なる病変進行へとつながる。つまり、内皮細胞の脱落が生じて、速やかに再内皮形成が行われれば、病変進行は抑制できると考えられている。

動脈硬化の治療としては、高血圧や高脂血症、糖尿病や喫煙などの危険因子を除外するための薬物療法や食事療法、運動療法などの他に、血管病変に直接施行される冠動脈インターベンションやステント留置などの血管形成術があげられる。前者は、侵襲によるストレスがなく、患者の負担を軽減できる反面、動脈硬化病変そのものを標的にしている訳ではないため、治療にかなりの長期間を有する欠点がある。一方、後者では、治療の効果が術後すぐに確認できるが、数十パーセントの確率で生じる再狭窄の発生が問題となっており、さらに侵襲による患者へのストレスも、患者に高齢者が多い点からみても問題となっている。このようなことから、動脈硬化に直接作用する薬物の開発は、外科的治療しかなかった治療法に加えて、内科的な治療も選択肢のひとつとなることから、患者サイドから見ても、大変有用なことであると言える。

一方、ここ数年の幹細胞研究の急速な発展によって、骨髄中もしくは血液中に血管内皮細胞や平滑筋細胞に分化し得る細胞（血管系前駆細胞）の存在が報告された。この前駆細胞は、先に記述した内皮細胞の大量剥離の際に、遠隔地から剥離部位に動員されて、再内皮形成を行う。つまり、骨髄中もしくは血液中の前駆細胞の中で、より内皮細胞に分化するような作用を有する薬物が見つかれば、動脈硬化症や再狭窄などの血流障害性疾患に有効であると考えられる。そこで本研究では、生薬や漢方方剤を天然資源として、骨髄細胞及び血液中の血管系前駆細胞をより内皮細胞に分化する作用を有する天然化合物の探索を行うこととした。

方法および結果

クリーンベンチ内で、雄性 C57BL/6J マウス（6 週齢）より両大腿骨及び脛骨を回収し、氷冷した RPMI1640 培地（1% 抗生剤, 10% FBS）中に保存した。回収した骨の両端を切開し、氷冷した RPMI1640 培地を用いて骨髄細胞を回収した。凝集している細胞を除去するため、得られた骨髄細胞懸濁液を Cell strainer (70 μ m Nylon) を用いて、シングルセル浮遊液を回収した。遠心分離後、ACK Lysing Buffer を用いて赤血球を除去し、骨髄細胞数を血球計数盤にてカウントした。

当初の予定では、得られた細胞を磁気細胞分離法にて Lineage⁻ 細胞に分画したものから、分化を試みる予定であったが、最終的に内皮細胞への分化を確認するための評価を後に示す、フローサイトメトリーを用いて実施するためには、十分な細胞数が確保できないことから断念することとなった。

そこで、今回の検討では、骨髓細胞をそのまま分化させる系を用いて評価を実施した。得られた骨髓細胞を DMEM High glucose 培地（1% 抗生剤，10% FBS）に懸濁し、あらかじめフィブロネクチン（12 μ g/mL 溶液を用いて，37°C で3時間以上）でコーティングした 12-well Plate に，5.0 \times 10⁶ cells/well で播種した。3時間後，非接着細胞を除去し，内皮細胞への分化誘導培地として，EGMTM-2MV Microvascular Endothelial Cell Growth Medium-2 BulletKitTMを基本培地として，血清濃度を 20% とし，さらに各種生薬メタノール抽出エキスを 100 μ g/mL の濃度になるように添加して，6日間培養し分化誘導を行った。スクリーニングに用いた生薬のリスト及び生薬 1 g から抽出したメタノールエキス重量を表 1 に示す。

表 1. 検討した生薬メタノールエキス及びその収量

Table 1. 検討した生薬メタノールエキス及びその収量

No.	生薬名	生薬ラテン名	収量 (g)
1	インヂンコウ	Artemisiae Capillaris Flos	1.46
2	ウイキョウ	Foeniculi Fructus	0.38
3	エンゴサク	Corydalis Tuber	0.06
4	オウギ	Astragali Radix	2.81
5	オウゴン	Scutellariae Radix	1.71
6	オンジ	Polygalae Radix	3.05
7	ガイヨウ	Artemisiae Folium	1.51
8	カシュウ	Polygoni Multiflori Radix	0.94
9	カクコン	Puerariae Radix	1.73
10	カロコン	Trichosanthis Radix	0.12
11	カロニン	Trichosanthis Semen	0.95
12	カンキョウ	Zingiberis Processum Rizoma	0.63
13	カンゾウ	Glycyrrhiza Radix	2.31
14	キキョウ	Platycodi Radix	1.38
15	キクカ	Chrysanthemi Flos	1.66
16	キジツ	Aurantii Fructus Immaturus	2.47
17	キョウカツ	Notopterygii Rhizoma	2.99
18	キョウニン	Armeniaca Semen	1.10
19	クジン	Sophorae Radix	1.69
20	ケイガイ	Schizonepetae Spica	0.68
21	ケイヒ	Cinnamomi Cortex	0.61
22	コウカ	Carthami Flos	2.54
23	コウブシ	Cyperii Rhizoma	0.70
24	コウボク	Magnoliae Cortex	2.06
25	ゴシツ	Achyranthis Radix	1.88
26	ゴシュユ	Evodiae Fructus	1.77
27	ゴボウシ	Arctii Fructus	0.81
28	ゴミシ	Schisandrae Fructus	3.55
29	サイコ	Bupleuri Radix	1.65
30	サイシン	Asiasari Radix	1.39
31	サンシシ	Gardeniae Fructus	2.85
32	サンシュユ	Corni Fructus	5.47
33	サンショウ	Zanthoxyli Fructus	2.54
34	サンソウニン	Zizyphi Spinosi Semen	0.37
35	サンヤク	Dioscoreae Rhizoma	0.55
36	ジオウ	Rehmanniae Radix	4.27
37	ジコッピ	Lycii Cortex	0.47
38	シツリシ	Tribuli Fructus	0.47
39	シャクヤク	Paeoniae Radix	2.12
40	シャゼンシ	Plantaginis Semen	0.07
41	シュクシャ	Amomi Semen	0.24
42	ショウキョウ	Zingiberis Rhizoma	0.89
43	ショウマ	Cimicifugae Rhizoma	1.37
44	シンイ	Magnoliae Flos	1.5
45	センキュウ	Cnidii Rhizoma	2.25
46	センコツ	Nupharis Rhizoma	1.25

生薬 10 g にメタノール 100 mL を用いて一晩抽出したエキスを濃縮乾固し，DMSO にて溶解し試験液として用いた。

内皮細胞としての評価は，造血前駆細胞や内皮細胞に発現がみられる，細胞表面抗原 CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) の発現量をフローサイトメトリーで解析することとした。また，変性 LDL の取り込みについて，Dil 標識された Acetyl-LDL (Ac-LDL) (Molecular Probes) の細胞内への取り込み量で評価した。こちらの場合，内皮細胞及び平滑筋細胞どちらでも認められる活性（ただし，内皮細胞 < 平滑筋細胞）となる。つまり，内皮細胞への分化誘導系であるが，より内皮細胞へ分化誘導したか，平滑筋細胞へ分化誘導したかを検討できるものであると考えた。方法としては，分化誘導が終了した細胞に，Dil 標識 Ac-LDL (1 mg/mL) を EGM-2MV 培地で 500 倍希釈し，細胞へ添

加し2時間培養した。セルスクレイパーを用いて細胞を剥離し、5 mL ラウンドチューブに回収した。遠心分離 (1,000 rpm, 5分) 後、上清を破棄し、細胞を PBS で洗浄した。APC 標識した抗 CD31 抗体 (BD Biosciences) 200 ng 分を各ラウンドチューブに添加し、遮光下 4℃ で1時間反応させた。反応が終了したら PBS で3回洗浄した後、フローサイトメトリーにてそれぞれの蛍光強度を測定した。前方散乱と側方散乱のデータから細胞集団にゲーティングし、その細胞集団の蛍光強度を測定した。

今回、生薬メタノール抽出エキス 46 種類について検討を行った。図 1 には、細胞集団に対する陽性細胞数の割合を CD31+細胞 (A)、Ac-LDL+細胞 (B) 及び CD31+/Ac-LDL+細胞 (C) について示した。

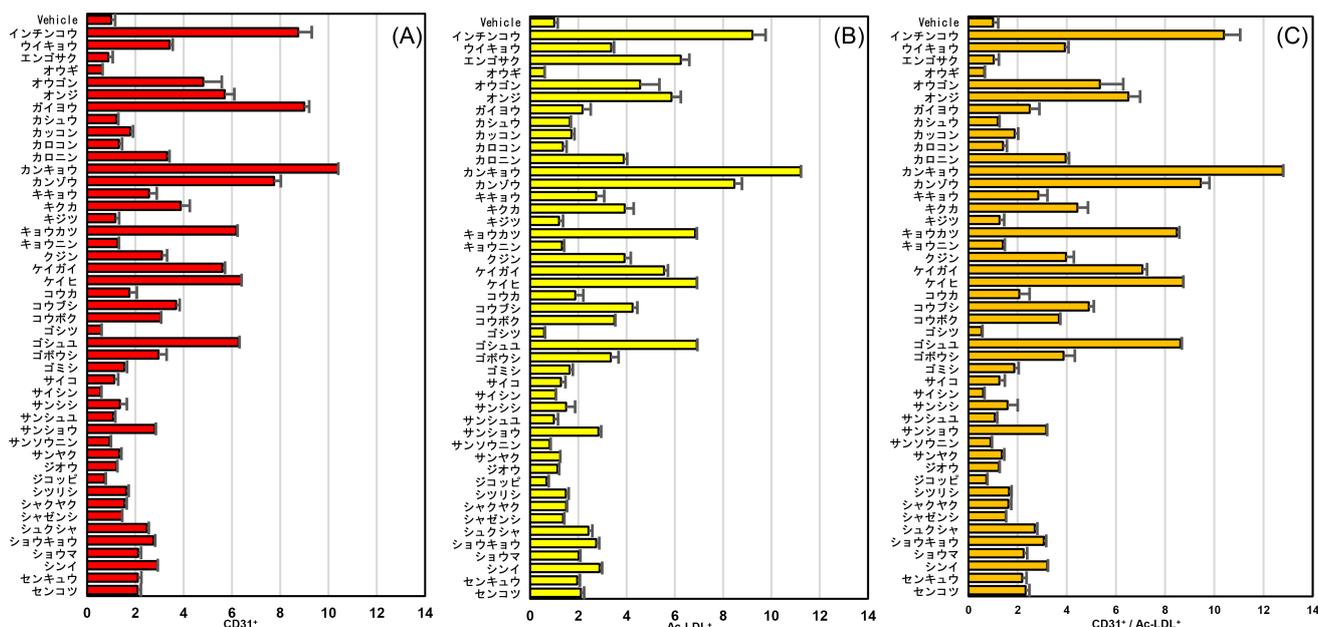


図 1. 各陽性細胞数の割合。

添加溶媒である DMSO を添加した Vehicle の数値を 1 としたときの相対値で示す。

CD31 及び Ac-LDL の両者ともに陽性となった生薬エキスとして、インテンコウ、オンジ、カンキョウ、カンゾウ、キョウカツ、ケイガイ、ケイヒ、ゴシユの 8 生薬に活性が認められ、なかでも、インテンコウとカンキョウについては、10 倍以上の強い活性であった。一方、CD31 のみ陽性を示した生薬エキスとしてガイヨウが、Ac-LDL のみ陽性を示した生薬エキスとしてエンゴサクが存在した。また、図 2 には、細胞の平均蛍光強度を元に、Vehicle に対する相対値で示した。図 1 の結果とほぼ同様の結果であった。

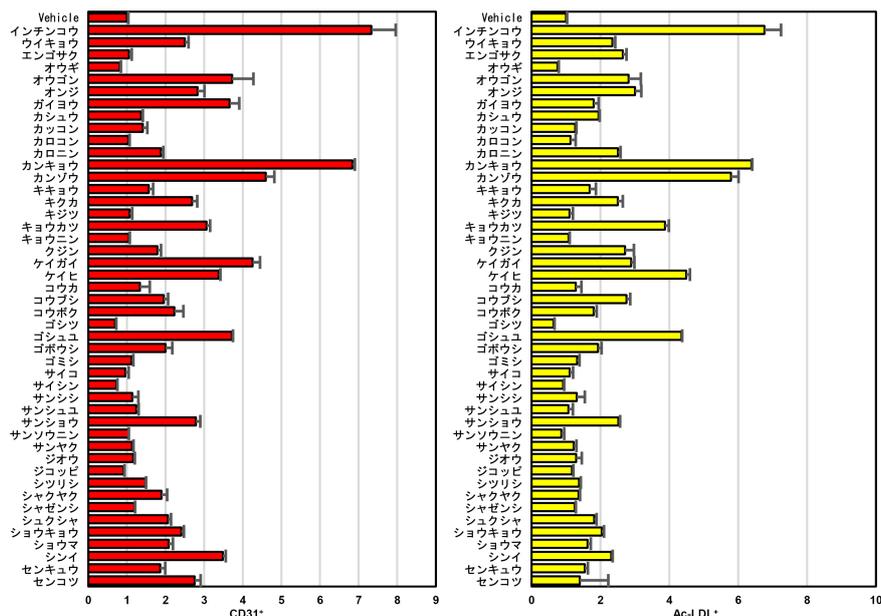


図 2. 各細胞の平均蛍光強度.

添加溶媒である DMSO を添加した Vehicle を 1 としたときの相対値で示した.

考 察

今回、マウス骨髄細胞に存在する前駆細胞から、血管内皮細胞もしくは平滑筋細胞への分化誘導に対して、漢方方剤に繁用される生薬エキスによる修飾作用を検討することを目的として研究を実施した.

当初骨髄細胞からの分化誘導系として、より分化誘導を見るために、細胞集団をある程度限局して実施しようと考えた. いくつかの方法が報告されていたが、今回は磁気細胞分離法を用いて Lineage 陰性の細胞集団から分化誘導している Beltrami らの報告を参考に実施した²⁾. しかしながら、十分な細胞数が確保できなかったため、骨髄細胞中の接着細胞を選別し、分化誘導する方法に変更した³⁾.

46 種類の生薬メタノールエキスを用いて、骨髄細胞の血管内皮細胞分化をより誘導する活性についてスクリーニングを実施した結果、8 生薬に CD31/Ac-LDL 取込 両陽性細胞の割合を増加させる活性を見出した. 一方、CD31 陽性細胞を増加させる生薬としてガイヨウを、Ac-LDL 取込を増加させる生薬としてエンゴサクも見出した. つまり、エンゴサクは血管内皮細胞への分化誘導に対して血管平滑筋細胞への分化を促進する活性を有するものと考えられる. また、ガイヨウは、CD31 の発現量のみ増加させ、変性 LDL の取り込みは促進しなかったことから、部分的な内皮細胞分化促進作用を有するものと考えられる. CD31/Ac-LDL 取込 両陽性細胞が増加した 8 生薬に関しては、内皮細胞への分化を促進し、機能としての変性 LDL の取り込みも増加させる活性を有していることが考えられた.

今回の検討では、生薬エキスの一部しか検討することができず、またその活性成分の単離や作用機序の解明には至っていない. しかしながら、このような基礎的なデータを蓄積することで、生薬から構成される漢方方剤レベルでもまた化合物レベルでも、動脈硬化症や再狭窄などの血流障害性疾患に有効な内科的治療の確立が可能になるものと考えられる.

文 献

- 1) Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G. & Isner, J. M. : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, **275** : 964-966, 1997.
- 2) Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B. & Anversa, P. : Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, **114** : 763-776, 2003.

- 3) Loomans, C. J., van Haperen, R., Duijs, J. M., Verseyden, C., de Crom, R., Leenen, P. J., Drexhage, H. A., de Boer, H. C., de Koning, E. J., Rabelink, T. J., Staal, F. J. & van Zonneveld, A. J. : Differentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells is shifted into a proinflammatory phenotype by hyperglycemia. *Mol. Med.*, **15** : 152-159, 2009.