

依頼稿 (報告)

平成 23 年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト型研究課題 毛細血管の新しい役割解明と 臨床応用にむけた脈管研究クラスター活動

川 辺 淳 一*

はじめに

大学補助金の削減と平行して増えていく競争的研究
グラントという状況は、端的にいうと「価値のある大
学」が競争を勝ち抜いて生き残りなさいというメッセ
ージです。すなわち、独法化大学にとって生き残って
いくための本質的な課題の一つは、医学研究活動の充
実が挙げられます。おりしも、研修医制度で若手医師
に研修施設の自由選択が与えられ、大学は「研修場」
としての競争にも晒されることになりました。質の高
い臨床医育成のためにサイエンスの素養習得は必要不
可欠であることは世界の医学教育の常識ですが、この
あたりを理解している賢明な若手医師に対して、大学
の「サイエンス素養育成（経験）」のセールスポイン
トを提示できるか？この観点でも、大学における医学
研究活動の充実（これを推進する大学スタッフの育成）
の重要性は非常に高いといえます。

『独創性のある生命科学研究資金援助』制度は、こ
の危機感をうけて打ち出された本学の具体的対策の一
つです。5 年前に「本学の医学研究を盛り上げていこ
う」という研究者同志が集まり、本脈管研究クラス
ター活動が始まりました（図 1）。幸い、本学に、この
熱意を受けとめていただき、21 年度そして 23 年度に
プロジェクト型研究資金援助をしていただきました。

期待に応え、外的競争資金を獲得できる「世界に誇
れる優れた研究」を、人材・資金の限られた地方単科
大学でどのように育てていくか？ 特効薬はなく、打

開策の基本『限られた力の有効な連携』と『優れた研
究シーズの創生』を地道に実践していくことにつつま
す。前者に関して、多くの疾患病態に密接に関与する
脈管研究は、疾患特異性の垣根を越えた研究グルー
プとの連携により、さらに効果的に研究が展開でき
る、あるいは新しい研究シーズが創生しえる研究分野
という特徴があります。現在、脈管研究クラスターを
構成する PI の先生方の所属する講座は、臨床および基
礎講座 8 つに及びますが、具体的な研究対象は異なる
ものの、脈管研究自体の認識や興味について、共通
して高いことが、我々の研究クラスターの『連携』の
強みでもあります。

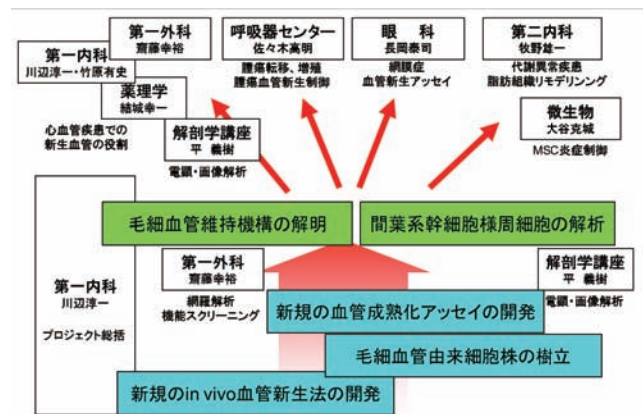


図 1 旭川医科大学 脈管研究クラスター

脈管研究をキーワードに、三つの基礎講座と五つの臨床講
座所属の PI (principle investigator) が連携して、新しい「毛
細血管新生」プロジェクトを創生し、さらに医療開発を目指
して、各専門分野で研究を展開していく。

*旭川医科大学 心血管再生先端医療開発講座

「複数の研究プロジェクトを創生できる幹となるような研究シーズをいかに育てていくか？」 21 年度から進めている我々の研究プロジェクトを概説します。

研究背景

難治性疾患と毛細血管

生体最大の臓器である脈管、その 90% 以上を占める毛細血管。栄養・酸素を組織の隅々に運ぶ毛細血管が適正に維持しなければ、多くの組織が正常に機能維持することは不可能であることは、直観として理解できる。しかし、様々な疾患における毛細血管の重要性が認識されるようになってきたのは、ごく最近のことである。現在では、悪性腫瘍や網膜症はもとより、心不全、動脈硬化性疾患や糖尿病などの代謝性疾患などの難治性慢性疾患の病態にも毛細血管の異常が関与していることが明らかになってきた。

組織リモデリングと毛細血管

組織の多くは再生能があり、これが臓器障害後の治療（再生や代償リモデリング）ばかりでなく、慢性疾患の病態に密接に関わる組織の異常リモデリングをもたらす。組織の再生能を裏付けるように、多くの組織内幹細胞の存在が相次いで報告されている。しかし、その組織内局在や「幹細胞機能」の維持システムについては詳細が不明であり、したがって、組織内幹細胞の臓器再生やリモデリングにおける役割も不明である。最近、毛細血管内皮周囲環境（vascular niche）が幹細胞維持に重要であること、障害組織の再生において、組織実質細胞の再生を担う組織幹細胞のまえに、その幹細胞の足場となる毛細血管の構築が前提条件であることが明らかになってきた。

再生医療と毛細血管

ノーベル賞受賞の山中先生の開発された iPS 細胞によって、再生医療・組織再生への応用の期待が一層高まっている。“幹（実質前駆）細胞の生体導入による臓器再生” という単純なシナリオではないことがわかってきた現在、いわゆる次世代の臓器再生治療法の開発の時代にはいつてきたともいえる。本格的な組織再生療法の開発のためには多くの課題があるが、その中でも本質的な課題のひとつは、組織実質細胞への分化誘導とともに、それぞれの再生組織における毛細血管

を含む脈管系をどのように再構築していくか？ ということである。

秘めた毛細血管のポテンシャル

周細胞（Pericytes; PCs）は、脆弱な内皮管腔の外側を囲み、毛細血管として安定した構造をつくり、さらに自ら平滑筋細胞へ分化・増殖し、血管成熟化にも関与することが知られている（図 2）。最近、PCs の中に間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cell; MSC）の機能をもつ細胞の存在が明らかにされた。間葉系幹細胞様の周細胞（MSC-PCs）の発見により、毛細血管は、単なる『循環器』でなく『組織リモデリングや再生』にも重要な役割をもち、これらの役割解明は、様々な難治性慢性疾患の病態解明あるいは新規治療の開発、臓器再生医学における応用に繋がるのが期待される（図 2）。

研究内容

毛細血管研究の問題点と打開策

新生血管・毛細血管研究には、研究発展の期待と裏腹に、その進展を阻むいくつかの障害がある。ひとつは、毛細血管は、微小かつ組織内で複雑に分布するため、客観的観察や評価が難しく、研究対象として臓器（二次元に展開する網膜血管）や動物種などの制約が多い。さらに、微小な毛細血管由来の内皮細胞（ECs）や周細胞（PCs）（特に最近発見された MSC-PCs）を

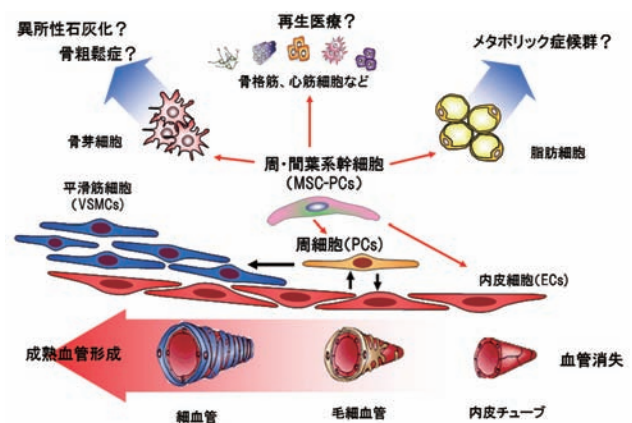


図 2 間葉系幹細胞—周細胞から見てくる新しい毛細血管の役割

毛細血管内皮（ECs）の外側に付着している周細胞（PCs）は、毛細血管の安定化・成熟化に重要な役割を有している。最近、間葉系幹細胞（MSC）の機能を持つ細胞（MSC-PCs）が発見され、有力な組織内幹細胞としての役割が期待される。

選択的かつ効率よく同定・調整する方法がないのが現状である。

我々は、先行する「末梢神経による血管成熟化」研究（平成 21 年度 独創性のある生命科学研究）のなかで、「生体内の末梢組織の毛細血管形成を二次元で観察する方法（CCT angiogenesis assay）」を開発し、マウスの末梢組織の毛細血管形成を客観的に観察することを可能にした（論文 1 投稿中）。さらに、不死化細胞を創れる温度感受性 SV40T 抗原発現マウスの「CCT 毛細血管組織」から内皮細胞 (ECs)、周細胞 (PCs) 細胞株、さらに MSC-PCs 細胞株の樹立に成功した（論文 2 投稿中）（図 3）。我々が独自に開発した「末梢毛細血管観察法」と「末梢毛細血管由来細胞株」という研究ツールを利用して以下のプロジェクトを展開している。

プロジェクト 1 毛細血管維持機構の解明

1-1 新規 *in vitro* 血管新生アッセイ法の開発

従来の *in vitro* 血管新生アッセイは、HUVEC など大血管由来内皮細胞を用いた内皮チュービング形成を評価するもので、今後、必要性が増す内皮・周細胞からなる毛細血管やさらに成熟した血管形成を評価する方法はなかった。また大血管由来内皮細胞と毛細血管由来内皮細胞との特性の違いが知られるようになり、HUVEC を用いた血管新生能評価自体にも大きな問題がでている。我々は、毛細血管由来の ECs および PCs の 3 次元ゲル共培養により、EC チューブの外周に PCs が付着した毛細血管様構造を形成させるシステムを構築した。本方法は、毛細血管由来細胞を利用した成熟血管形成を評価できる新規の血管アッセイ法として、その商品化を目指して開発を進めている（特許申請中、クラボウ株共同研究）。

1-2 血管成熟化を制御する因子の同定

毛細血管の維持さらに成熟化を制御する因子の探索にあたり、毛細血管の安定化・成熟化の過程で重要な内皮細胞と周細胞との相互作用に着目した。上記の血管新生システムを用いて、新生血管内皮と接触して毛細血管を形成している PCs と内皮と接触していない PCs の二群間の遺伝子発現変化をマイクロアレイ (3D gene、東レ) により網羅的解析を行った。毛細血管内皮と接触する PCs 内で有意に変化する新規の遺伝子

を 12 個選定した。さらに SiRNA により候補因子を knock down した PCs を用いた血管新生アッセイによるスクリーニングで、毛細血管形成能が著明に低下する二つの因子を同定している。現在、強制発現システムも利用しながら、*in vivo* での血管新生への影響などの機能解析をすすめている。

プロジェクト 2 MSC-PC 細胞の特性解明

MSC-PCs は、自ら内皮と周細胞に分化して『毛細血管』を形成することができ（図 3）、①脈管器としての循環システムと②幹細胞機能を保持する環境 (vascular niche) を提供することに加えて、③組織幹細胞として実質細胞を供給する細胞でもある。したがって、MSC-PCs は、組織再生の観点でも非常に合目的な幹細胞であり、組織リモデリング研究における重要な研究標的であり、再生医療細胞ツールとしても期待できる（図 2）。

2-1 分化能の程度の異なる MSC-PCs ライブラリーの構築

多分化能をもつ MSC-PC 株の中で、長期間継代培養 (60 継代以上) するなかで自然に分化能が低下する細胞株を認めた。この細胞株から再びクローン孫細

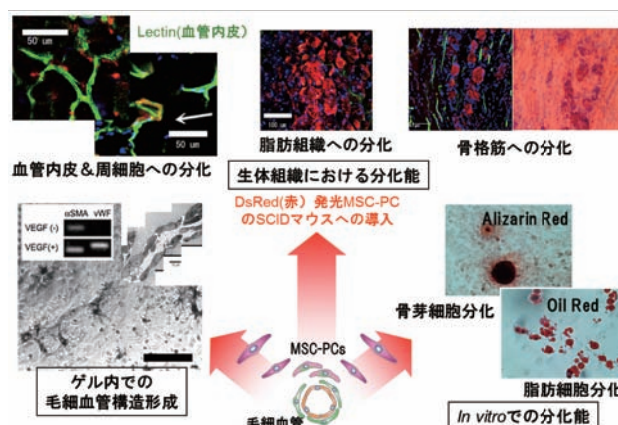


図 3 間葉系幹細胞 (MSC) 機能を有する周細胞株 (MSC-PCs) の樹立

温度感受性 SV40T 抗原発現マウスの末梢毛細血管から、NG2 陽性細胞を精製し、その中から MSC-PCs 細胞株を樹立した。同細胞は、周細胞および MSC としての特徴的な遺伝子プロファイルおよび間葉系細胞への多分化機能を保持している。また、単一の MSC-PCs から、周細胞はもちろん内皮細胞に分化し、成熟した毛細血管構造を構築することができる。

胞株を作成した。この中で、代表的なマーカー遺伝子プロファイルに変化がないものの、多分化能の程度が異なる幾つかの細胞群を作成することができた (図4)。この細胞ライブラリーを用いて分化能という機能特性の差がある二つ以上のクローン細胞群でアレイ比較解析することにより、機能に連関する候補遺伝子の抽出効率が飛躍的に上がることができ、実際に以下の成果がでている。

2-2 MSC-PC 細胞の同定・分離法の開発

MSC-PC 細胞マーカーとして有用な因子選定の条件として、上記細胞ライブラリーを利用したアレイ解析において①MSC 機能が高い MSC-PCs (#7) に特異的に高発現している、②(特に細胞分離用のマーカー候補として)細胞表在の因子 という条件で4つの候補因子を選定した。すでに1つの候補因子について、その特異的抗体を用いたフローサイトメトリ解析により MSC-PCs に発現していることを確認している。現在、FACS システムを用いて、本候補マーカー (抗体) によって選択的に組織から MSC-PCs が分離できるか確認するとともに、残りの細胞マーカー候補因子についても検討している。

2-3 MSC-PC 細胞の幹細胞機能維持を制御する新規因子の同定

「幹細胞機能」の程度 ((高) MSC# 7 ⇔ # 3 ⇔ # 9 (低) の順列 (図4)) で変化する遺伝子群をクラスター・パスウェイ解析も考慮しながら、特に核内に局在する転写因子群に注目して、新規の候補因子 (15 個) を選定した。SiRNA により候補因子を knock down した MSC-PCs の間葉系分化機能アッセイスクリーニングにより、MSC-PCs の分化能に著明に影響 (上昇および抑制) を及ぼす4つの新規因子を同定している。

今後、候補因子の過剰発現系も構築し、その分化能への影響を確認していく予定である。

2-4 MSC-PC 細胞による抗炎症作用の解明

癌、メタボリック症候群や動脈硬化症を含め多くの慢性疾患の基盤病態として慢性炎症が注目されている。慢性炎症の普遍的な病理的特徴として『炎症浸潤』と共に『血管新生』があげられる。従来より「炎症細胞の輸送路」という位置づけで認識されている新生血管であるが、MSC-PCs の存在により、慢性炎症における血管新生の新しい役割が示唆される。間葉系幹細胞には、免疫・炎症抑制効果をもつことが知られているが、我々は、一連の網羅解析のなかから、PCs において炎症反応を制御する興味深い因子が強発現していることを見出している。今後、炎症の制御という観点

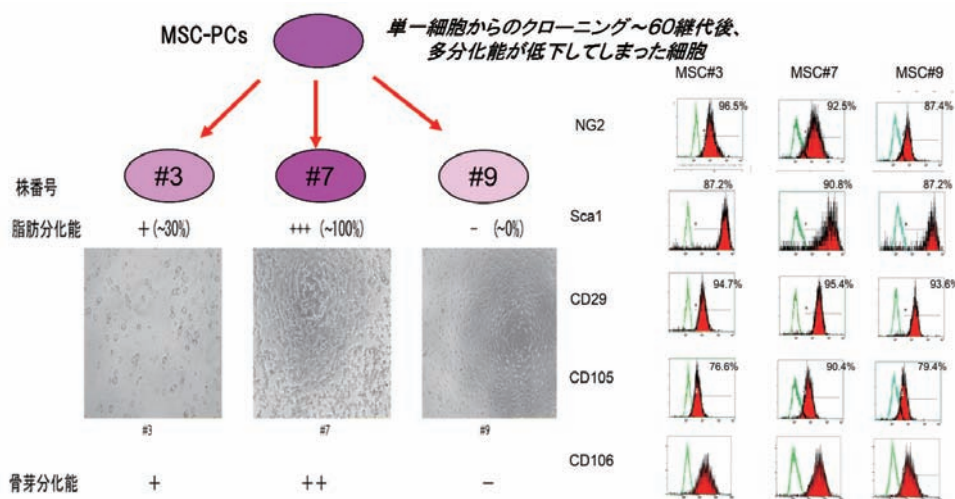


図4 分化能が異なる MCS-PC 細胞株ライブラリーの構築

長期の継代の中で、分化能が低下してきた MSC-PCs クローン細胞から、再度、クローン細胞 (娘) 株を作成した。この細胞株は、代表的な MSC や PC マーカー遺伝子発現に大きな変化がないものの、高い分化能を保持する細胞株 #7 や、分化能が低下した #3、ほとんど分化能がなくなった #9 などが樹立された。「細胞分化能」指標にしたクローン細胞3群でのアレイ比較解析を行うことにより、幹細胞機能に連関する因子を効率よく選定することができる。

で、慢性炎症における毛細血管の新しい役割の可能性を検証していきたい。

おわりに

本邦も含め多くの先進国の医療社会で重要性が増している難治性慢性疾患の病態解明にむけて血管新生研究は、大変注目されている新興研究分野の一つです。この競争の激しい研究分野において、我々は、独自に開発したツールを駆使して研究展開していこうとしています。我々の研究プロジェクトも、様々な難治性慢性疾患における「臓器再生・リモデリングを制御する分子標的薬剤の開発」から「再生医療にむけた iPS 細胞から MSC-PCs 調製」まで、いろいろな臨床応用に繋がる発展性が期待されます。知的財産センターの尾川直樹先生のご尽力もあり幾つかの民間会社にも興味をもっていただき、現在、①血管新生アッセイ法の開発に関してクラボー株式会社、②本プロジェクト全般に関して、いくつもの臨床薬開発の実績のあるアスピ

オフィーマー株式会社との共同研究契約を結び、資金および技術的支援を得ています。

今後、様々な疾患病態における毛細血管形成制御に関わる新規因子や MSC-PCs の役割について、脈管研究クラスターの各 PI の先生方を中心に各専門分野で、新しい研究シーズとして展開していくことを願っています (図 1)。もちろん、本稿あるいはホームページを見て、本研究テーマに興味をもっていただいた先生との共同研究も大歓迎です。連絡をお待ちしています。

最後になりましたが、我々の研究活動にご理解とご支援をしていただいている吉田晃敏学長ならびに研究戦略・教育支援室の諸先生方、さらに知的財産や産学連携、競争資金獲得活動などで、ご支援していただいている産学連携や研究支援の事務局の多くのスタッフの方々に感謝いたしますとともに、引き続きのご支援をお願い致しますと思います。