

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2015.2) 15,1:94-98.

平成25 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幹細胞 (Capillary Stem Cells) の再生医療応用プロジェクト創生にむけた包括的研究活動

川辺 淳一

依頼稿 (報告)

平成 25 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 毛細血管幹細胞 (Capillary Stem Cells) の再生医療応用 プロジェクト創生にむけた包括的研究活動

川 辺 淳 一*

はじめに

我々の講座 (心血管再生先端医療開発講座) と、本学の 4 つの基礎講座と 4 つの臨床講座に所属する脈管研究に携わる研究医と共に、講座の垣根を越えた共同・連携研究活動を行ってきた (旭川医科大学・脈管研究クラスター活動)。本活動は、本学の独創性のある生命科学研究グラントの支援を受け、研究シーズの創生と外的研究資金獲得の上での研究プロジェクトを展開している。

脈管研究クラスター活動から、①独自に樹立したマウス毛細血管細胞株の中に多分化機能をもつ幹細胞 (毛細血管幹細胞) を見出した (特許申請中)。②本細胞株を用いた網羅的アレイ解析により、血管新生を制御する新規因子や、毛細血管幹細胞を同定するマーカーを同定することに成功してきた。毛細血管の形成や機能を調節する新規因子・細胞の同定は、循環器だけでなく様々な疾患病態解明に応用できる点が、大きな魅力である。平成 25 年度独創性のある生命科学研究 (プロジェクト型研究) で採用された課題目標は、これらの新規因子や幹細胞の臨床応用にむけたプロジェクトへの発展に向けての基盤づくりである。本稿では、これらの研究プロジェクトの概要と、これまでの研究成果と今後の展望について報告する。

本プロジェクトの概要

1. 高齢化社会で重要性の増している老化関連難治性

疾患と毛細血管研究

毛細血管は、体内の隅々に分布する生体最大の臓器であり、その存在は多細胞生物にとって各細胞が正常な機能を維持するために本質的なものといえる。毛細血管の機能異常や、脆弱化、消失などの形態異常は、癌や網膜症に加えて、動脈硬化や慢性心不全といった、老化に関連する多くの難治性慢性疾患の病態に深く関与することが明らかになってきた。また、慢性疾患を背景とする臓器障害の共通終末病態である線維化においても、毛細血管由来細胞が重要な役割をもつことが報告されている。したがって、毛細血管研究は、高齢化社会で直面している多くの老化関連の難治性疾患の治療開発の上で、非常に期待される新興研究分野である。

2. 毛細血管研究の問題点と毛細血管細胞株の樹立

これまでの血管新生に関する研究対象は、内皮細胞が中心であった。しかし、生体内における微小血管のほとんどが、内皮細胞によるチューブ構造に周細胞が覆う「毛細血管」として存在している。周細胞は血管の透過性や収縮性に重要な役割をもつ。また内皮細胞との相互作用は、血管機能だけでなく、血管の形態、すなわち毛細血管として維持するか、消失するのか、あるいは、さらに大きな血管に成熟するかを規定している。さらに、最近では周細胞の中に幹細胞様の細胞の存在が明らかになり、毛細血管は血液を循環させる「導管」だけでなく、組織再生やリモデリングにも直接関わる「再生システム」としての役割をも担う可能

*旭川医科大学 心血管再生・先端医療開発講座

性が示唆されている。

今後、血管周細胞、さらに内皮細胞との相互作用の解明が、臨床応用に繋がる血管新生研究において重要なターゲットとなってくる。しかし、内皮細胞に比べ、周細胞の調整が難しく、これが同研究の進展を大きく妨害している。我々は、微量な細胞から不死化を可能にする SV40 温度感受性 T 抗原発現マウスを用いて、独自の 방법으로調整した組織サンプル¹⁾ から、毛細血管由来細胞株を樹立することに成功した²⁾。本細胞を利用することにより、毛細血管形成に関わる新たな機序解明の糸口が見えてきた。

3. 毛細血管の維持・形成を制御するための新規因子および細胞の発見

毛細血管内皮細胞と周細胞との三次元ゲルにおける共培養下で、毛細血管様構造を再構成するシステムを開発した²⁾。本システムにおいて、異なる蛍光発光する内皮、周細胞を利用することにより、新生血管内皮と接触することによって周細胞あるいは内皮細胞ごとに変化する遺伝子を抽出することができる。抽出された候補遺伝子の中から、血管新生を調節する新規の分子 Nxxx を見いだすことに成功した（次項 2 参照）。

また、毛細血管周細胞株の中で間葉系幹細胞様の多分化能を示す細胞を見いだした。これまで、分化能を有する周細胞を特定するマーカーは発見されておらず、分化能を持たない他の周細胞と区別・分離することができなかった。我々は、多分化能の程度の異なる周細胞株を用いた網羅的遺伝子解析から、周細胞の多分化能と関連する遺伝子を抽出した。これらの候補因子は、多分化能周細胞の機能を司る可能性がある。現在、この候補因子の中から、多分化能周細胞に密接に関係する二つの因子を見いだすことに成功した。一つは、細胞表面に局在する分子 Exxx で、これに対する特異的抗体を用いることにより、「細胞マーカー」として正常組織から多分化能周細胞を同定、精製することに成功した（次項 1 参照）。もう一つは、同細胞の多分化能を制御する新規の因子 Sxxx である（次項 3 参照）。（知財保護の関係で、現時点で特定因子名を公表できない点をご了承ください）

研究成果と今後の展望

1. 毛細血管幹細胞 (Capillary Stem Cells) の発見

独自の細胞マーカー Exxx に対する抗体を用いて、マウス皮下脂肪および骨格筋組織などの正常組織から多分化能をもつ新規の毛細血管幹細胞を同定、単離することに成功した。独自の標識マーカーで同定された毛細血管幹細胞は、自ら血管構成細胞（内皮および周細胞）となり成熟安定した血管網を構築し、さらに、間葉系中胚葉細胞にとどまらず神経系外胚葉細胞への分化能をもつユニークな特性を有している。さらに、生体組織内導入により毛細血管とともに組織実質細胞へ分化し、従来の組織幹細胞にない高い組織再生能を示した。そこで、本細胞は、新規の組織幹細胞として毛細血管幹細胞 (Capillary stem cells; CapSCs) と命名した（特許申請および論文投稿中）。

(1) ヒト CapSCs の分離および機能解析（心血管再生先端医療開発講座（川辺、竹原有史先生）、第一外科講座（齋藤幸裕、宮本和俊、東 信良先生）、解剖講座（平義樹、板東良雄先生））

すでに開発したマウス CapSCs 分離法を応用して、ヒト組織からの CapSCs 分離を試みた。宮本先生（小児外科）のご協力により、小児（一か月年齢）の皮下脂肪組織から Exxx 陽性周細胞を分離培養に成功している。同細胞の増殖性は高く sphere 形成能をもち、血管、脂肪や神経細胞への多分化能を保持していることを確認している。同細胞の画像解析および神経分化評価においては、平義樹および板東良雄先生（解剖学講座）の協力を得ておこなっている。

(2) CapSCs の下肢虚血改善効果（心血管再生先端医療開発講座（川辺）、第一外科講座（齋藤幸裕先生））

正常マウス皮下脂肪組織から分離した CapSCs (NG2+Exxx+ cells) を、ヌードマウス大腿動脈を全摘出した重症下肢虚血モデルの虚血組織へ導入することにより、対照周細胞 (NG2+Exxx- cells) に比べて、高い虚血下肢還流改善効果を示すことを確認した（図 1 A）。

(3) CapSC s の骨格筋再生効果（心血管再生先端医療開発講座（川辺）、第一内科・神経内科（齋藤

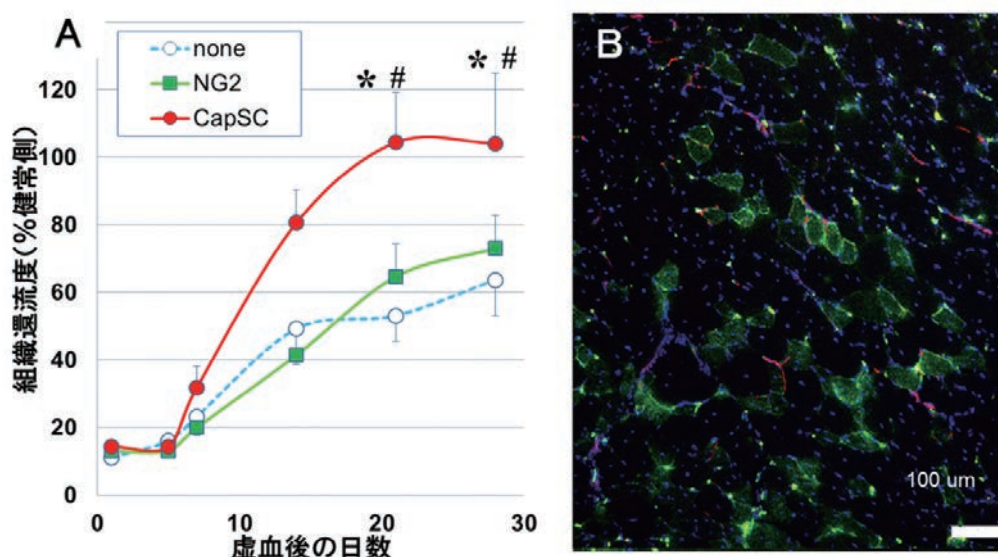


図1 マウスCapSCsの下肢虚血改善効果および骨格筋組織再生能

A マウス大腿動脈結紮モデルにおいて、虚血部位にCapSCおよび対照周細胞(NG2+細胞)を局所導入し、その後の組織還流をドップラー血流計で評価した。

B マウス腓腹筋をcardiotoxinで挫滅させた後、GFP発光CapSCを導入した。3週間後、循環血管をlectin-DsRed(赤)で染色した後、導入細胞(緑)の局在を観察した。

司先生)

免疫不全 SCID マウス腓腹筋を cardiotoxin により挫滅させた後、蛍光物質 GFP 発現するマウス皮下脂肪由来の CapSCs を導入し、骨格筋再生能を評価した。対照周細胞にくらべ、著明な骨格筋再生効果を確認することができた。GFP 陽性 CapSCs は、組織導入後も GFP 陽性として存在し、組織内局在を観察することができる。導入した CapSCs は、効率よく骨格筋繊維および血管に分化し、組織内に生着していることが確認できた(図 1 B)。CapSCs の高い骨格筋再生能を確認できたので、今後、デュシェンヌ型筋ジストロフィー動物 (mdx / nude マウス) を用いて、CapSCs 導入の治療効率を評価していきたい。

(4) CapSCs の異常網膜血管改善効果 (眼科講座 (横田陽匡、長岡 泰司先生))

広範な低灌流領域から病的な網膜血管新生が起きる酸素誘導網膜血管新生 (OIR) モデルを作成し、眼球への細胞導入法を確立した。OIR モデルマウスにおいて CapSCs 細胞を導入する事により病的な網膜血管新生を抑えて、さらに正常な毛細血管網の構築を促すことが観察された(図 2)。今後、さらに実験数をかさね、併せて、導入細胞の網膜内局在など観察していく。また、レーザーにより網膜色素上皮とブロック膜を傷害

することにより脈絡膜血管新生を誘導するモデル (加齢黄斑変性症モデル) を用いて、CapSCs 導入の有効性を確認していきたい。

(5) CapSCs の末梢神経障害における効果 (解剖講座 (坂東良雄先生))

上記 (1) の結果、調整された primary CapSCs 細胞を用いて、本研究室で確立している脱髄多発性硬化症疾患マウスモデルにおいて、細胞導入療法の効果を評価する予定である。脱髄、神経変性および軸索変性の分子機序の全貌解明ならびに神経再生を目指す上で再髄鞘化における効果的な作用点を探り、本研究で得られた基礎研究成果を土台とした CapSCs を用いた炎症性中枢神経疾患の治療戦略を確立する。

2. 血管新生を制御する新規因子の同定

周細胞の中で、新生血管内皮との接触で上昇する遺伝子群の中から、血管新生に関与する新規因子 Nxxx を同定した。同因子は、血管内皮および周細胞に発現しており、細胞表面に局在し、接着因子として作用する。Nxxx の発現抑制 (knock-down) や過剰発現 (over-expression) 細胞を用いた実験系により、内皮細胞によるチューブ形成には影響しないものの、内皮・周細胞間の接着に作用し、安定した毛細血管形成に重要な役

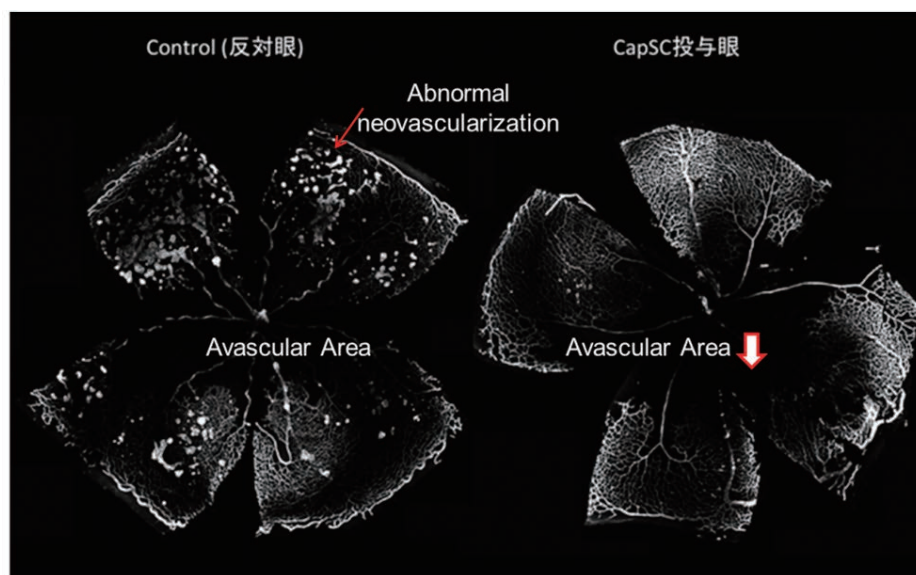


図2 酸素誘発網膜血管新生(未熟児網膜症モデル)におけるCapSCsの効果
 新生仔マウスを高酸素(75%)に曝露すると、いったん形成された網膜血管網が退縮し、引き続きマウスを大気中に戻すことにより相対的に低酸素に陥った網膜において血管網が再生すると同時に、一部の新生血管が網膜外に逸脱する。大気中戻す際に、硝子体側からCapSCsを導入した後、異常血管形成抑制および無血管領域の改善が観察された。(対照は、同一マウスにおいて体側眼球へvehicle導入)

割をもつことを確認している (論文投稿中)。

内皮細胞を標的とした血管新生に作用する薬剤は多く開発されている。今回の知見から、新生血管維持に関わる内皮・周細胞相互作用を制御する新しいタイプの血管新生の調節薬剤の開発が期待される。今後、様々な疾患モデルでの Nxxx の役割解明にむけて、周細胞特異的に Nxxx 遺伝子を必要時にノックアウト誘導できるマウスを作成中である。現在、本研究シーズを基に、心血管再生先端医療開発講座、血管外科講座および眼科講座から、それぞれ独自の研究プロジェクトが誕生し、平成 26 年度以降の外的資金獲得の動きに繋がっている。

3. CapSCs 幹細胞能を制御する新規因子の発見

多分化能を持たない周細胞との比較で、CapSCs に特異的に強く (あるいは低く) 発現している因子を、網羅的アレイ解析で抽出し、さらに一連の細胞機能スクリーニングの結果、CapSCs 分化能に影響する因子 Sxxx の同定に成功した。Sxxx は、多分化能が高い細胞ほど発現量が低く、CapSCs において、Sxxx の発現を抑制すると、その分化能が、さらに亢進することを確認している。現在、本因子が CapSCs に特異的なものか、低分化能周細胞での Sxxx 機能低下で多分化

能を獲得するのか詳細に検討している。

組織の再生・リモデリングに深く関与することが考えられている CapSCs の機能を制御する因子の発見は、CapSCs そのものを利用する臨床応用プロジェクト(上記 2 項参照)とは別に、生体内の CapSCs を標的とする薬剤の開発に結びつく。本研究シーズも複数の研究グループと連携しながら、魅力ある研究プロジェクトに育てていきたい。

最後に

本年度は、マウスおよびヒト組織から primary CapSCs の分離法の確立と特性解析実験を進め、本学の知財構築および関連論文の発表に繋げることができた。次年度以降、ひきつづき各種疾患病態モデルにおける役割を評価し、CapSCs を用いた臨床応用の可能性を多角的かつ効率的に検討し、Proof of Concept 構築させていく予定である。

「CapSCs 細胞導入療法」とは別に、「毛細血管形成や CapSCs の制御因子の発見」は、組織再生やリモデリングに関与する老化関連慢性疾患や慢性炎症性疾患など様々な疾患病態の解明や治療薬開発の糸口になることが期待できる。今後も、脈管研究に限らず、臓器や講座間の垣根を超えた連携研究活動を展開してい

たい。本稿を読まれ、興味を持たれる研究者がおりましたら、ぜひ研究参画を願っている。

本研究クラスター活動の代表研究者と共に、本研究を精力的に進めている大学院生（下内昭人、鹿原真樹、松木孝樹、青沼達也）、研究医スタッフ（暮地元宙己、蓑島暁帆、島村浩平、西村正人）、医学部学生（北川拓、吉村昭人）、そして研究を補助していただいている機器センターの篠河栄利子、各講座の研究助手（松本千恵美、高橋宗乃子、官野香、小田麻美、堀川陽子）のみなさんに深く感謝いたします。また、本研究活動は、旭川医科大学の「独創性のある生命科学研究 Grant」支援のもと、現在のような研究シーズの創生と他大学も含め複数講座との研究連携活動につながっております。文末になりましたが、吉田晃敏学長はじめ、研究支援していただいている本学の諸関係者の皆様に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Asanome A, Kawabe J, Matsuki M, Kabara M, Hira Y, Bochimoto H, Yamauchi A, Aonuma T, Takehara N, Watanabe T, Hasebe N. Nerve growth factor stimulates regeneration of perivascular nerve, and induces the maturation of microvessels around the injured artery. *BiochemBiophys Res Commun.* 2014, 443; 150-5.
- 2) Kabara M, Kawabe J, Matsuki M, Hira Y, Minoshima A, Shimamura K, Yamauchi A, Aonuma T, Nishimura M, Saito Y, Takehara N, Hasebe N. Immortalized multipotent pericytes derived from the vasa vasorum in the injured vasculature. – A cellular tool for studies of vascular remodeling and regeneration -. *Lab Invest.* 2014, 94 ; 1340-50.