

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	吉田 有里
<p>学位論文題目</p> <p>Capillary-resident EphA7+ pericytes are multipotent cells with anti-ischemic effects through capillary formation (EphA7陽性毛細血管周細胞は多分化能を有し、血管形成能を介して、組織虚血を改善する)</p> <p>共著者名</p> <p>鹿原真樹、鹿野耕平、堀内至、早坂太希、富田唯、竹原有史、蓑島暁帆、 青沼達也、丸山啓介、中川直樹、東信良、長谷部直幸、川辺淳一</p> <p>STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE 採択済 (2019) doi: 10.1002/sctm.19-0148</p> <p>研究目的</p> <p>毛細血管は、体中に分布する最大の臓器である。毛細血管は、血管内皮細胞 (ECs) によるチューブを周細胞 (PCs) が覆う構造で、PCsはECsとの相互作用を介して、①血管壁の透過性や収縮などの微小血管機能調節、②血管内皮増殖や血管の成熟などの血管新生に密接に関与する。近年、PCsの一部に、間葉系幹細胞 (mesenchymal stromal cells ; MSCs) 様の多分化機能を持つ細胞が発見され、毛細血管は単なる血液を運ぶ「導管」としてだけでなく、組織のリモデリングや再生に関わる体性幹細胞の「リザーバー (貯蓄場所)」としての役割が推測されるようになってきた^(引用1)。しかし、これまで、多分化能PCsを選択的に分離、同定する適切な方法がなく、同細胞の詳細な細胞特性や生体での役割については不明であった。今回、我々は、多分化能PCsを認識する特異的マーカーを同定し、これにより同細胞を精製し、機能・病態での役割を解析した。</p>			

材 料 ・ 方 法

【多分化能PCsの特異的遺伝子の探索】温度感受性SV40T抗原発現トランスジェニックマウスの末梢組織から樹立した不死化微小血管PCs株^(引用2)から多分化能の程度の違う三種類のPCs株を用いて、PCs多分化能に関連する遺伝子群を抽出するため、アレイ遺伝子発現解析を行った。

【末梢組織内から多分化能PCsの分離】マウス（C57BL6 wildあるいはGFP発現トランスジェニックマウス）の皮下脂肪組織の細胞成分を酵素分散し、培養皿に付着増殖する細胞（脂肪組織由来間葉系細胞（Adipose derived Stromal Cells；ASCs））から、細胞特異的マーカーに対する抗体を用いてmagnetic-activated cell sorting（MACS）およびfluorescence-activated cell sorting（FACS）により、PCsおよび多分化能PCsを分離した。

【in vitro細胞特性、機能解析】分離調整した細胞における、①細胞増殖能、②細胞分化能（間葉系・神経系細胞分化誘導と、RT-PCRや免疫染色法などで分化細胞を評価、同定）③血管新生能（3次元ゲル培地での培養）④遺伝子発現性（qPCR、flow cytometry解析、免疫染色法など）について検討した。

【下肢虚血病態モデルでの細胞機能評価】マウス（C57BL6 wild、16-24 week-old、male）の左大腿動静脈を切除し、片側後肢虚血モデルを作製し、同虚血部位にEphA7陽性PCsを 5×10^5 個導入した。術後4、7、14、21、28日目における足底の血流をレーザードプラー血流計で計測し、健側に対する割合を観察した。対照は、EphA7陰性control PCs（CtPCs）、ASCs、リン酸緩衝生理食塩水（Phosphate Buffered Saline；PBS）導入群とした。下肢筋肉組織をホルムアルデヒド固定し、CUBIC法による透明化処理後に、三次元的な組織内の新生血管評価を、免疫染色、蛍光顕微鏡での観察などにより行った。

成 績

【多分化能PCs特異的マーカーの同定】多分化能の異なる三種のPCs株間の遺伝子発現性の差から、PCs多分化能に関連する遺伝子群を抽出し、高分化能PCsに特異的に発現する遺伝子の中から細胞表面に局在するEphA7を同定した。

【EphA7抗体を用いた多分化能PCsの分離】正常マウス末梢組織（皮下脂肪や骨格筋組織）でEphA7陽性PCsを確認できた。そこで、マウス皮下脂肪組織由来の微小血管PCsを、PC特異的マーカーNG2抗体で認識させ、MACSで分離し、さらにEphA7に対する抗体で標識させ、FACSを用いてEphA7陽性PCsを分離することができた。

【EphA7陽性PCsの細胞特性】EphA7陽性PCsは、増殖性が高く、単一細胞での浮遊培養では、幹細胞で認められるSphereを形成した。遺伝子解析では、CtPCsと同様にPC特異的遺伝子を発現しており、ECやリンパ球のマーカー遺伝子の発現は認めなかった。

【EphA7陽性PCsの細胞分化能】正常組織から分離したEphA7陽性PCsは、多分化能PC細胞株の特性同様に、脂肪細胞や骨芽細胞など間葉系細胞への分化能があることが確認できた。また、神経分化誘導条件で神経幹細胞マーカーであるNestinを強発現し、さらに、神経特異的チュブリン β 3陽性細胞やS100 β 陽性シュワン細胞への分化が確認された。一方、CtPCsにおいて、このような細胞分化能は認められなかった。

【EphA7陽性PCsの血管新生能】血管内皮増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor；VEGF）存在下三次元ゲル培養下では、一部はECsに分化し、残りのPCsがそれらを覆う微小血管構造を自らで形成することが確認できた。CtPCsでは、血管新生をほとんど認めなかった。

【下肢虚血病態における細胞導入治療効果】片側後肢虚血マウスモデルでの細胞移植後の虚血改善度については、EphA7陽性PCsは、対照群であるCtPCs、ASCs投与群に比べ、有意に優れた虚血改善効果を認めた。また、GFP陽性CapSCsを導入した下肢虚血部位の組織学的観察においては、著明な血管新生が観察され、その一部は、PCsやECsに分化していることが観察された。

考 案

EphA7は、末梢組織の毛細血管PCsの中から、多分化能PCsを選択的に分離できる細胞マーカーとして用いられることが明らかになった。微小血管由来EphA7陽性PCsは、血管新生・間葉系・神経系細胞への分化能を有する多分化能細胞であり、毛細血管幹細胞（capillary stem cells；CapSCs）と命名した^(引用3)。

虚血組織への細胞導入実験により、CapSCsの優れた虚血改善能が確認された。その作用の一部は、導入したCapSCsが血管前駆細胞として、新生血管の細胞に分化することが寄与しているものと考えられる。

結 論

CapSCsは、末梢組織に分布する毛細血管に局在する多分化能細胞として、組織再生やリモデリングに関わる基盤となる体性幹細胞の可能性があり、様々な難治性疾患病態の解明のための魅力的な研究標的である。また、難治性下肢虚血に対する治療ツール細胞として再生医療応用にも期待できる。

引用文献

1. Armulik A, Genove G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*. 2011;21:193-215.
2. Kabara M, Kawabe J, Matsuki M, et al. 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; 94:1340-1354.
3. 川辺淳一 毛細血管に秘める多分化能ペリサイト –毛細血管幹細胞 (CapSCs) 医学のあゆみ 2018, 264, 10

参考文献

1. Tomita Y, Horiuchi K, Kano K, Tatsukawa T, Matsuo R, Hayasaka T, **Yoshida Y**, Kabara M, Yasuda S, Nakajima K, Nakagawa N, Takehara N, Okizaki A, Hasebe N, Kawabe JI. Ninjurin 1 mediates peripheral nerve regeneration through Schwann cell maturation of NG2-positive cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;519(3):462-468.
2. Uchida D, Saito Y, Kikuchi S, **Yoshida Y**, Hirata S, Sasajima T, Azuma N. Development of gene therapy with a cyclic adenosine monophosphate response element decoy oligodeoxynucleotide to prevent vascular intimal hyperplasia. *J Vasc Surg*. 2019: 5214(19), 30403-3
3. Minoshima A, Kabara M, Matsuki M, **Yoshida Y**, Kano K, Tomita Y, Hayasaka T, Horiuchi K, Saito Y, Aonuma T, Nishimura M, Maruyama K, Nakagawa N, Sawada J, Takehara N, Hasebe N, Kawabe JI. Pericyte-Specific Ninjurin1 Deletion Attenuates Vessel Maturation and Blood Flow Recovery in Hind Limb Ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018, 38(10):2358-2370.
4. 吉田 有里, 木村 文昭, 石川 成津矢, 北原 大翔, 紙谷 寛之, 左房壁高度石灰化を伴う僧帽弁狭窄症患者に対して広範囲左房内膜摘除を要した1例. *日本心臓血管外科学会雑誌* 2017, 46巻5号 Page231-234