

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K15980

研究課題名(和文) 周細胞の多分化能を制御する新規因子の機能解析

研究課題名(英文) Assessing the novel factor to regulate the differentiation ability in pericytes

研究代表者

鹿原 真樹 (KABARA, Maki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：20596267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：最近、毛細血管周細胞の一部が多分化能をもち、組織の恒常性に関与することが示唆されている。我々はこの多分化能をもつ周細胞に特異的な表面マーカーを同定し、マウス正常組織から同細胞の分離に成功した。また、多分化能の異なる細胞群間の網羅的遺伝子解析より、周細胞の多分化能と関連すると考えられる遺伝子を抽出した。本研究ではこの因子に対して、マウス毛細血管由来周細胞の血管新生能を中心とした検討を行った。その結果、マウス周細胞における同因子の発現の低下は、血管新生能を亢進させることを見出した。本研究で得られた知見から、虚血性疾患などの組織リモデリングを背景とする疾患の病態解明へと発展することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多分化能をもつ周細胞は組織の恒常性に作用する。本研究ではこの多分化能に影響する因子の作用を血管新生の観点から検討した。このメカニズムの解明により、虚血性疾患などの組織リモデリングを背景とする疾患の病態解明へとつながる。

研究成果の概要(英文)：Recently it is shown that some of the pericytes have multipotency. These pericytes may play an important role in tissue remodeling. Then we identified a specific cell surface marker for multipotent pericytes. This marker allows for the isolation of the multipotent pericytes from normal tissues in mice. Moreover, we found the gene associated with differentiation ability in pericytes from microarray gene expression profiling. In the present study, we investigated this factor, focusing on the angiogenic potential of murine pericytes. Decreased this gene expression in pericytes led to enhancement of angiogenic ability. The findings from this study are expected to bring a new perspective to pathological conditions which are closely related to tissue remodeling such as ischemic disease.

研究分野：循環器内科

キーワード：毛細血管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微小血管は内皮細胞が形成するチューブを周細胞が覆う構造をとる。周細胞は微小血管の安定化や、血管の透過性などの機能調節にも寄与する。

この周細胞の一部が、間葉系幹細胞様・神経幹細胞様の多分化能を持ち、大血管を含めた組織リモデリングに関与することが報告されている^{引用文献1}。しかし、多分化能をもつ周細胞を同定する特定のマーカーなどは見出されておらず、詳細な機能は未だ不明な点が多い。

我々は以前に、SV40T 抗原トランスジェニックマウスを利用して、マウス毛細血管由来周細胞株を樹立した^{引用文献2}。樹立した複数の細胞株の中から、多分化能をもつ細胞株を見出した。この細胞株を用いた検討により、多分化能をもつ周細胞は、周細胞のみならず内皮細胞にも分化して自ら毛細血管を構築することを明らかにした。また、マウス下腿筋挫滅モデルや下肢虚血モデルといった *in vivo* での検討により、骨格筋再生のみならず新生血管の構築にも寄与し、組織再生能をもつことを明らかにした。

さらに、樹立した細胞株の中から分化能の異なる 3 つの細胞株を用いて網羅的遺伝子解析を行った。この結果から多分化能に関連すると考えられる因子 *gamma-synuclein* (*Sncg*) に着目し、その周細胞の機能への影響について検討を行った。

2. 研究の目的

Sncg が多分化能をもつ周細胞の機能調節に寄与するか検討する。特に血管新生における作用について評価する。

3. 研究の方法

血管形成能に与える影響の評価

(1) *in vitro* angiogenesis assay

Sncg 特異的 siRNA を lipofection により導入した多分化能をもつマウス微小血管由来周細胞を Matrigel に埋包し、mouse VEGF (25ng/mL) を添加した EBm-2 培地で 2-3 日間培養し、管腔様構造の形成の程度を顕微鏡で観察し検討した。また、この Matrigel 内の細胞から RNA を抽出し、血管新生に関与する代表的な遺伝子 (VEGF-A・Mmp-2 など) や、血管内皮細胞に特徴的な遺伝子 (VWF・Pecan・Vegfr2 など) の発現量を real-time PCR で検討した。

(2) *Sncg* の発現低下が及ぼす血管新生因子への影響

Sncg 特異的 siRNA を導入したマウス微小血管由来周細胞株を通常培養、または低酸素下 (O_2 濃度 6-12%) で培養し、24・48・72 時間目の細胞から RNA を抽出して遺伝子発現量を real-time PCR で評価した。

Sncg 発現量に影響を与える因子の検討

(1) 各種条件下でのマウス微小血管由来周細胞株の *Sncg* 遺伝子発現量

TNF- α 、IL-6 添加条件下 (10, 50, 100ng/mL)、低酸素下 (O_2 濃度 6-12%)、高血糖条件 (25mM) で培養し、RNA を抽出して、*Sncg* の遺伝子発現量を real-time PCR で評価した。

(2) レポーターアッセイ

Sncg 発現による細胞内のシグナル伝達経路を検討するため、レポーターアッセイを施行した。マウス微小血管由来周細胞株に加え、ヒト大動脈内皮細胞 (HAEC) を用いて検討を行った。lipofection により *Sncg* 遺伝子を過剰発現させた細胞とルシフェラーゼを付加した各種プラスミド (計 12 種類) をトランスフェクションさせ、24 時間後に発光強度の測定を行いコントロール群と比較した。

(3) 虚血肢における *Sncg* 遺伝子発現量

C57BL/6 マウス (雄性、10-12 週齢) に対し下肢虚血モデルを作成した。虚血部骨格筋における *Sncg* 遺伝子発現量を経時的 (術後 0 日目、4 日目、7 日目、14 日目) に real-time PCR で検討した。

4. 研究成果

血管形成能に与える影響の評価

(1) *in vitro* angiogenesis assay

特異的 siRNA でノックダウンしたものではありません。コントロールと比べ、lectin で染まる管腔様構造の増加を認めた。また、real-time PCR では von Willebrand Factor の遺伝子発現量の増加を認めた (図 1)。なお、他の synuclein family (α -synuclein, β -synuclein) を特異的 siRNA でノックダウンした場合には同作用を認めなかった。

(2) Sncg の発現低下が及ぼす血管新生因子への影響

通常培養で VEGF-A の遺伝子発現量が有意に増加した。低酸素培養下では有意な差を認めなかった。

Sncg 発現量に影響を与える因子の検討

(1) 各種条件下でのマウス微小血管由来周細胞株の Sncg 遺伝子発現量

高血糖培養下において Sncg 遺伝子発現量の低下を、IL-6 添加(10ng/mL)により増加を認めた。

(2) レポーターアッセイ

Sncg による細胞内でのシグナル変化として NF-kB・tp53 の関与が示された。

(3) 虚血肢における Sncg 遺伝子発現量

経時的に検討を行ったが、非虚血肢と比較して有意な変化は認めなかった。

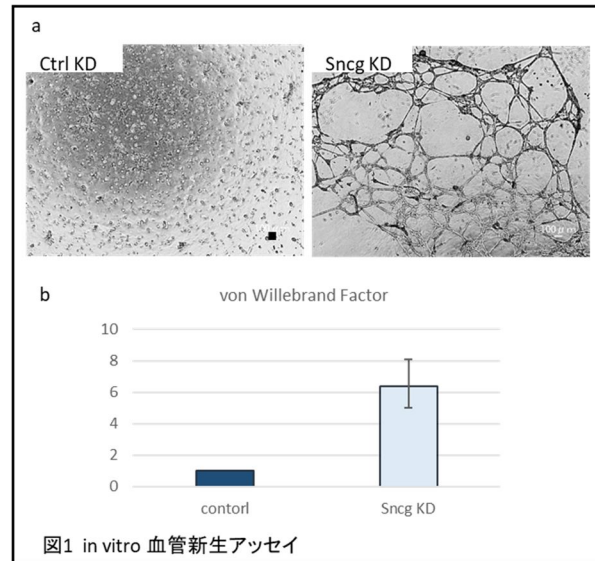


図1 in vitro 血管新生アッセイ

以上より、Sncg 発現量の低下が、マウス微小血管由来周細胞の血管新生能を亢進させると考えられた。組織において同因子の発現量の変動が起こる病的意義については今後の検討課題としたい。

<引用文献>

1. Kawabe J, Hasebe N. Role of the vasa vasorum and vascular resident stem cells in atherosclerosis. *Biomed Res Int.* 2014;2014:701571. doi:10.1155/2014/701571
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(12):1340-1354. doi:10.1038/labinvest.2014.121

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshida Yuri, Kabara Maki, Kano Kohei, Horiuchi Kiwamu, Hayasaka Taiki, Tomita Yui, Takehara Naofumi, Minoshima Akiho, Aonuma Tatsuya, Maruyama Keisuke, Nakagawa Naoki, Azuma Nobuyoshi, Hasebe Naoyuki, Kawabe Jun-ichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Capillary-resident EphA7+ pericytes are multipotent cells with anti-ischemic effects through capillary formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 120 ~ 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/sctm.19-0148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuri Yoshida, Maki Kabara, Kouhei Kano, Taiki Hayasaka, Yui Tomita, Kiwamu Horiuchi, Akiho Minoshima, Yukihiko Saito, Naofumi Takehara, Nobuyuki Azuma, Naoyuki Hasebe, Jun-ichi Kawabe
2. 発表標題 Identification of Capillary stem cells having capillary formation and potent regenerative potency
3. 学会等名 第1回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	川辺 淳一 (KAWABE Jun-ichi) (10400087)	旭川医科大学・医学部生化学講座・教授 (10107)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------