

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：10107

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19368

研究課題名（和文）毛細血管幹細胞の組織内維持システムの証明

研究課題名（英文）Vascular niche for maintenance of capillary stem cells

研究代表者

川辺 淳一（Kawabe, Jun-ichi）

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：10400087

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,500,000円

研究成果の概要（和文）：毛細血管の構造細胞であるPCの一部から幹細胞、毛細血管幹細胞を見出した。本研究では、末梢組織から調整した毛細血管幹細胞あるいは生体内の同細胞が、薬剤性筋傷害マウスや筋ジストロフィー症マウスにおいて失われる筋補充効果があることを明らかにした。これらの結果から、骨格筋量を維持あるいは再生は、従来から認識されていた衛星細胞以外に、微小血管周細胞の一部である毛細血管幹細胞が、担っていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生能が高い多核細胞である骨格筋線維は、非常に高い頻度で核の入れ替えをしていること、核補充に毛細血管の一部であるCapSCが担っていることを明らかにした。これらの知見は、同細胞を用いた筋ジストロフィー症の治療法への応用の他、高齢化社会を背景に筋肉量が減少し社会生活に支障をきたす（サルコペニア）病態改善にむけた研究戦略の方向性をつけることができた。

研究成果の概要（英文）：We found novel somatic stem cells, termed capillary stem cells (CapSCs) isolated from peripheral microvasculature. In this study, we demonstrated that CapSCs contribute to myogenesis in drug-induced muscle damage and dystrophy mice models. These findings suggest that in addition to satellite cells, microvascular cells, CapSCs play an important role for muscular regeneration and maintenance of muscular mass.

研究分野：再生医学

キーワード：毛細血管 体性幹細胞 骨格筋再生 血管ニッチ

1. 研究開始当初の背景

(1) 多細胞生物にとっての幹細胞維持システムの重要性

多細胞生物は、通常生命活動や炎症などの損傷で失われる細胞に対して、適切に補充(再生)する主役が体中に存在する体性幹細胞であるが、その機能障害は、様々な疾患病態に深く関わる。我々も、内皮前駆細胞などの体性幹(前駆)細胞の機能程度が病態予後に密接に関わることを報告してきた。

(2) 末梢組織の毛細血管由来幹細胞の発見

体中の細胞に酸素・栄養を補給する生体最大の臓器＝毛細血管の構成細胞である周細胞(PCs)の中に多分化能をもつ周幹細胞が発見され、その分布の広さから、「組織再生の基盤となる体性幹細胞」として注目されるが、これを同定・分離する適切な手段が無く詳細な細胞機能は不明であった。

2. 研究の目的

CapSCs の発見を契機に、①末梢組織の主要な体性幹細胞＝CapSCs の「局在」が毛細血管にあること、さらに②「障害骨格筋組織へ導入した CapSCs は、微小血管細胞として、その一部が CapSCs 様の幹細胞機能を保持している」という先行実験の知見を受けて、『CapSCs は、毛細血管細胞の構造細胞として未分化能が維持され、必要に応じ、組織実質細胞を供給再生して組織を自己修復する』という仮説構想に至った。

この仮説を証明するために、①微小血管壁の局在での CapSCs の幹細胞形質変化をリアルタイムに観察できるユニークな実験デバイスなどを利用して、末梢組織における体性幹細胞を維持するシステムを解明するとともに、②筋ジストルフィ動物モデルを利用して、組織内の幹細胞による自己修復能を付与するという組織再生(医療)の新しいコンセプトの妥当性を検証する。

3. 研究の方法

目的1 CapSCs の幹細胞としての維持システムの解明

- 1-1 毛細血管における幹細胞ニッチの証明; 作業仮説「組織導入した CapSCs が、組織の微小血管に局在し、幹細胞機能が維持されてる」ことを証明する。
- 1-2 微小血管チューブシステムにおける幹細胞機能維持の再現; 作業仮説「CapSCs が、血管内皮周囲に局在することにより幹細胞機能が保たれる」ことを証明する。
- 1-3 幹細胞維持のメカニズム解析; CapSCs の幹細胞維持機構の解明にむけて、上記のデバイスのゲルから ECs や形質変換した CapSCs を単離して、その細胞内遺伝子発現の網羅解析法の開発を目指す。

目的2 CapSCs による「組織自己修復能」付与という組織再生コンセプトの妥当性の証明

作業仮説「持続的な骨格筋破壊を起こす筋ジストルフィ発症マウスを用いて、CapSCs を組織導入すると、持続して導入細胞由来の骨格筋を再生させ、その割合が病態経過と共に増加すること」を証明。

4. 研究成果

(1) 毛細血管幹細胞 (CapSC) の単離とその血管新生効果

不死化毛細血管細胞株をもちいた網羅遺伝子解析から、多分化能周細胞 (PCs) に特異的なマーカー (EphA7) を見出した[1]。このマーカーを利用して、正常マウス組織 (皮下脂肪や骨格筋組織) の微小血管から、多分化能 PCs を分離することに成功した[2]。同細胞は、血管内皮および周細胞に分化し、みずから毛細血管を構築する他、間葉系幹細胞あるいは神経幹細胞様の多分化能をもつことを確認し、毛細血管幹細胞 (CapSC) と命名した。CapSC は、マウス重症下肢虚血モデルへの導入により、みずから血管形成し、優れた末梢循環改善効果をもつことを明らかにした[2]。

(2) CapSC の神経分化能に関わる因子の発見

周細胞特異的に *Ninjl* 遺伝子を欠損誘導できるマウス (NG2CreER/*Ninj* Flox) を作成し、Tamoxifen により周細胞 *Ninjl* 発現を抑制することにより、マウス下肢虚血モデルにおいて、虚血組織内の血管形成に異常 (成熟、機能的血管形成の抑制) をもたらし、末梢循環回復が大幅に遅延することを見出した[3]。また、CapSC の持つ神経分化能に *Ninjl* が重要であることを確認し、同 *Ninjl* 欠損マウスでは、周細胞同様に CapSC の *Ninjl* 発現も抑制し、末梢神経-坐骨神経モデルで、血管新生異常と共に CapSC によるシュワン細胞分化が低下し、同神経再生能の低下を明らかにした[4]。

(3) 内皮チューブおよび周細胞混合による三次元微小血管様構造の構築と、同細胞機能評価システムの開発

共同研究者である松永行子先生の研究室で、すでに樹立している三次元ゲル内での内皮チューブシステムにおいて、内皮と内皮と接する細胞を観察・評価するシステムを開発した。我々から周細胞あるいは CapSC を提供し、周細胞が内皮に接着し、血管チューブの安定化 (透過性など) をもたらしすことを明らかにした[5]。現在、周細胞にかわり、CapSC を用いて、同細胞の幹細胞維持にかかわる内皮周囲環境を評価していく。

(4) CapSC による骨格筋再生能の証明

GFP マウスの皮下脂肪組織から CapSC を分離調整し、薬物誘導骨格筋障害組織へ導入し、同細胞の優れた骨格筋線維分化および血管新生能を確認できた。加えて、慢性骨格筋障害モデルである重症筋ジストロフィー症モデル (*mdx/utro* KO マウス) において、CapSC 導入により、すぐれた筋再生能と筋力維持効果を確認することができた。筋組織内においては、導入された GFP-CapSC が、骨格筋線維および血管細胞 (内皮あるいは周細胞) として、長く (1~2 か月) 組織内に留まることを確認した (論文投稿、リバイス中)。

この一連の研究から、CapSC が優れた骨格筋再生能と共に、組織内で微小血管構造細胞として留まることを確認できた。今後、さらに長期 (1~2 年) での細胞導入効果とともに、組織内動態について観察し、本研究の仮説である CapSC が幹細胞として筋再生に寄与することを確認していく。加えて、培養調整した CapSC でなく、生体内の内因性 CapSC の筋再生や筋量維持における役割を明らかにするため、体内 CapSC の動態を追跡できる lineage tracing mouse を作成し (第 31 回日本老年学会 合同ポスター賞)、さらに詳細な検討を進めていく。また、CapSC の幹細胞維持に、神経分布が重要な役割をはたす知見を得たことから、*Ninj* 欠損マウスや三次元血管チューブでの神経根共培養システムを構築し、幹細胞維持機構の解析を進めていく。

5. 本研究関連業績

1. Kabara M, *et al.* (2014) Immortalized multipotent pericytes derived from the vasa vasorum in the injured vasculature. A cellular tool for studies of vascular remodeling and regeneration. *Lab Invest* 94(12):1340-1354.
2. Yoshida Y, *et al.* (2020) Capillary-resident EphA7(+) pericytes are multipotent cells with anti-ischemic effects through capillary formation. *Stem Cells Transl Med* 9(1):120-130.
3. Minoshima A, *et al.* (2018) Pericyte-Specific Ninjurin1 Deletion Attenuates Vessel Maturation and Blood Flow Recovery in Hind Limb Ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38(10):2358-2370.
4. Tomita Y, *et al.* (2019) Ninjurin 1 mediates peripheral nerve regeneration through Schwann cell maturation of NG2-positive cells. *Biochem Biophys Res Commun.*
5. Lee E, *et al.* (2018) A 3D in vitro pericyte-supported microvessel model: visualisation and quantitative characterisation of multistep angiogenesis. *J Mater Chem B* 6(7):1085-1094.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 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, J.	4. 巻 38
2. 論文標題 Pericyte-Specific Ninjurin1 Deletion Attenuates Vessel Maturation and Blood Flow Recovery in Hind Limb Ischemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arterioscler ThrombVasc Biol	6. 最初と最後の頁 2358-2370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.118.311375	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 -

1. 著者名 Lee, E, Takahashi H, Pauty J, Kobayashi M, Kato K, Kabara M, Kawabe J, Matunaga YT	4. 巻 6
2. 論文標題 A 3D in vitro pericyte-supported microvessel model: visualization and quantitative characterization of multistep angiogenesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Material Chem B.	6. 最初と最後の頁 1085-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

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 -

1. 著者名 Tomita Yui, Horiuchi Kiwamu, Kano Kohei, Tatsukawa Takamitsu, Matsuo Risa, Hayasaka Taiki, Yoshida Yuri, Kabara Maki, Yasuda Satoshi, Nakajima Keiichi, Nakagawa Naoki, Takehara Naofumi, Okizaki Atsutaka, Hasebe Naoyuki, Kawabe Jun-ichi	4. 巻 519
2. 論文標題 Ninjurin 1 mediates peripheral nerve regeneration through Schwann cell maturation of NG2-positive cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 462 ~ 468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.007	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11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉田 有里、鹿原 真樹、鹿野 耕平、早坂 太希、富田 唯、堀内 至、蓑島 暁帆、齋藤 幸裕、西村 正人、竹原 有史、東 信良、長谷部 直幸、川辺 淳一
2. 発表標題 Identification of Capillary stem cells having capillary formation and potent regenerative potency
3. 学会等名 第1回日本循環器基礎研究フォーラムBCVR
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Lee E, Takahashi H, Pauty J, Kabara M, Kawabe J, Matsunaga Y
2. 発表標題 Visualization and quantification of pericyte incorporated 3D in vitro angiogenesis
3. 学会等名 第26回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鹿野耕平、鹿原真樹、堀内至、早坂太希、吉田有里、富田唯、丸山啓介、澤田潤、蓑島暁帆、中川直樹、竹原有史、長谷部直幸、川辺 淳一
2. 発表標題 毛細血管幹細胞(Capillary Stem Cells(CapSCs))による骨格筋再生
3. 学会等名 第26回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawabe J
2. 発表標題 Capillary stem cells, multipotent pericytes resident in microvessels and their clinical application
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawabe J
2. 発表標題 Capillary pericytes provide a new insight in vital phenomenon of multicellular organism.
3. 学会等名 第41回 日本高血圧学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田有里、鹿原真樹、鹿野耕平、早坂太希、富田唯、堀内至、長谷部直幸、川辺淳一
2. 発表標題 多分化能をもつ毛細血管幹細胞(Capillary Stem Cells)の同定とその組織再生能の検討
3. 学会等名 第25回 日本血管生物医学学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Horiuchi K, Minoshima A, Yoshida Y, Hasebe N, Kawabe J
2. 発表標題 Pericyte-specific deletion of Ninjurin1 induces abnormal vasa vasorum formation and persistent inflammation and enhances intimal hyperplasia of injured vasculature.
3. 学会等名 ESC congress 2019 European Society of Cardiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鹿野耕平、内田紗英子、堀内至、澤田潤、長谷部直幸、川辺淳一
2. 発表標題 日常生活状態における骨格筋組織の再生・維持に毛細血管周細胞が重要である
3. 学会等名 第31回日本老年学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鹿野耕平、鹿原真樹、吉田有里、堀内至、早坂太希、澤田潤、長谷部直幸、川辺淳一
2. 発表標題 新規体性幹細胞 = 毛細血管幹細胞 (Capillary Stem Cells ; CapSCs) による骨格筋再生能
3. 学会等名 第31回日本老年学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kano K, Kabara M, Yoshida Y, Horiuchi K, Hasaka T, Sawada J, Hasebe N, Kawabe J
2. 発表標題 EphA7+ pericyte is a novel perivascular stem cell for regeneration of skeletal muscles.
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomita Y, Horiuchi K, Kano K, Tatsukawa T, Yoshida Y, Hasebe N, Kawabe J
2. 発表標題 Ninjurin 1 mediates peripheral nerve regeneration through Schwann cell maturation of NG2+ neural precursor cells
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 毛細血管由来幹細胞 その用途および製造方法	発明者 川辺淳一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2016 072259	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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 分 担 者	松永 行子 (津田行子) (Matsunaga Yukiko) (00533663)	東京大学・生産技術研究所・准教授 (12601)	