

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17003

研究課題名(和文) ヒト組織に存在する血管内皮幹細胞の分離及び同定に関する研究

研究課題名(英文) Studies on separation and identification of vascular endothelial stem cells in human tissues

研究代表者

内山 美津希 (Uchiyama, Mizuki)

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号：60814506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、マウスの筋肉・肺などの組織内にある末梢血管の血管内皮細胞中に幹細胞と内皮細胞の性質を併せ持つ特殊な細胞(血管内皮幹細胞)が血管内皮細胞中に存在し、新たなマーカーとしてCD157が同定された。本研究ではこの血管内皮幹細胞について、ヒト組織検体を用いて検索を行った結果、ヒト血管内皮細胞(CD31陽性細胞)中にもこの幹細胞が含まれるside populationが存在することを見出し、さらにマウス同様CD157陽性細胞が血管内皮細胞中に存在していることを見出した。今後、この細胞分画の特性を解析し、血管への分化を確認する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスでその存在が明らかとなっていた血管内皮幹細胞についてヒト組織を用いて検索を行った結果、ヒト組織中においても血管内皮細胞中に幹細胞が存在することを見出し、さらにマウス同様この幹細胞のマーカーであるCD157陽性細胞がヒト血管内皮細胞中に存在することを証明した。このことは様々なヒト組織中において血管内皮幹細胞の同定が可能となることから、今後本細胞を単離し、細胞特性を明らかにすることで、将来におけるヒトの心臓、肺、筋肉など様々な組織・臓器の虚血性疾患に対する革新的な治療法の開発に繋がる可能性を持つ。

研究成果の概要(英文)：Recently, our collaborator has found tissue resident vascular endothelial stem cells in mouse muscle, lungs etc. tissue. Previous study demonstrated CD157 marks vessel resident tissue vascular endothelial stem cells. These cells are capable of clonal expansion, angiogenesis initiation and blood vessel maintenance. This study was conducted to demonstrate that human tissue also have CD157 marker to represent tissue resident vascular endothelial stem cells for the first time. After obtaining approval from the ethical committee, we have collected human skin to evaluate the population of CD157 cells in human tissue. As a result, we have found that CD157 positive cells reside in the human CD31 positive endothelial cells as a side population similarly to murine data. Although we were not able to move forward to identify the efficacy of human tissue resident CD157 cell in vivo due to limited number of cells to be isolated from the tissue, we plan to continue further investigation.

研究分野：形成外科

キーワード：血管内皮幹細胞 血管再生 組織幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、マウスの筋肉、肺、肝臓、皮膚などの全身の臓器や組織に存在する血管の内腔を覆う血管内皮細胞中に幹細胞と内皮細胞の性質を併せ持つ特殊な細胞、血管内皮幹細胞が同定された。この血管内皮幹細胞は通常静止状態にあるが、血管新生時には細胞分裂を始め、血管を構築するために必要な内皮細胞を大量に供給することができる。マウス組織から得られた単一の血管内皮幹細胞から10日間で多数のコロニー形成が行われることが以前の研究によって明らかにされている。血管内皮細胞は表面抗原マーカーCD31 陽性 CD45 陰性として分離・同定することができる。この内皮細胞分画の中にヘキスト色素を排出する能力が高い細胞(EC-SP 細胞)を、FACSを用いて同定することができる。この EC-SP を培養すると、通常の血管内皮細胞(EC-MP 細胞)ではほとんどコロニー形成が見られないが、EC-SP 細胞は多数のコロニーを形成する。さらに EC-SP 細胞は、虚血時には活性化し組織の血流改善に貢献していること、マウス下肢虚血モデルにこの細胞の移植を行うと、半年以上の長期間にわたって血流が維持される血管が構築され、血流も完全に回復することが示された。さらに EC-SP 細胞の網羅的遺伝子発現解析を通じて、CD 157 抗原が EC-SP 細胞で強く発現しており、内皮幹細胞マーカーであることが明らかになっている。

本研究ではヒト手術検体を用いて、皮膚組織、筋組織、脂肪組織など様々なヒト組織において、血管内皮幹細胞の存在を探索することを目的としている。ヒトにおいて発見されれば世界で初めての発見となる。

2. 研究の目的

本研究ではヒト皮膚組織、筋組織、脂肪組織を用いて、ヒトにおける血管内皮幹細胞の存在を探索することを目的としている。本研究の研究協力者である大阪大学微生物病研究所 准教授内藤尚道はマウスにおいて筋肉・肺などの組織内にある末梢血管の血管内皮細胞中より血管内皮幹細胞を世界で初めて発見している(Naito H., et al 2012)。また、研究協力者の順天堂大学医学部附属順天堂医院形成外科 先任准教授 田中里佳は末梢血から血管内皮前駆細胞(Mononuclear cell; MNC) を採取し無血清生体外培養法 (Quality and Quantity Culture; QQc)を用いて、血管及び組織再生能の高い細胞のみを増殖させることに世界で初めて成功している。これらの技術を用いて、ヒトの組織では未だ発見されていない血管内皮幹細胞の存在及び組織再生能を解明することを目的に実験を実施した。

3. 研究の方法

(1)ヒト組織の採取

形成外科において腫瘍切除術・再建術・脂肪除去術・四肢切断術などの際に生じた廃棄される組織の脂肪・筋肉・骨組織を順天堂医院倫理委員会の承認のもと文書による患者同意を得て用いた。

(2)ヒト組織における組織血管内皮幹細胞の確認

細胞の採取は切除された組織を回収し、細切したのち酵素消化後フィルトレーションを行い単離する。調製直後の細胞を血管内皮細胞特異的抗体及び Hoechst 33342 を用いて染色を行い、セルソーターで CD31 陽性 CD45 陰性細胞中の Side Population 細胞の分取を行い、細胞の同定をした。

(3)検体の凍結による保存の可能性検討

血管内皮幹細胞の原材料となる手術において採取される組織について、検体採取時間や輸送などで制約があるため、凍結による保存の可能性について生存率や当該細胞の回収率などの観点で評価を行った。

(4)新規血管内皮幹細胞マーカーによる検出

先にマウスにおいて血管内皮幹細胞特異的マーカーとして報告された CD157 について数種類の入手可能な抗体を用いて検出を試み、その有用性を評価した。

4. 研究成果

初年度(2018年度)には順天堂医院倫理委員会の承認のもと、当院で行われる形成外科手術において文書で患者より同意を得た上で廃棄されるヒト組織を採取し、これらの組織から血管内皮幹細胞を分離検証する臨床研究を開始した。その結果、検索を行った8サンプルのうち6サンプルの皮膚組織より調製した検体の CD31 陽性かつ CD45 陰性の細胞群中に Hoechst 33342 で分画される side population (SP)分画が 0.30 - 2.75%存在することが明らかになった(図1)。ヒト組織においても CD31 陽性かつ CD45 陰性細胞群に SP 分画が存在するという結果は世界初での発見であり、組織に存在する末梢の血管中に血管に分化する可能性のある血管内皮幹細胞が存在することが示唆された。

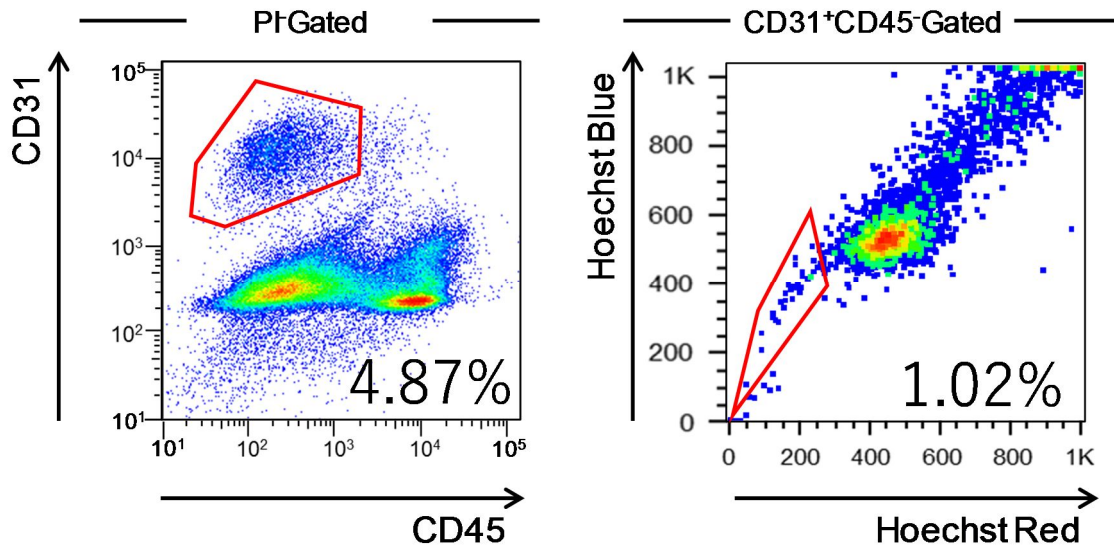


図1 ヒト組織に存在する幹細胞様内皮細胞（血管内皮内皮 SP 細胞）

得られた組織サンプルの凍結保存の可能性について検討した結果、組織を細切後、市販の細胞凍結保存液中で凍結保存することで、細胞回収率、生存率が減少するものの SP 分画細胞の検出が可能であることが示され、当該細胞の原材料となる組織の凍結保存による輸送などが可能性を示した。

二年目（2019 年度）は、前年度までに同定したヒト皮膚組織の血管に常在する幹細胞様内皮細胞（血管内皮 SP 細胞）において、マウスの内皮幹細胞マーカーとして知られている CD157 抗原について発現の有無を検討した。これまでに人から分離した直後のサンプルにおいて CD157 抗原の発現の有無を確認した抗体は存在しない。そこでまず初めに、ヒトで使用可能とされている市販の CD157 FACS 用抗体について使用可能であるか検討を行った。市販されている抗体 3 種類を入手して、ヒト皮膚 2 検体を用いて比較検討を行った。それぞれの抗体を用いて、皮膚細胞を染色して FACS 解析を行うと、CD31+CD45- 内皮細胞分画中に、CD157+ と考えられる集団を認める抗体が 1 種類のみ同定できた（図 2）。さらに同定した CD157 抗体を用いて 7 検体、6 サンプル（1 サンプルは 2 つの検体を混合した）について FACS による CD157 陽性細胞の有無に関して解析を行った。その結果、4 サンプルについて CD157 陽性細胞が同定できた。

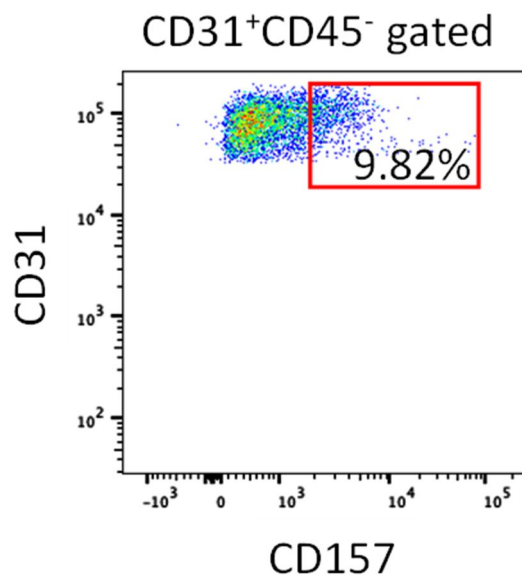


図2 CD31+CD45-内皮細胞分画中における CD157 陽性細胞の検出

本解析結果において CD157 陽性細胞の割合が大きく変動（2.57 - 11.6%）している事が認められた。マウスの解析結果から CD157 陽性細胞は全血管に満遍なく存在しているのではなく、ある程度局在している事がわかっている。そのため検体ごとに CD157 陽性細胞の存在比率が異なり、その結果 FACS 解析でも比率が変動したと考えられる。さらにはヒト皮膚組織の細胞分散法

が十分確立していないため、効率よく CD157 陽性細胞を含む、全内皮細胞が分離できていない可能性が考えられる。今後更なる分散法の最適化が必要であると考えられる。

2年間の研究期間中に分離されたヒト幹細胞様内皮細胞(血管内皮 SP 細胞)を用いた *in vivo* の実験の実施も予定していたが、ヒト皮膚中のヒト幹細胞様内皮細胞は分離が非常に困難であったため動物実験を実施するための十分な細胞数を得ることが出来なかった。ヒト皮膚中のヒト幹細胞様内皮細胞の局在や細胞数が正確に把握できれば動物実験への発展は難しいと考える。今後、CD157 陽性細胞の FACS 解析と組織免疫染色を継続して行い、組織内の局在・細胞数を検討する。また、細胞分散方法についても検討を行い、FACS 解析の再現性を上げることを目指す。さらには内皮細胞および CD157 陽性内皮細胞の FACS 分離を行い細胞培養や RT-qPCR による遺伝子解析を行う。十分量の細胞が分離できるなら、網羅的遺伝子発現解析を実施することに関しても検討したい。さらにこれらの成果を基に本幹細胞様内皮細胞を分離し、血管に分化することを確認する *in vitro* と *in vivo* の実験を計画している。実験の進捗は予定通りではなかったが、世界で初めて、ヒト皮膚組織において幹細胞様内皮細胞が存在することが同定できたことは大きな意義を有する研究であると考えられる。今後さらなる検討を行い、より大きい成果と発展させる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----