

機関番号：32653

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590199

研究課題名 (和文) VEGF 陽性間質細胞群が血管新生に果たす機能的役割の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of the functional roles of VEGF-positive stromal cells during angiogenesis

研究代表者

森川 俊一 (MORIKAWA SHUNICHI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：70339000

研究成果の概要 (和文)：

創傷治癒に伴う血管新生過程において、種々の VEGF 陽性間質細胞中、周皮細胞が主たる役割を果たすこと、すなわち血管新生初期には新生血管の増殖と伸長を導き、かつ血管新生後期には NG2 を介するシグナル経路等を通じて血管壁を成熟・安定化させる機能的役割を有することが強く示唆された。また周皮細胞マーカーを発現する VEGF 陽性線維芽細胞がこれら周皮細胞の前駆細胞として働くことも併せて示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

It is strongly suggested that amongst VEGF-positive stromal cells, pericytes play major roles in the angiogenesis during wound-healing. They presumably promote proliferation and extension of blood vessels in the early stage of angiogenesis, whereas in the later stage, they in turn stabilize newly formed vessels, via such as NG2 signaling pathway. It is also suggested that fibroblasts positive for VEGF along with multiple pericyte markers serve as pericyte precursors during wound-healing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：血管新生 周皮細胞 間質細胞 創傷治癒 VEGF 多重免疫染色 電子顕微鏡
心筋シート

1. 研究開始当初の背景

過去の血管新生のメカニズム研究において、我々は腫瘍モデル動物の新生血管発芽部

に多数の周皮細胞が密接して分布する所見を得た (Morikawa et al. Am. J. Pathol 2002; Morikawa et al. Am. J. Pathol 2003)。

当時の定説では、血管新生時には周皮細胞は新生中の血管壁から消失し、新生内皮が発芽を終えた後、血管壁が安定化の段階に入る時期に再び間質より動員されて血管壁に付着して血管壁を成熟させるという意見が広く認知されており、新生血管発芽部に多数の周皮細胞が分布するという所見は従来の定説とは異なる周皮細胞の機能的役割の新たな一側面をうかがわせるものであった。我々は、周皮細胞による血管新生促進作用を解明するため、タイプや進行度による差が激しく複雑性の高い腫瘍モデルから、比較的シンプルで安定したデータの取得が期待できる創傷治癒モデルに研究材料を変え、引き続き詳細な検索を行った。その結果、創傷治癒に伴う血管新生において、腫瘍モデルでの所見と同様、周皮細胞が新生血管の発芽部内皮細胞に密接して分布することを観察し、さらに、この周皮細胞が血管内皮細胞増殖および遊走因子でもある Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) を発現することと、これらの周皮細胞が付着する発芽内皮細胞がそれに呼応するように増殖核を有することを明らかにした。

これらの観察所見により、周皮細胞による血管新生促進作用の可能性が強く裏付けられたが、同時に、別の観察所見により、新たな検索課題が生ずることとなった。すなわち、血管新生が進行する創傷部肉芽組織中には、内皮細胞・周皮細胞以外にも線維芽細胞や大食細胞を始めとする多く間質性細胞が分布するが、それらの多くも周皮細胞と同様に VEGF 陽性を示すことが明らかとなり、血管新生メカニズムを包括的に把握するためには、VEGF 陽性周皮細胞に加えて、それ以外の VEGF 陽性間質細胞群の機能的役割を特定する必要が生じた。

2. 研究の目的

創傷治癒に伴う血管新生メカニズムの包括的な理解のため、血管新生の「現場」である肉芽組織中に分布する周皮細胞を始めとする VEGF 陽性間質細胞群が、血管新生過程においていかなる機能的役割を持つのかについて形態学的に明らかにする。

3. 研究の方法

新生血管および周囲に分布する間質細胞群について多重免疫染色法を用いて可視化

し、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察を行った。さらに、VEGF の mRNA に対する *in situ* hybridization も免疫染色と並行して行うこととした。

上記の光学顕微鏡レベルの検索に加え、透過型電子顕微鏡を用いた微細構造レベルの検索も併せて行い、間質細胞群の細胞小器官の状態を比較してそれぞれの間質細胞の機能的役割をさらに追跡した。

4. 研究成果

研究成果については、(1)周皮細胞、(2)線維芽細胞、(3)大食細胞の3つの細胞タイプにそれぞれ分けて記載する。その後、発展的研究としての細胞シート工学を用いた検索成果について述べる。

(1)周皮細胞

新生血管の発芽内皮細胞に密接する VEGF 陽性(+)間質細胞は、複数の周皮細胞マーカー、alpha smooth muscle actin (α -SMA)、desmin、platelet derived growth factor-beta (PDGFR- β)を共発現しており、周皮細胞であることが改めて同定された。これら SMA+/desmin+/PDGFR β +周皮細胞が密接する発芽内皮細胞は往々、BrdU+の増殖核を有する(>90%)ことから、周皮細胞が VEGF 産生により内皮細胞の発芽を促すこと確認された。周皮細胞による VEGF 産生は *in situ* hybridization を用いた核酸レベルの検索でも裏付けられた。VEGF については、内皮の増殖を促すとともに、内皮細胞の遊走も促すことが知られているが(Gerhardt et al. 2003)、周皮細胞が内皮細胞に密接することは、遊走する内皮細胞を誘導し新生血管を伸長させていくために極めて有利な配置であるものと考えられる。

興味深いことに、新生血管先端部に分布する周皮細胞と、それより後方部分に分布する周皮細胞の間には以下の3点で違いが認められた：

その一つは、先ずマーカー発現に関する違いである。発芽内皮細胞の認められる新生血管先端部よりも後方部分に分布する周皮細胞は上記の SMA、desmin、PDGFR β に加え、もう一つの周皮細胞マーカーで血管壁の安定化作用を持つ NG2 proteoglycan を徐々に発現するようになる。

(SMA+/desmin+/PDGFR β /+NG2+周皮細胞)。

2つ目は、基底膜に関する違いである。先端部の周皮細胞は基底膜を欠くが、後方の周皮細胞では内皮細胞と共通の基底膜に次第に包まれていくことが観察された。

3つ目は、VEGF 発現に関する違いである。周皮細胞による VEGF 発現は先端部から後方にかけて徐々に弱まり、最終的には消失する。

これらの所見を総合すると、血管新生初期には周皮細胞が新たに間質より動員され、SMA+/desmin+/PDGFR β +周皮細胞として内皮の増殖を促しながら、次の段階の血管新生後期には SMA+/desmin+/PDGFR β /+NG2+周皮細胞へとさらに分化し、NG2 を介するシグナル経路や VEGF 供給の停止を通じて血管壁を成熟・安定化させていくものと考えられた。

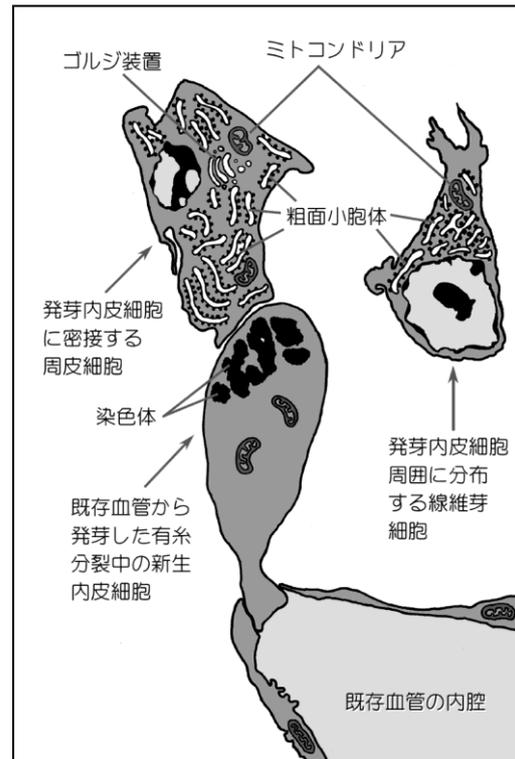
(2)線維芽細胞

Vimentin+/CD68 陰性(-)の線維芽細胞は肉芽組織中に多数観察された。これらの線維芽細胞も周皮細胞と同様、VEGF を発現しており、血管壁から一定の距離はおくものの、新生血管周囲の VEGF 濃度を上げて内皮細胞の増殖を促すことに一定の働きをするものと考えられた。

さらに興味深いことには、これら VEGF+線維芽細胞の多くが周皮細胞マーカーである SMA、desmin、PDGFR β を共発現することも明らかとなった(SMA+/desmin+/PDGFR β +線維芽細胞)。このマーカー発現パターンは、新生血管先端部で増殖性の内皮細胞に密着する周皮細胞が示すマーカー発現(SMA+/desmin+/PDGFR β +)と全く同一であることから、これらの SMA+/desmin+/ PDGFR β + 線維芽細胞は血管新生に際して間質から動員された周皮細胞の前駆細胞であるものと推察された。電子顕微鏡を用いた検索においてもこれら2つの細胞タイプは粗面小胞体の顕著な発達という点で酷似しており、多重免疫染色での観察結果が微細構造レベルでも裏付けられる結果となった(右上図)。

(3)大食細胞

CD68+で周皮細胞マーカー陰性の細胞群として同定された大食細胞は、線維芽細胞と同様、肉芽組織中に多数分布していた。これらの中には、新生血管に近接



創傷治癒過程に認められる新生血管先端部の電顕所見に基づく模式図。新生血管先端部において、既存血管から発芽する増殖性の内皮細胞に密着する周皮細胞とその周囲に血管壁から距離をおいて分布する線維芽細胞は、粗面小胞体の顕著な発達という共通する特徴を有する。

して分布するものも往々認められたが、周皮細胞のように内皮細胞に密着する場面は多くは認められなかった。VEGF は一部の大食細胞に陽性であったが、これら大食細胞の大部分は線維芽細胞の場合と同じく血管壁から一定の距離をおいて分布しており、その VEGF 発現は、やはり線維芽細胞と同様、新生血管周囲の VEGF 濃度を上げて内皮細胞の増殖を促すことに関与するものと考えられた。また、電子顕微鏡を用いた検索からは、これら新生血管周囲に分布する大食細胞が旺盛な食能を示す像が得られており、これらの細胞が、血管新生過程において生じる種々の不要産物や外来の異物の処理機能に大きく寄与することが考えられた。

以上の成果は以下のようにまとめられる：
創傷治癒に伴う血管新生過程において、血管新生の「現場」である肉芽組織中に分布する周皮細胞を始めとする VEGF 陽性間質細胞群は、全体として新生血管周囲の VEGF 濃度

を高めて内皮細胞の増殖を促すことに加え、それぞれが固有の機能的役割を持つことが推測された。すなわち、周皮細胞は発芽内皮細胞に密接し、VEGFによって内皮細胞の増殖とともに新生血管の伸長を導き、かつその後はNG2を介するシグナル経路やVEGF供給の停止を通じ、血管壁を成熟・安定化させる。その意味で周皮細胞は血管新生過程の中心的役割を担うものと考えられる。必然的に血管新生過程には周皮細胞の量的な需要が生じるが、そのために線維芽細胞がその供給源（前駆細胞）として機能し、一方、大食細胞は血管新生過程で生じる不要産物・異物の処理作用をもつものと考えられる。

上記の創傷治癒モデル動物を用いた研究成果を踏まえた発展的研究として、我々は細胞シート工学を用いた検索を引き続いで行った。細胞シート工学は、東京女子医大先端生命医科学研究所で開発された技術であり、温度応答性培養皿をはじめとした技術を用いて培養細胞シートを重ね、生体組織に類似した立体構築を持つ人工組織を作成し、移植の材料とするものである。この方法は、ドナー不足という問題を潜在的に抱える臓器移植や、移植部への定着性が問題となる細胞移植に代替しうる新規治療法へ繋がるものとして注目を浴びている。既に臨床応用も始まっており、大阪大学において、拡張型心筋症の患者に細胞シート移植を治療を行って成功を収めたことが報告されている（2007年12月15日 読売新聞）。しかしながら、その一方で、移植シートと宿主組織間を結ぶ血管新生機構についての細胞レベルの基礎的研究は詳細にはなされておらず、未だ不明の部分が多く残されている。

そこで我々は、21年度より創傷モデルの検索と並行して、移植細胞シートと宿主組織間を結ぶ血管新生機構について形態学的検索を行い、創傷治癒での検索結果と比較検討を行うこととした。検索にはラット左心室由来細胞（血管内皮細胞をはじめとする間質細胞も含む）を材料として作成した細胞シートを用いた。

21年度には、これまでの創傷治癒モデルでの研究結果と同様、細胞シート内に新生される血管内皮先端に周皮細胞が付着すること、また移植早期に細胞シートと宿主間に形成される連結血管の周囲に周皮細胞が分布す

ることが、主に樹脂準超薄切片を用いた検索により明らかになった。続いて22年度には、多重免疫染色法を軸に、これらの周皮細胞がdesmin、NG2をはじめとする種々の周皮細胞マーカーを発現すること、また、細胞シート由来および宿主由来の血管がまさに連結する部位に周皮細胞が集積することも観察され、周皮細胞が異種の血管連結を促進する作用を持つ可能性が示唆された。また、この部が血管内皮細胞・周皮細胞を含めて完全に基底膜で包まれることも明らかとなったが、このことは、周皮細胞が異種の血管連結を促進する際に、細胞が遊走する「足場」として基底膜成分を産生分泌する可能性を示唆するものと考えられた。

これらの検索結果から、細胞シート移植モデルにおける血管新生過程においても、周皮細胞が大きな機能的役割を果たすことが示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計8件）

- ① Morikawa S. and Ezaki T. (1番目) Phenotypic changes and possible angiogenic roles of pericytes during wound healing in the mouse skin, *Histology and Histopathology* 誌, in press, 2011, 査読有
- ② Shibata N., Kato Y. (他6名, 6番目), 4-hydroxy-2-nonenal upregulates and phosphorylates cytosolic phospholipase A (2) in cultured Ra2 microglial cells via MAPK pathways, *Neuropathology* 誌, 31巻, 122-128, 2010, 査読有
- ③ Kitahara S., Morikawa S. (他3名, 2番目) Alteration of angiogenic patterns on B16BL6 melanoma development promoted in Matrigel, *Medical Molecular Morphology* 誌, 43巻, 26-36, 2010, 査読有
- ④ Shimizu K., Morikawa S. (他2名, 2番目) Local lymphogenic migration pathway in normal mouse spleen, *Cell and Tissue Research* 誌, 338巻, 423-432, 2009, 査読有

有

⑤ Watanabe D., Tanabe A. (他4名, 4番目) Renoprotective effects of an angiotensin II receptor blocker in experimental model rats with hypertension and metabolic disorders. Hypertension Research 誌, 32巻, 807-815, 2009, 査読有

⑥ Shibata N. (他11名, 10番目) Activation of signal transducer and activator of transcription-3 in the spinal cord of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. Neurodegeneration Diseses. 誌, 6巻, 118-126, 2009, 査読有

⑦ Nakamura-Ishizu A., Morikawa S. (他2名, 2番目) Characterization of sinusoidal endothelial cells of the liver and bone marrow using an intravital lectin injection method, Journal of Molecular Histology 誌, 39巻, 471-479, 2008, 査読有

⑧ 江崎太一、北原秀治 (他2名, 4番目) 血管の三次元イメージング法, Surgery Frontier, 15巻, 318-323, 2008, 査読無

[学会発表] (計19件)

① 北原秀治, 森川俊一 (他2名, 2番目), 消化管腫瘍における微小循環系の変化は上皮の悪性化と相関するか?, 第18回日本血管生物医学会学術集会, 2010.12.2, 大阪

② 板垣裕子, 北原秀治 (他2名, 3番目), 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) モデルマウスにおける肝病態変化の形態学的解析, 日本解剖学会関東支部第98回学術集会 2010.10.16, 東京

③ Morikawa, S., Sekiya, S. (他3名, 1番目), The onset and morphological patterns of blood entry into the grafted multi-layered cell sheets fabricated with the rat heart ventricle, 16 International Vascular Biology Meeting 2010.6.21, Los Angeles, CA, USA

④ Kitahara S., Morikawa S. (他2名, 2番

目), Do any vascular changes reflect the neoplastic transformation in the intestinal tract during the adenoma-carcinoma sequence?, 16th International Vascular Biology Meeting, 2010.6.23, Los Angeles, CA, USA

⑤ Ezaki T., Shimizu K. (他3名, 3番目), Interrelationship between fat cells and lymphatic endothelial cells in an adjuvant-induced benign lymphangioma model, XXXVI Congress of European Society of Lymphology, 2010.5.14, Athens, Greece

⑥ Shimizu K., Morikawa S. (他2名, 2番目), An extravascular cell migration pathway to lymphogenic route as revealed by specific markers for lymphatic vessels in the mouse spleen, XXXVI Congress of European Society of Lymphology, 2010.5.14, Athens, Greece

⑦ 森川俊一, 関谷佐智子 (他3名, 1番目), 心筋シート移植片への血流開通機構の微細形態学的解析, 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2010.3.29, 盛岡

⑧ 田續綾野, 森川俊一 (他4名, 2番目), レクチン染色に免疫染色を組み合わせたヒト正常胎盤における糖鎖発現の解析, 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2010.3.29, 盛岡

⑩ 森川俊一, 関谷佐智子 (他4名, 1番目), 心筋シート移植片と宿主間に形成される連結血管の形態学的解析, 日本解剖学会関東支部第97回学術集会, 2009.10.24, 所沢

⑪ Morikawa S. & Ezaki T. (1番目), Pericytes promote angiogenesis at the early stage of wound healing, EXPERIMENTAL BIOLOGY 2009, 2009.4.20, New Orleans, LA, USA

⑫ 石津綾子, 森川俊一 (他2名, 2番目), 肝臓髄外造血ニッチの解析, 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2009.3.30, 岡山

⑬ 板垣裕子, 清水一彦 (他3名, 3番目),

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) モデルマウスにおける肝微小循環系の形態解析, 第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2009. 3. 29, 岡山

⑭ 北原秀治, 板垣裕子 (他 3 名, 3 番目), APC^{in/+}モデルマウスを用いた腫瘍新生血管の解析, 第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2009. 3. 29, 岡山

⑮ 清水一彦, 森川俊一 (他 4 名, 2 番目), マウス脾臓の微小循環系における特徴の形態学的解析, 第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2009. 3. 29, 岡山

⑯ 森川俊一, 関谷佐智子 (他 3 名, 1 番目), 移植した積層化心筋シートにおける血管網構築機構の形態学的解析, 第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2009. 3. 28, 岡山

⑰ 田續綾野, 森川俊一 (他 1 名, 2 番目), レクチンを用いたヒト胎盤の糖鎖発現に関する形態学的解析, 第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2008. 3. 28, 大分

⑱ 北原秀治, 森川俊一 (他 3 名, 2 番目), B16BL/6 melanoma を用いた腫瘍血管新生の解析, 第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2008. 3. 27, 大分

⑲ 石津綾子, 森川俊一 (他 2 名, 2 番目), 肝臓髄外造血において細網内皮細胞はニッチを構成する, 第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2008. 3. 27, 大分

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森川 俊一 (MORIKAWA SHUNICHI)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 70339000