

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590245

研究課題名(和文) 移植細胞シートと宿主を結ぶ架橋血管の内皮連結に周皮細胞が果たす機能的役割の解明

研究課題名(英文) elucidation of the functional roles of pericytes on the endothelial anastomosis between grafted cell-sheets and host blood vessels.

研究代表者

森川 俊一 (Morikawa, Shunichi)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：70339000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞シート移植においては宿主とシート間の十分な血液循環がその高い生着性を可能にするが、その血液循環形成の詳細なメカニズムは不明である。今回、ラット心室壁を材料に細胞シートを作製し、モデルラット背筋に移植した一連の実験からは、移植後早期に細胞シートと宿主の境界部に動員された周皮細胞が基底膜成分を産生・分泌する事により内皮細胞に分子的「足場」を提供し、宿主由来の血管内皮細胞と細胞シートに内在する血管の内皮細胞の遊走、および相互の接着を促進して血管吻合をさせることで移植早期の血流開通が可能になることが強く示唆される研究成果を得た。

研究成果の概要(英文)：A high viability of grafted cell sheets is likely due to a sufficient blood circulation between grafts and hosts. However, the cellular mechanism of the sufficient circulation is still enigmatic. In this study, we used the cell sheets fabricated by rat heart wall, which contain vascular endothelial cells beforehand and usually develop intrinsic vascular network before grafting on host rat muscles. Early after grafting, blood inflow from the hosts into the grafts was confirmed by a tracer experiment. Vascular anastomosis between hosts and grafts was also observed. The anastomosed vessels were already distributed with pericytes and entirely covered by a vascular basement membrane. Moreover, it turned out that the pericytes had an ability to produce vascular basement membrane constituents. We conclude that pericytes promote vessels of hosts and grafts by producing vascular basement membrane, that functions as a scaffold for migrating vascular endothelial cells to anastomose each other.

研究分野：組織学

キーワード：周皮細胞 細胞シート工学 基底膜 血管新生 GFP 多重免疫染色 電子顕微鏡 レクチン

1. 研究開始当初の背景

再生医療分野において、細胞シート工学を用いた移植技術が従来の臓器および細胞移植に優る有用な技術として注目を集めていた。この手法では、温度応答性培養皿を用いて培養した細胞シートを培養皿から剥離して順次重ねることにより(積層化)、生体内の組織と同様の三次元的人工「組織」を作製できる。この人工組織は宿主組織への生着性に優れており、臨床応用においても成功をおさめていた(日本経済新聞 2010年10月20日)。しかしながら、研究開始当初においては移植した細胞シートが生着性に優れている理由について細胞レベルでの検証が不十分であった。すなわち、一般に移植組織の生着には移植組織と宿主間の血流の開通が必須であるが、特に移植した細胞シートに宿主側からの血流がいかんして流入するののかという点については不明の部分が多く残されていた。この血流開通の機序を細胞レベルで検証して明らかにすることは、この移植技術をより精密なものとし、また将来の移植医療の発展にもつながるものと考えられる。

2. 研究の目的

我々は、過去の研究において、微小血管の内皮細胞外壁に分布する周皮細胞が、「腫瘍発達や創傷治癒に伴う血管新生過程において血管新生を促進する可能性を明らかにしてきた。また今回、予備的な細胞シート移植実験において、細胞シート内および宿主とシートの境界領域に周皮細胞が多数分布することから、移植シート内の血管新生や移植シートと宿主の血管吻合過程においても周皮細胞が何らかの重要な機能を担うのではないかと推測し、その機能的役割の詳細について形態学的手法を駆使した検索を行うこととした。

3. 研究の方法

ラットを用いた心室壁由来細胞シート移植モデルを用い、移植前細胞シート、移植後24時間、48時間の時点で組織サンプルを採取した。その後、各時点における細胞シート内の血管成熟過程や細胞シートと宿主組織の血管吻合について、レクチン静脈注入法・多重免疫染色法を組織サンプルに施して可視化し、共焦点レーザー走査顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いて周皮細胞の機能的役割を追跡した。

4. 研究成果

細胞シート移植モデル動物に血管内皮細胞内腔面の糖鎖に結合するトマトレクチンを静脈注射して血流の開通時期について検討した結果、細胞シートと宿主との血流開通が移植6時間後から12時間後までの間の極めて早期に起こることがあきらかとなった。また移植後早期には細胞シートが浮腫

状に厚い組織構築を呈するものの、時間の経過とともに組織間隙が狭まり、シートの厚みも減じていったが、静脈注射したレクチンが、移植早期の細胞シート内で多量に血管外に漏出しており、時間の経過とともにその漏出が減じていくことから、移植早期の段階で細胞シートと宿主組織との血流は開通するが、細胞シート内の血管壁が移植早期には未だ未熟であり、時間の経過とともに成熟していくものと考えられた。また、細胞シートの材料となる左心室壁由来細胞には血管内皮細胞も含まれるため、細胞シート内には移植前の培養時に血流の無い環境下で原始的血管網が形成されるが、これら原始的血管では内皮細胞が肥厚し、血管内腔も非常に狭く、壁には周皮細胞を欠き血管基底膜も不連続であったが、移植後24時間～48時間での細胞シートでは血管内皮細胞が扁平化し、血管内腔も広がっていた。また血管壁にはNG2 proteoglycan等のマーカーに陽性の周皮細胞も分布するようになり、かつ血管基底膜も連続するように変化した。中枢神経系の微小循環系では周皮細胞による血管壁の安定化作用や血管壁透過性の制御作用が知られていることから、移植前シートにおける原始的血管壁に移植後周皮細胞が導入され、その後時間の経過とともに内皮細胞間の接着の強化を促していく事で細胞シート血管の成熟がもたらされるものと推測した。

移植後早期における細胞シートと宿主の境界部結合組織を詳細に観察した結果、この部位に両組織を結ぶ吻合血管が形成されている事が明らかとなった(図1)。この吻合血管が移植後早期に形成される事で、両者間の極めて早い血流開通が可能となる。これらの吻合血管は、早期に形成されるのにも関わらず、type-IV collagen/laminin/griffonia simplicifolia lectin I陽性の血管基底膜に連続的に覆われ、またNG2/PDGFR beta/alpha smooth muscle actin陽性の周皮細胞の分布も確認された。宿主にGFP発現動物を用いた解析からは、この時点で多数のGFP陽性の宿主由来細胞が細胞シート内に侵入する事が確認された。また、細胞シートと宿主間の吻合血管に分布する周皮細胞に関しては、これらは宿主組織に由来せず、細胞シート内細胞に由来することも明らかとなった。

さらに、吻合血管内においては宿主と細胞シートの異種の内皮細胞がキメラ状に接する部位が観察されたが、その部位では両者の内皮細胞がadherence junction様の接着装置を介して強固に接着することが電子顕微鏡的に確認された。また、移植早期の24時間の時点でのレクチン静注実験からは、この部位からのレクチン漏出は認められない事が明らかとなり、未熟な血管が多

くレクチンの大量漏出が認められた細胞シート内の血管とは対照的な結果となった。

この吻合血管形成を担うシグナル経路を明らかにするため、先ず血管形成に一般的である血管内皮成長因子VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)シグナルを免疫組織化学的に追跡したところ、吻合血管周囲には免疫反応に乏しく、その関与は少ない事が明らかになったものの、改めて、発生時に神経や血管、造血等の分化過程に重要な働きを担うNotch経路に注目して検索を行なったところ、その受容体Notch-1が架橋血管や細胞シート内に広く分布することが明らかとなった。このNotch経路は周皮細胞遊走の経路であるPDGFBとその受容体PDGFR beta(platelet-derived growth factor B/platelet-derived growth factor receptor-beta)経路を制御すると示唆され、それに呼応するように吻合血管壁に分布する周皮細胞がPDGFR betaを胸発現していた事から、細胞シート移植後早期にNotch経路を介してPDGF経路が働き、周皮細胞を動員して吻合血管形成を促す可能性が強く示唆された。

さらに、移植後早期に観察される吻合血管が既に周皮細胞を備え、かつ連続する血管基底膜で包まれる事から、PDGF経路を介して動員された周皮細胞が、基底膜をはじめとした細胞外マトリクスを産生・分泌する事により内皮細胞に分子的「足場」を提供し、血管内皮細胞の遊走と相互の接着を促進して血管吻合をさせることで移植早期の血流開通が可能になるものと我々は推測し、この部位における周皮細胞の基底膜制分産生能をさらに追跡した。

基底膜の主要な成分であるIV型コラーゲンは細胞内でコラーゲン特異的分子シャペロンHSP47(Heat Shock Protein 47)の作用を受けてから分泌されるため、HSP47の細胞内局在はその細胞のIV型コラーゲン産生能を示すものと考えられるが、HSP47に対する抗体を用いた検索からは、吻合血管壁における周皮細胞がHSP47抗体に強陽性を示した事から、これら周皮細胞による血管基底膜の産生が裏付けられ、足場を提供する事による周皮細胞の吻合血管形成促進機能が強く示唆される成果が得られた。

さらに周皮細胞における吻合血管の形成促進機能を検証するため、PDGF経路の遮断実験を行なった。血管壁への周皮細胞の動員時、血管内皮細胞はPDGFBを自身の細胞外表面近くに分泌して保持するが、周皮前駆細胞はこの受容体PDGFR を介して内皮細胞に接着し、その後、PDGFR の細胞内領域がリン酸化されることで周皮細胞に分化する。tyrphostin AG1295という薬剤は、このPDGFR のリン酸化を阻害して前駆細胞を周皮細胞に分化できなくし周皮細胞の動員

を遮断する。先ず移植前の細胞シート培養段階で、培養液中にAG1295を添加して作製した細胞シートを動物に移植して、24時間後に組織サンプルを採取したところ、通常の場合の移植実験では、移植後24時間の段階で細胞シートは宿主組織に強固に接着していたのに比べて、AG1295処理細胞シートを移植した場合には、細胞シートは宿主組織から極めて剥がれ易く、しっかりと生着していなかった。また、レクチンの漏出実験でも示したが、移植後24時間の細胞シートではシート内の血管透過性が高く、動物を灌流固定して血液を除去した後も、移植細胞シート内には漏出した血液成分が残存し、組織採取時には細胞シートが肉眼的に赤く観察される。しかしながら、AG1295処理細胞シートではシートに血液の残存は確認されず、細胞シートと宿主組織間の血管の吻合形成、および血流の開通が成立していないものと考えられた。

また、上述のように、移植前の細胞シートでは、シート内にCD31等の血管内皮マーカーで染色される内皮細胞が原始的血管網を形成して観察されるが、AG1295投与シートではCD31陽性内皮細胞は数に乏しく、また網状構造は形成されず、断片的に内皮細胞が分布するのみであった。移植前のシート内血管には典型的な周皮細胞はあまり確認されず、代わりにSMAやNG2等の周皮細胞マーカーを発現するが血管壁には密着せず、その近傍に分布する周皮前駆細胞と考えら

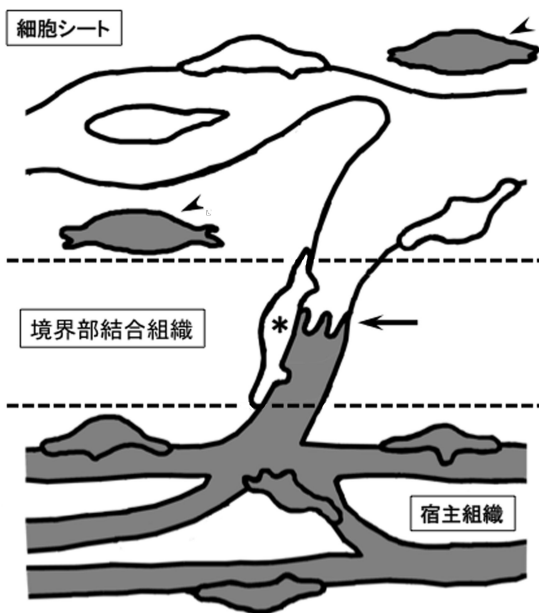


図1 移植後24時間の時点における細胞シートと宿主の境界部模式図。宿主由来構造をグレー、細胞シート由来構造を白で示す。細胞シート内にサイズの様々な洞様の血管網が認められるが、これらの血管は、宿主との境界部で宿主から伸びると共に吻合血管を形成する(矢印)。細胞シート/宿主の双方の血管壁に周皮細胞の分布が認められるが、吻合血管壁には細胞シート由来の周皮細胞が分布する(*)。この時点では、吻合血管の形成に加え、細胞シート内への宿主細胞の侵入も併せて観察される(矢尻)。

れる細胞が多数観察されたが、以上の結果から、移植前におけるシート内の血管網構築メカニズムにこれらの周皮前駆細胞が何らかの重要な機能を持つ事が強く示唆される結果となった。

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)

Y. Kato, T. Iwata, S. Morikawa, M. Yamato, T. Okano, Y. Uchigata, Allogeneic transplantation of an adipose-derived stem cell (ASC) sheet combined with artificial skin accelerates wound healing in a rat wound model of type 2 diabetes and obesity. *Diabetes*, 査読有、Published online before print, 2015, doi: 10.2337/db14-1133

S. Kitahara, Y. Suzuki, M. Morishima, A. Yoshii, S. Kikuta, K. Shimizu, S. Morikawa, Y. Sato, T. Ezaki, Vasohibin-2 modulates tumor onset in the gastrointestinal tract by normalizing tumor angiogenesis., *Mol. Cancer*, 査読有, 13 巻, online journal, doi:10.1186/1476-4598-13-99

J. Mitsuhashi, S. Morikawa, K. Shimizu, T. Ezaki, Y. Yasuda, S. Hori, Intravitreal injection of erythropoietin protects against retinal vascular regression at the early stage of diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats., *Exp. Eye Res.*, 査読有, 106 巻, 2013, pp.64-73

H. Itagaki, K. Shimizu, S. Morikawa, K. Ogawa, T. Ezaki, Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice. *Int J Clin Exp Pathol.* 査読有, 6 巻, 12 号, 2013, pp.2683-2696.

森川 俊一, 佐藤 梓, 江崎 太一, アルシアンブルーを用いたマウス横隔膜毛細血管糖鎖の微細構造学的解析, 東京女子医科大学総合研究所紀要, 査読無, 32 巻, 2012, pp.10-11

森川俊一, 渡邊俊之, IMARIS 画像解析システムを用いたマウス横隔膜リンパ管網の3次元解析, リンパ学(日本リンパ学会機関誌) 査読無, 35 巻, 2 号, 2012 113-115

森川俊一, 江崎太一, レクチンを用いた微小血管透過性亢進のイメージングと定量化, 顕微鏡(日本顕微鏡学会和

文誌) 閲読有, 46 巻, 3 号, 2011, pp.195-200
S. Morikawa, and T. Ezaki, Phenotypic changes and possible angiogenic roles of pericytes during wound healing in the mouse skin., *Histol. Histopathol.*, 査読有, 26 巻, 8 号, 2011, pp.979-995

[学会発表](計9件)

S. Morikawa (symposist/chair), "Visualization of Angiogenesis", symposium 5 "The strategies aimed at maintenance of tissue perfusion, Regulation of cardiomyocyte apoptosis and angiogenesis", The Joint Meeting of the 120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, March, 2015, 神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

森川俊一, 「血管およびリンパ管内皮細胞における糖鎖構成の比較解析」, 第119回日本解剖学会総会全国学術集会(2014年3月), 自治医科大学(栃木県・下野市)

森川俊一, 江崎太一, 「内皮の糖鎖発現を手がかりとしたリンパ管と血管の新たな差異化の試み」, 第37回日本リンパ学会総会 Award Session リンパ学 36(supplement) P. 28, (2013年6月) アクロス福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

森川俊一, 関谷佐智子, 清水達也, 大和雅之, 岡野光夫, 江崎太一, 「周皮細胞は宿主と細胞シートの血管を24時間以内に連結する」, 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, (2013年3月), サポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県・高松市)

S. Morikawa and T. Ezaki, "Pericytes show different phenotypes during wound healing and promote the initial stage of angiogenesis in the mouse skin wound", 第19回日本血管生物医学会(2012年12月10日)東京ステーションコンファレンス(東京都・中央区)

森川俊一(シンポジスト/座長), 渡邊俊之, 「IMARIS 画像解析システムを用いたマウス横隔膜リンパ管網の3次元解析」, 第36回日本リンパ学会総会 スポンサーシンポジウム「リンパ管イメージングの新展開へ向けて」, リンパ学 36(supplement) (日本リンパ学会機関誌 抄録号):73, (2012年6月) 東京女子医科大学(東京都・新宿区)
森川俊一, 江崎太一, 「マウス皮膚創傷

治癒における周皮細胞の血管新生促進作用」、第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会、(2012 年 3 月)、山梨大学(山梨県・甲府市)

森川俊一、「移植心筋細胞シートへの血流開通は宿主から伸長する血管がシート内血管に連結することによって術後 24 時間以内に成立する」、第 2 回グローバル COE 公開シンポジウム拠点活動報告、(2011 年 10 月)東京女子医科大学(東京都・新宿区)

S. Morikawa and T. Ezaki:

Morphological approaches to the analysis of microcirculation using three-dimensional imaging: Its significance and applicability., Symposium28, “ Short-term and long term regulatory mechanisms of circulation: from molecule to organism ”、第 88 回日本生理学会大会/116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会 (2011 年 3 月)パシフィコ横浜会議センター(神奈川県・横浜市)

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・講師
研究者番号 : 70339000