

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461121

研究課題名(和文)再生医療開発にむけた間葉系幹細胞様の毛細血管周細胞の機能解明

研究課題名(英文)Role of Capillary Stem Cells in Tissue Regeneration

研究代表者

川辺 淳一 (KAWABE, JUNICHI)

旭川医科大学・医学部・特任教授

研究者番号：10400087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体組織中に存在する毛細血管細胞から、多分化能を有する周細胞の分離に成功した。同細胞は、毛細血管形成や神経などの分化能を有し、従来の再生細胞に比べ、高い組織再生能をもつことを確認した。同細胞を毛細血管幹細胞(Capillary stem cells; CapSCs)と命名した同細胞を利用した再生医療にむけて、新しいプロジェクトへ発展している。

研究成果の概要(英文)：We found novel somatic stem cells, which is successfully isolated from capillary pericytes using cellular specific marker. These cells can form capillary by their own, and have multipotency to differentiate to mesenchymal and neuronal cells. These cells, termed capillary stem cells, CapSCs have regenerative potency in several diseases such as peripheral ischemia. Now, we are developing new strategy using CapSCs for regenerative medicine.

研究分野：血管新生

キーワード：血管新生 毛細血管 再生医療 神経再生 ペリサイト

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は、骨髄由来内皮前駆細胞 (EPC) を用いて組織の血管新生効果を観察していたが、既報通りに、安全性および有効性を確認できたが、増加した新生血管は、ほとんどが EPC 由来でないこと。新生血管が幼若性であることから、EPC でない組織内「血管前駆細胞」、さらに血管成熟化に関わる血管周細胞(PC)に興味をもった。

(2) PC の一部に、間葉系幹細胞 (MSC) 様の多分化をもつことが報告され^[1]、組織再生に関わる組織幹細胞の主体となるものとして注目されるようになった。しかし PC は、複数の集合体からなるが、それらを分離・分別できる特異的マーカーなどの方法が確立していない。どのように、MSC の機能をもつ PC(MSC-PCs) を分別する方法もなく、MSC-PC の生体内での病態役割など不明であった。

(3) 我々は、上記した血管成熟機構の解明のために独自に樹立した毛細血管由来細胞株^[2]を用いて研究を進めてきたが、そのなかで、今回の研究構想の着想にいたった。

2. 研究の目的

我々が樹立した MSCs および PCs の基本機能を保持する MSC-PCs 細胞株を利用し、MSC-PCs の特性解析および同細胞の同定、分離法を開発していく。将来的には、心血管疾患ばかりでなく、代謝疾患、悪性腫瘍などの各種病態下での様々な組織内の MSC-PCs を解析して、毛細血管の新たな役割の解明と共に治療開発に繋げていく。

- (1) MSC-PCs の幹細胞特性に関わる因子の探索と、同細胞の機能解析
- (2) MSC-PCs の特異的マーカーの探索と、同細胞の同定、分離法の開発
- (3) MSC-PCs の下肢虚血病態下での役割評価

3. 研究の方法

目的 1 MSC-PCs の幹細胞特性に関わる因子の探索と同細胞の機能解析

(1) 一次機能解析スクリーニング

MSC-PCs 「幹細胞機能」の程度 (高)MSC#7 #3 #9 (低)の順列で変化する遺伝子群を、microarray により選定。

siRNA 導入 - 候補因子発現抑制 (knock down; KD) 合成 siRNA を lipofectamine による導入。

脂肪分化能の評価 短時間(3日)で簡易的に評価できる脂肪分化能を一次機能アッセイに利用。脂肪分化細胞(BODIPY 染色)/総細胞数(Hoechst 核染色)を評価。他の間葉系細胞への分化能の評価 上

記で選別された候補因子に対し、さらに骨芽・軟骨細胞分化能への影響を観察する。分化誘導後 1 週後に分化指標遺伝子発現量 (osteopontin, collagen など) を評価。

(2) 二次機能解析スクリーニング
一次スクリーニングで選別された候補因子に対して、以下の二次スクリーニングを行っていく。

発現ベクター導入による標的因子過剰発現 (over expression; OE) PCR 法あるいは人工合成(GeneScript 社)による選定因子の cDNA 調整。MSC-PCs(高分化能 MSC#7 および低分化能#9 株)への組み換え発現ベクター(pcDNA)の導入。

間葉系細胞への分化能への影響 上記同様に分化能への影響を機能評価する。候補遺伝子の幹細胞調節機能解析 最終的な選定候補因子の KD あるいは OE した細胞を対象に、*in vitro* 血管新生能 (3D matrigel 内での内皮細胞分化や毛細血管構造形成能) や *in vivo* 組織細胞分化能 (SCID マウスの cardiotoxin 損傷骨格筋組織への蛍光発光細胞導入による分化能評価)。

目的 2 MSC-PCs の特徴的マーカーの探索と、同細胞の同定、分離法の開発

(1) 各種組織における候補マーカー陽性細胞の局在 ;

マウス (C57BL6) 各種組織 (脂肪、骨格筋、心筋など) に対して組織学的解析 (電顕および免疫染色共焦点顕微鏡観察) を行う。特に、我々が独自に開発した CCT コラーゲン薄膜に二次元に展開する末梢毛細血管組織は、詳細な毛細血管の詳細な組織学的解析が可能となる。

(2) 脂肪組織から候補マーカー陽性細胞の分離と機能解析

上記 (1) で陽性細胞の発現量の多いマウス組織、あるいは脂肪組織から毛細血管細胞を含む間質細胞(stromal cells)分画を取り出し、PCs マーカーである NG2 (あるいは CD146) 陽性かつ MSC-PCs マーカー候補陽性細胞を MACS (MB 社) や FACS(Aria, BD 社)により分離精製する。

単離した細胞に対して、遺伝子発現プロファイル、分化能を含めた細胞機能、生体での分化能を解析する。(*In vivo* 細胞導入実験の際は、GFP 発現マウスの組織から分離した GFP 発現細胞を利用)

目的3 MSC-PCs の疾病病態下での役割評価

(1) マウス下肢虚血モデルにおける MSC-PCs 細胞導入実験

マウス(C57BL/6およびSCID)のHind limb ischemia modelを作成。目的1の成果で選定した因子のKD/OEしたMSC-PCsを虚血組織内に注入し、下肢還流度をドップラー血流計で、導入細胞の血管あるいは骨格筋などへの分化度は免疫組織学的解析で評価(目的1C参照)。

(2) 組織由来 MSC-PCs 細胞導入効果の評価

目的2で調整した、組織由来 MSC-PCs においても、上記(1)同様に虚血組織内導入の効果を確かめる。この際、分離する前の間質細胞粗成分や、骨髄由来内皮前駆細胞(EPC)との虚血改善効果を比較検討する。

4. 研究成果

(1) MSC-PCs の幹細胞特性に関わる因子の探索と同細胞の機能解析

独自に樹立した毛細血管細胞株を利用したアレイ解析により、幹細胞機能を持つ周細胞の特異的な遺伝子の抽出に成功した。この中から、siRNAによる遺伝子低下実験により、周細胞における分化能(主に脂肪分化能で評価)に影響を与える因子を5つ抽出することに成功した(知財申請の関係で具体的な因子名は不明記)。現在も、同因子における機能解析を行っているが、その中で、細胞表面に発現し、同細胞のマーカーとして利用できる因子を見だし、引き続き、下記(2)で記述するプロジェクトに重点化して研究をおこなってきた。

(2) MSC-PCs の特徴的マーカーの探索と、同細胞の同定、分離法の開発

上記(1)で見出した因子の中から、多分化能をもつPCを同定、分離できる特異的マーカーを見出すことに成功した。マウスおよびヒト皮下脂肪および骨格筋などの末梢組織の毛細血管周細胞の中から、幹細胞機能をもつ細胞を分離し、その機能を明らかにしてきた。これらの細胞は、内皮・周細胞に分化し毛細血管～成熟血管を自ら形成することができ、脂肪、骨芽、軟骨細胞など間葉系細胞への分化能をもち(間葉系幹細胞様)、神経、グリア系細胞への分化能をもつ(神経幹細胞様)。我々は、この独自のマーカーで定義されたMSC-PCs細胞を毛細血管幹細胞(capillary stem cells; CapSCs)と命名し、特許申請中であり、論文投稿中である。

(3) CapSCs の疾病病態下での役割評価

マウス下肢虚血モデルにおいて、CapSCs導入により、骨髄由来EPCなどと比べ、著明な下肢虚血改善効果を認めた。組織内での比較的成熟した血管新生作用を認めた。併せて、CapSC自身が血管細胞になって長期に組織にとどまることを確認している。また骨格筋挫滅マウスモデルにおいて、CapSC導入により、対照の粗PCにくらべ、非常に高い骨格筋再生能をもつことを確認した。

【引用文献】

- (1) M. Crisan, S. Yap, L. Casteilla et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3, 301-313, 2008
- (2) 末梢組織の毛細血管構成細胞の不死化細胞株 特願 2012-24854 代表発明者 川辺淳一

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3件)

M Matsuki, J Kawabe et al. Ninjurin 1 is a novel factor to regulate angiogenesis through the function of pericytes. *Circ J.* 査読あり 79, 1364-1371, 2015.

M. Kabara, J. Kawabe, 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* 査読あり 94, 1340-1354, 2014.

J. Kawabe, Naoyuki Hasebe, Role of the vasa vasorum and vascular resident stem cells in atherosclerosis, *BioMed Research International* 査読あり, 2014, 1-8 DOI: 10.1155/2014/701571

〔学会発表〕(計9件)

川辺淳一 Novel adhesion molecule, Ninjurin1 for capillary formation through endothelial-pericytes interactions 第93回日本生理学会総会 シンポジウム発表、2016年3月23日 札幌

川辺淳一 Adventitial Angiogenesis and Vascular Remodeling -Novel Role of Capillary Pericytes in Neovessel- 第30回日本循環器学術総会 シンポジウム発表、2016年3月10日 仙台

川辺淳一 組織再生における幹細胞様ペリサイト Capillary Stem Cells の役割 第23回日本血管生物医学学術総会 シンポジウム発表、2015年12月10日 神

戸

川辺淳一 血管再生と血管外膜：微小血管の成熟化と周細胞 第47回 日本動脈硬化化学会 総会 シンポジウム発表、2015年7月10日、仙台

川辺淳一 毛細血管の秘めた能力 Capillary Stem Cells による臓器再生療法 第63回 日本輸血・細胞治療学会総会 シンポジウム発表、2015年5月29日 東京

M Kabara, J Kawabe et al. Identification of Novel Multipotent Pericytes to Form Capillary-like Structure On Their Own and Differentiate into Mesenchymal and Neural Lineage Cells. American Heart Association (AHA) 2015年11月、オーランド米国 M Matsuki, J Kawabe, et al. Ninjurin1 is a novel factor to mediate the microvessels and the circulation recovery in the hind limb ischemia. 第79回日本循環器学会学術集会 2015年4月 大阪

鹿原 真樹, 川辺淳一 その他、毛細血管周細胞からの多分化能細胞 (Capillary Stem Cells; CapSCs) の同定とその機能解析 第14回再生医療学会 2015年3月 横浜

M Kabara, J Kawabe et al. Characteristics of novel capillary delivered stem cells from vasa vasorum of injured vascular walls 日本循環器学会 総会 2014年3月21日 東京

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

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：旭川医科大学

種類：特許

番号：特許願 2015-151601 号

出願年月日：平成 27 年 7 月 1 日

国内外の別： 国内

取得状況 (計1件)

名称：Ape1 遺伝子導入による高機能化幹細胞・前駆細胞

発明者：川辺淳一、山内敦司

権利者：旭川医科大学

種類：特許

番号：特許第 5880867 号

出願年月日：平成 23 年 8 月 9 日

取得年月日：平成 28 年 2 月 12 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

- (1) **OideCapiSEA** (旭川医科大学、第一三共と三菱UFJキャピタルによる新規幹細胞におけるオープンイノベーション研究; CapSC を利用した臨床応用にむけた基礎研究プロジェクト) プロジェクト代表者 川辺淳一 平成 28 年 4 月より運用中
- (2) 研究代表者主催 旭川医科大学心臓血管再生先端医療開発講座 ホームページ; <http://www.amc1nai.net/cvri>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川辺 淳一 (KAWABE, Jun-ichi)
旭川医科大学・医学部・特任教授
研究者番号：10400087

(2) 研究分担者

平 義樹 (HIRA, Yoshiki)
旭川医科大学・看護学・准教授
研究者番号：70199024