

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591416

研究課題名（和文） 結合組織常在性線維芽細胞の血管内皮細胞への分化誘導機構の解明：再生医療をめざして

研究課題名（英文） A study on the mechanism of induction of transdifferentiation of tissue-resident fibroblasts into endothelial cells, aiming at regenerative medicine.

研究代表者

藤原 隆 (FUJIWARA TAKASHI)

愛媛大学・総合科学研究支援センター・准教授

研究者番号：30036496

研究成果の概要：血管再生医療に必要な血管内皮細胞の入手先として結合組織常在性の線維芽細胞に注目し、線維芽細胞の血管内皮細胞への分化について遺伝子組換えマウスの角膜組織の移植や角膜細胞の培養を行って検討した。その結果、線維芽細胞の一種である角膜細胞は血管内皮細胞に分化・転換し、血管内皮に組み込まれること、線維芽細胞の内皮細胞への分化・転換は血管新生を起こしている組織に含まれる物質により誘導されることが明らかになり、血管内皮細胞の入手先として有望であると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2006年度 | 1,800,000 | 0       | 1,800,000 |
| 2007年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 2008年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度     | 0         | 0       | 0         |
| 年度     | 0         | 0       | 0         |
| 総計     | 3,500,000 | 510,000 | 4,010,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：血管新生、内皮細胞、線維芽細胞、幹細胞、移植・再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

血管再生医療は虚血に陥った組織等を再生する治療法として注目されている。血管再生医療に必要な血管内皮細胞は、末梢血に含まれている血管内皮前駆細胞から得る試みがすでに臨床に応用されつつある。しかし、血管内皮前駆細胞は末梢血中には非常に少なく治療に必要な細胞数を得るのは容易でない。一方、ここ数年来、脂肪組織が幹細胞を含み、この幹細胞は神経細胞、筋細胞、骨

芽細胞や軟骨細胞等の他、血管内皮細胞にも分化すると報告され、多くの研究者の関心を集めている。しかし、脂肪組織は種々雑多な細胞から構成されているので、脂肪組織のどの種の細胞が血管内皮細胞に分化・転換するかは不明なままである。

## 2. 研究の目的

本研究では、血管再生医療に必要な内皮細胞

胞を容易に入手できるようにするため、結合組織に大量に存在する組織常在性の線維芽細胞に焦点を絞り、これが血管内皮細胞に分化・転換するか否かを検討した。

### 3. 研究の方法

本研究では種々の実験を行った。すべての動物実験は愛媛大学動物実験委員会の承認を得た後、実施した。麻酔が必要な場合は、ジエチルエーテルの吸入あるいはペントバルビタール(40mg/kg)の腹腔内投与を行った。また、すべての遺伝子組換え実験は愛媛大学総合科学研究支援センター遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得た後、実施した。

#### (1) 新生血管による培養皮下線維芽細胞の取り込み

近交系マウスをジエチルエーテルの吸入により安楽死させた後、皮下組織を摘出し、これを元に線維芽細胞を培養した。培養細胞を蛍光色素(PKH-26)で染色した後、同系統マウスの角膜ポケットに移植し、硝酸銀焼灼により血管新生を惹起した。数日後、凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡により観察した。

#### (2) 腫瘍組織の新生血管による培養角膜細胞の取り込み

血管内皮細胞特異的蛋白質である Flk-1 (VEGFR-2)の遺伝子のプロモーターに lacZ 遺伝子を結合した Tg マウス(Flk1-lacZ マウス)を深麻酔した後、角膜固有質を一部摘出し、これを培養した。角膜細胞が増殖した後、この培養角膜細胞を、肉腫の移植により角膜に血管新生を引き起こした野生型マウスの尾静脈に注入、移植した。対照群としては野生型マウスの角膜細胞を培養し、同様に野生型マウスの尾静脈に注入、移植した。この3日後、腫瘍が肥大した眼球を摘出、固定し、X-Gal 染色を行った。この角膜組織を脱水し、パラフィンに包埋した。厚さ 5 $\mu$ m の連続切片を 50 枚作製した。これらの切片を 5 枚毎に観察し、X-Gal 陽性の粒子を含む血管の割合や内皮細胞の核当たり(内皮細胞当りに替わるもの)の粒子の数を求め、対照群と比較した。

#### (3) 血管新生組織による培養角膜細胞の血管内皮細胞への分化・転換作用

Flk1-lacZ マウスの角膜細胞を上と同様に培養、増殖させた。この培養細胞に血管新生組織の抽出液を加えて、培養した。血管新生組織の抽出液は、深麻酔下で硝酸銀焼灼を行って血管新生を惹起したラットの角膜より分離、調整した。抽出液添加の数日後、細胞を固定し、X-Gal 染色を行って倒立顕微鏡により観察した。対照群は野生型マウスの培養

角膜細胞に、上と同様にラット角膜の抽出液を添加した。

#### (4) 炎症組織の新生血管による培養角膜細胞の取り込み

血管内皮細胞特異的蛋白質である Tie2 遺伝子のプロモーターに GFP 遺伝子を結合した Tg マウス(Tie2-GFP マウス)から、深麻酔下で、角膜固有質の組織片を摘出し、これを野生型マウスの角膜ポケットに移植した。移植の数日後、角膜に硝酸銀焼灼を行い、血管新生を惹起した。角膜ポケットの下角に滅菌した長さ 0.2mm 以下の縫合糸を入れ、角膜片の移植場所の目印とした。硝酸銀焼灼の数日後、深麻酔下で、角膜を摘出し、蛍光顕微鏡により、観察、撮影した。

#### (5) 血管新生組織による培養角膜細胞の血管内皮細胞への分化・転換作用の確認

Tie2-GFP マウスの角膜細胞を(2)と同様に培養し、この培養細胞に、(3)と同様に硝酸銀焼灼により血管新生を惹起したラット角膜の抽出液を加え、数日間培養した。この後、角膜の血管新生組織を蛍光顕微鏡により観察した。対照群は、リン酸緩衝生理食塩水を添加した。

### 4. 研究成果

#### (1) 新生血管による培養皮下線維芽細胞の取り込み

マウス皮下組織の培養線維芽細胞を蛍光色素で染色し、角膜に移植したところ、蛍光を発する新生血管が観察された。図1の上の写真は、血管の明視野像で、管腔を細い線状

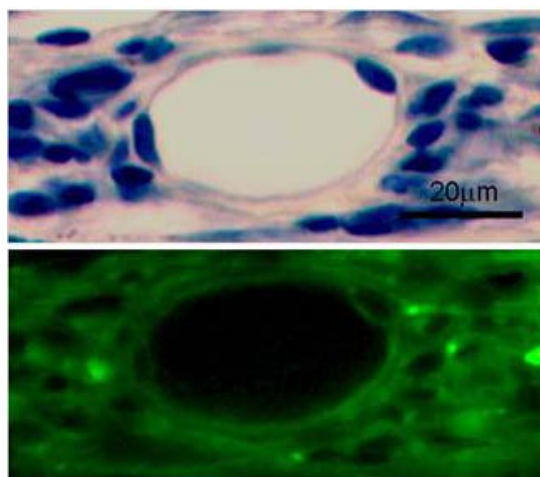


図1 培養皮下線維芽細胞の血管内皮への取り込み

上：光学顕微鏡写真 下：蛍光顕微鏡写真

に取り囲む内皮と内皮細胞の核を示す。下の写真は、同じ位置で撮影した蛍光顕微鏡像で、

上の写真の内皮と同じ位置に線状に緑色の蛍光を発する内皮細胞、特に核を囲む細胞質を明瞭に示している。

内皮が蛍光を発する新生血管の周囲には蛍光を発する多数の細胞が認められた。この細胞は、蛍光を発することから移植した培養線維芽細胞であると見なすことができる。蛍光を発する新生血管の周りに蛍光を発する線維芽細胞が多数集まっているということは、線維芽細胞が多数集まった所に新生血管が伸長してきたことを示しており、新生血管は周囲に存在する線維芽細胞を何らかのメカニズムで取り込むことを示唆している。しかし、本研究では、新生血管が周りの線維芽細胞を取り込むメカニズムについては、明らかにすることは出来なかった。今後は、電子顕微鏡による詳細な研究が望まれるところである。

図1の写真から、皮下組織の線維芽細胞は血管内皮細胞に分化・転換し、新生血管に取り込まれることが示されたが、皮下組織には多数の微小血管があることから、培養線維芽細胞の中に血管内皮細胞が混在している可能性は否定できない。そこでこの可能性を排除するために、血管を全く含まない組織である角膜を用いることとした。角膜の固有質は血管を含まず、しかも線維芽細胞の一種の角膜細胞のみからなる純粋な組織である。角膜を用いることにより線維芽細胞が内皮細胞に分化・転換することを明瞭に示すことができるのではないかと考え、以下の実験を行った。

#### (2-1) 腫瘍組織の新生血管による培養角膜細胞の取り込みの顕微鏡観察

角膜細胞、すなわち線維芽細胞が血管に取り込まれるか否かを調べるために、角膜細胞を培養、増殖した後、移植し、その後、新生血管の内皮に移植した細胞を観察できるか否かを検討した。このために移植する細胞を標識し、レシピエントの細胞と識別できるようにした。移植する細胞を標識するために Flk1-lacZ マウスを用いた。このマウスは、血管内皮細胞特異的蛋白質である Flk-1 (VEGFR-2) を産生する遺伝子のプロモーターに lacZ 遺伝子を結合した Tg マウスで、内皮細胞のみが lacZ 遺伝子を発現し、X-Gal 染色により染色される。このマウスの細胞は、移植した場合、血管内皮細胞に分化・転換すると染色される。したがって、レシピエントの組織で染色される細胞は、移植した細胞の中で血管内皮細胞に分化・転換した細胞だけなのである。このマウスの角膜細胞を培養し、肉腫の移植で血管新生を誘導した野生型マウスの尾静脈から移植した。移植の数日後、肉腫内の血管に X-Gal 陽性の緑色の粒子を含む血管内皮が観察された (図2 矢印)。培

養角膜細胞は、尾静脈から注入、移植したものであり、血流に乗って腫瘍血管までたどり着いて、血管の内側から取り込まれたものと考えられた。管腔側から新生血管に入り込む点は、すでに報告されている末梢血中の血管内皮前駆細胞と同様であり、角膜に培養細胞を移植した実験 (図1) で見た血管の外側から線維芽細胞が新生血管に入る場合とは異なっている。このメカニズムについても電子顕微鏡による詳細な研究が望まれるところである。

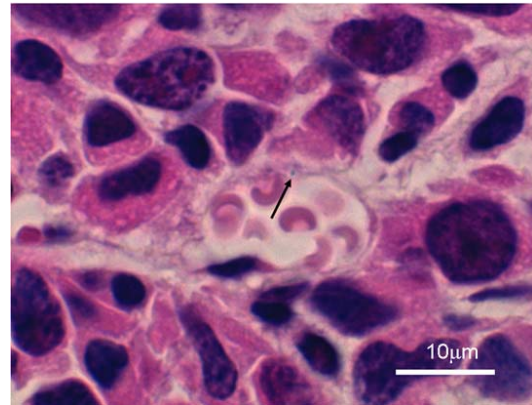


図2 角膜細胞の血管内皮への取り込み

#### (2-2) 腫瘍組織の新生血管による培養角膜細胞の取り込みの数値化

血管内皮前駆細胞が新生血管に取り込まれる程度は低いとする報告や腫瘍血管には取り込まれないとする報告もあり、内皮細胞以外の細胞が血管に取り込まれる割合については定説はない。そこで培養角膜細胞の血管内皮への取り込みがどの程度になるかについて検討を行った。まず lacZ 粒子を含む血管の割合を求めた。その結果、lacZ 粒子を含む血管の割合は、野生型マウスの培養角膜

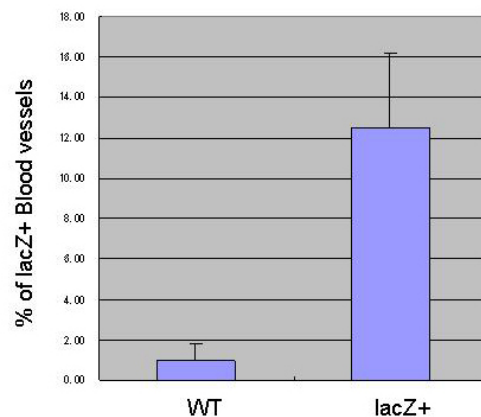


図3 lacZ 粒子を含有する血管の割合  
WT:野生型マウス lacZ+: Flk1-lacZ マウス  
% lacZ+ Blood vessels : X-Gal 陽性血管%



細胞を移植したときに比べ、Flk1-lacZ マウスの培養角膜細胞を移植した場合の方が有意に大きな値を示した ( $0.92 \pm 0.92\%$  vs  $12.45 \pm 3.71\%$ ,  $p < 0.05$  図3)。

次に lacZ 粒子を含む内皮細胞の割合を求めた。しかし内皮細胞の数を数えることは出来ないため、内皮細胞の核当たりの lacZ 粒子の数を求めた。その結果、内皮細胞の核当たりの lacZ 粒子の数は、野生型マウスの培養角膜細胞を移植したときに比べ、Flk1-lacZ マウスの培養角膜細胞を移植した場合が有意に大きかった ( $0.71 \pm 0.60$  個 vs  $7.53 \pm 1.87$  個,  $p < 0.05$  図4)。

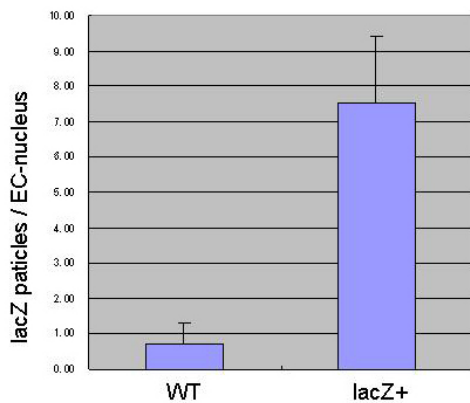


図4 血管内皮細胞の核当たりの lacZ 粒子の数 (LacZ particles / EC-nucleus)

WT: 野生型マウス lacZ+: Flk1-lacZ マウス

### (3) 血管新生組織による培養角膜細胞の血管内皮細胞への分化・転換作用

Flk1-lacZ マウスの培養角膜細胞の移植実験により、角膜細胞が血管内皮細胞に分化・転換することが明らかとなったが、このことから血管新生の起こっている組織では角膜細胞、すなわち線維芽細胞の内皮細胞への分化・転換をもたらす何らかの機序が作用しているのではないかと、具体的には血管が新生されている組織には線維芽細胞を血管内皮細胞に分化・転換させる物質が存在するのではないかとという新たな疑問が湧いてきた。これを解明するために、Flk1-lacZ マウスの角膜細胞を、硝酸銀焼灼により血管新生を惹起したラットの角膜組織の抽出液を添加した培養液で培養し、抽出液の作用を調べた。培養細胞を固定後、X-Gal 染色を施し、倒立顕微鏡により観察した。無処置の角膜抽出液を加えた場合は、細胞は紡錘形を呈し X-Gal の陽性反応は見られなかった。一方、硝酸銀焼灼を行って血管新生が始まっているラット角膜の抽出液を加えた場合は、X-Gal 陽性の緑色の反応が観察された (図5)。

この結果から、組織常在性線維芽細胞は、血管新生組織に存在する分化・転換誘導物質の作用を受けて内皮細胞へ分化・転換し、同

時に血管内皮へ取り込まれることが示唆された。この分化・転換誘導物質は、予備的な実験で、熱により失活するので、蛋白質であると推測された。

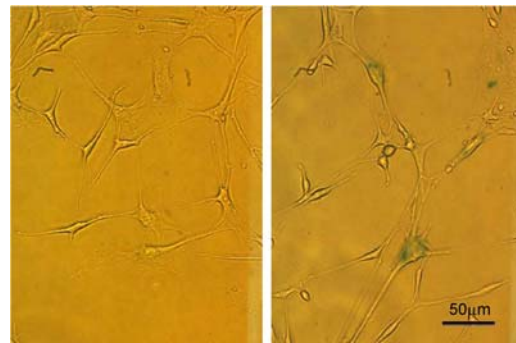


図5 血管新生組織抽出液による角膜細胞の血管内皮細胞への分化・転換誘導作用

左: 無処置の角膜抽出液

右: 硝酸銀焼灼した角膜の抽出液

### (4) 炎症組織の新生血管による培養角膜細胞の取り込み

Flk1-lacZ マウスの実験により、組織常在性の線維芽細胞が血管内皮細胞に分化・転換することが明らかになったが、X-Gal 染色は非特異的な反応を示すことがあり、実験結果の再現性や精度にやや欠ける嫌いがあるように思われた。また、Flk1-lacZ マウスを用いた実験では、腫瘍組織の血管への管腔内側からの線維芽細胞の取り込みについて検討したものであった。そこで次に、別の遺伝子組換えマウスを用いて、炎症組織の血管への管腔外側からの取り込みについて検討することとした。

Flk1 と同様に血管内皮細胞特異的蛋白質

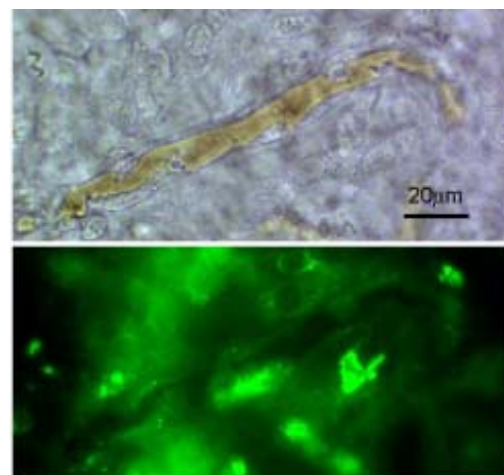


図6 Tie2-GFP マウスの角膜固有質の移植  
上: 血管先端の光学顕微鏡写真

下: 上と同じ部分の蛍光顕微鏡写真

の Tie2 を産生する遺伝子のプロモーターに

GFP 遺伝子を結合した Tg マウス (Tie2-GFP マウス) を用いた。このマウスの角膜固有質の組織片を摘出し、これを野生型マウスの角膜ポケットに移植し、角膜ポケットの傷口が治癒した後、硝酸銀焼灼により血管新生を惹起した。組織片を移植した部分に血管が伸長してきたとき、角膜を摘出し、固定した。角膜組織を全載標本とし蛍光顕微鏡により、観察、撮影した。

Tie2-GFP マウスの角膜固有質の組織片を移植した部分の血管を明視野の光学顕微鏡で観察すると赤血球を取り囲む内皮細胞とその核が観察された。同じ血管を蛍光顕微鏡で観察すると明視野像の内皮細胞に重なるように緑色蛍光が観察できた (図6)。このことは角膜固有質の角膜細胞、すなわち組織常在性の線維芽細胞が血管内皮細胞に分化・転換することを明確に示していると考えられた。

(5) 血管新生組織による培養角膜細胞の血管内皮細胞への分化・転換作用の確認

Tie2-GFP マウスの角膜固有質の移植により角膜の線維芽細胞が血管内皮細胞に分化・転換することからやはり血管新生組織には線維芽細胞を血管内皮細胞に分化・転換させる誘導物質が作用しているのではないかと推察された。Flk1-lacZ マウスで試みた誘導物質の検索を Tie2-GFP マウスにおいても試みた。

Tie2-GFP マウスの角膜細胞を、硝酸銀焼灼により血管新生を惹起したラットの角膜組織から得た抽出液を添加した培養液で培養し、抽出液の作用を調べた。培養細胞を固定後、倒立顕微鏡により観察した。PBS を培養

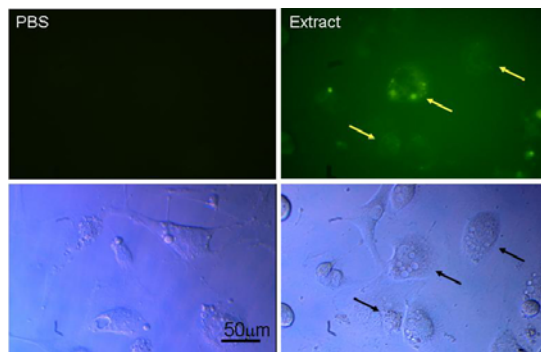


図7 血管新生組織抽出液の角膜細胞の血管内皮細胞への分化・転換誘導作用  
左：磷酸緩衝生理食塩水 (PBS)  
右：抽出液 (Extract)  
上：蛍光顕微鏡写真 下：位相差顕微鏡写真

液に加えた場合、細胞は位相差顕微鏡で観察すると細胞は紡錘形を呈し、蛍光顕微鏡で観察しても蛍光を発する細胞は認められなかった。一方、硝酸銀焼灼で血管新生を惹起し

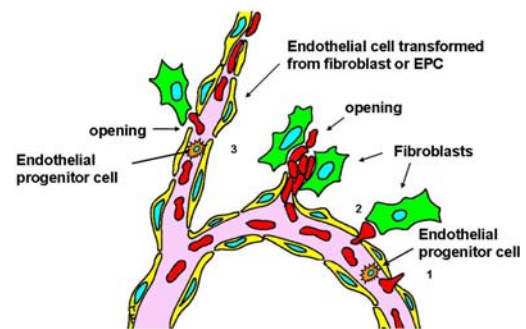
たラット角膜の抽出液を加えた場合は、細胞は位相差顕微鏡でやや敷石状を呈し、蛍光顕微鏡では緑色の蛍光を発する細胞が観察された。(図7)。

(6) 結果のまとめ

本研究の実験結果から以下のことが明らかになった。1) 皮下組織の線維芽細胞は新生血管に取り込まれ、内皮細胞に分化・転換する。2) 角膜常在性の線維芽細胞である角膜細胞は新生血管に取り込まれ内皮細胞に分化・転換する。3) 静脈に注入、移植した培養角膜細胞は腫瘍組織の血管に血管当たり12%、内皮細胞の核当たり8%の割合で取り込まれる。4) 線維芽細胞の血管内皮細胞への分化・転換は血管新生組織の抽出物により誘導される。5) 線維芽細胞は血管の内側あるいは外側から血管内皮に取り込まれる。

これらの実験結果とこれまでの報告を総合すると、新生血管の内皮細胞の由来については、1) 既存血管の内皮細胞、2) 血管内皮前駆細胞、3) 間葉系幹細胞、4) 脂肪組織由来幹細胞、5) 組織常在性線維芽細胞の5つの可能性が考えられる。この内1-4はこれまでに報告されてきものであり、5は本研究で明らかになったものである。

組織常在性線維芽細胞がどのように血管内皮細胞に分化・転換し、新生血管の形成に如何に関与するかについて、Rhodin & Fujita (Submicrosc. Cytol. Pathol. 21: 1-34, 1989) の血管新生の模式図に倣った模式図 (図8) で表すと、①血管の透過性が亢進し、内皮に孔が生じる、②この孔から赤血球等の血球成分が漏出する、③線維芽細胞が漏出した赤血球等の血球成分を取り囲むように配置し、内皮細胞に分化・転換する、となる (図8)。



A schematic model of angiogenesis

図8 血管新生の模式図

Endothelial progenitor cell (EPC):  
血管内皮前駆細胞  
Fibroblasts:線維芽細胞  
Opening:血管の孔

結論として、組織常在性線維芽細胞は血管

内皮細胞に分化・転換する能力を保有しているので、線維芽細胞が豊富な皮下組織等は血管再生医療に必要な内皮細胞の入手先として有望であると言える。

#### 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 4 件)

- ① Kimura H, Miyashita H, Suzuki Y, Kobayashi M, Watanabe K, Sonoda H, Ohta H, Fujiwara T, Shimosegawa T, Sato Y., Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis. Blood 113: 4810-4818, 2009. 査読有
- ② 藤原 隆, 昆 和典, 樫木勝巳, 大沼俊名. 組織常在性線維芽細胞は新生血管の内皮細胞に分化する. 顕微鏡 43:90-94, 2008. 査読有
- ③ Nakamura Y, Ichinohe M, Hirata M, Matsuura H, Fujiwara T, Igarashi T, Nakahara M, Yamaguchi H, Yasugi S, Takenawa T, Fukami K., Phospholipase C-delta1 is an essential molecule downstream of Foxn1, the gene responsible for the nude mutation, in normal hair development. FASEB J 22:841-849, 2008. 査読有
- ④ Mominoki T, Kinutani M, Wakisaka H, Saito S, Kobayashi N, Fujiwara T, Matsuda S. Leg dysfunction in a hatched chick model of spina Bifida aperta. Exper Neurol 197:133-142, 2006. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 昆 和典, 藤原 隆. 新生血管の伸長する方向はどのようにして決まるか. 第60回日本生理学会中国四国地方会, 愛媛大学総合情報メディアセンター, 松山市, 2008. 11. 15.
- ② 藤原 隆, 昆 和典, 樫木勝巳, 大沼俊名. 血管新生における線維芽細胞の血管内皮細胞への分化転換に関する形態学的研究. 第40回日本臨床分子形態学会総会ならびに学術集会, シンポジウム3「新生血管形成の基礎と臨床」, 福岡国際会議場, 福岡市, 2008. 10. 3-4.
- ③ Fujiwara T, Kon K, Mominoki K, Oonuma T., A new mechanism of angiogenesis: Incorporation of tissue-resident

fibroblasts into newly formed blood vessels and their concomitant transdifferentiation into vascular endothelial cells. 15<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting, Sydney, Australia, 2008. 6. 1-5.

- ④ 藤原 隆, 昆 和典, 樫木勝巳, 大沼俊名. 組織常在性線維芽細胞は新生血管の内皮細胞に分化する. 第113回日本解剖学会総会・学術集会, シンポジウム「線維芽細胞の多様性と分化転換」, 大分大学医学部, 由布市, 2008. 3. 27-29.
- ⑤ 藤原 隆, 昆 和典, 樫木勝巳. 血管新生における線維芽細胞の血管内皮細胞への分化. 第112回日本解剖学会総会・学術集会, 大阪国際会議場, 大阪, 2007. 3. 27-29.
- ⑥ 昆 和典, 藤原 隆. 血管新生にとって血液の漏出は必要か. 第14回日本血管生物医学会, 東京医科歯科大学学術総合センター, 東京, 2006. 12. 13-15.

[図書] (計 1 件)

- ① 藤原 隆, 樫木勝巳, 松田正司, 血管の構造. 血管内皮細胞をめぐる疾患, 島田和幸編, 真興交易医書出版部, 東京, pp13-28, 2007

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤原 隆(FUJIWARA TAKASHI)  
愛媛大学・総合科学研究支援センター・准教授  
研究者番号: 30036496

##### (3) 連携研究者

樫木 勝巳(MOMINOKI KATSUMI)  
岡山大学・自然生命科学研究支援センター・准教授  
研究者番号: 70304615  
昆 和典(KON KAZUNORI)  
愛媛県立医療技術大学・保健科学部・教授  
研究者番号: 40093926  
大沼 俊名(ONUMA TOSHINA)  
愛媛大学・総合科学研究支援センター・講師  
研究者番号: 60452695  
能勢 真人(NOSE MASATO)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 70030913