

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893138

研究課題名(和文)血管内皮幹細胞の同定および血管新生の新規分子機構の解明と眼疾患治療への応用

研究課題名(英文) Identification of vascular endothelial stem cells and their potential role in ocular angiogenesis

研究代表者

若林 卓 (Wakabayashi, Taku)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20733116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病網膜症や加齢黄斑変性症などの眼疾患は中途失明に関わる重篤な疾患であり、その発症および進行には虚血や病的血管新生が密接に関連することが知られている。本研究では、既存血管に存在し血管新生に中心的な役割を果たす特殊な血管内皮細胞を同定することにより血管新生を制御する新規治療法の開発を目指した。具体的には、フローサイトメトリーおよび蛍光標識モノクローナル抗体を用いてマウス血管内皮細胞の約1～3%を占める潜在的増殖活性を有する特殊な血管内皮細胞を同定した。またこのような細胞が特異的な遺伝子を発現し、生体内において血管新生に貢献することをトランスジェニックマウスを用いて解析した。

研究成果の概要(英文)：Ocular neovascular diseases, including diabetic retinopathy and the neovascular form of age-related macular degeneration (AMD) are the most common cause of severe vision loss worldwide. In this study, we isolated a small population of vascular endothelial stem-like cells in the pre-existing blood vessels which may be a source of new vascular endothelial cells during angiogenesis and may be a target for novel therapeutic strategy for ocular neovascular diseases. We also identified that those specific vascular endothelial cells express specific genes and contribute to neovessel formation in vivo by analyzing transgenic mouse model.

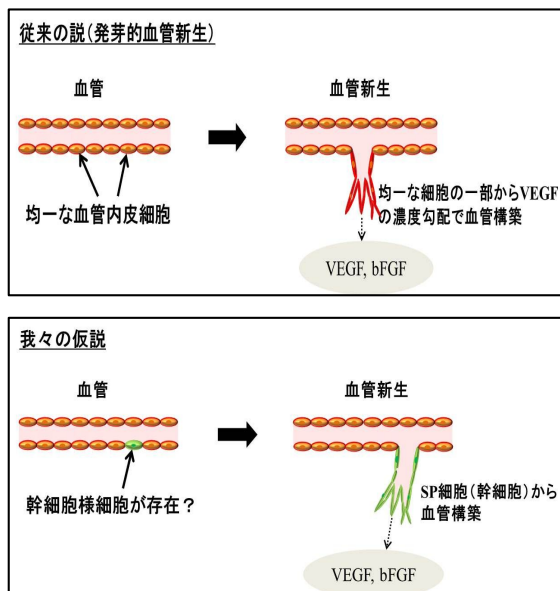
研究分野：血管新生

キーワード：血管新生 血管内皮細胞 血管内皮幹細胞 脈絡膜 網膜 Side population

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症や加齢黄斑変性症、病的近視などの眼疾患は中途失明原因の上位を占める重篤な疾患である。これらの疾患は、網膜血管および脈絡膜血管における虚血性変化および病的血管新生が中心的病態であり、血管内皮増殖因子 (VEGF) の関与が重要視されている。現在、眼科領域では VEGF を標的とした抗 VEGF 療法が臨床応用されるようになり、その有効性が報告されている。しかし、抗 VEGF 療法の無効例や再発例も少なくなく、眼内病的血管新生の進行を抑制できず失明に至る症例も未だ多く存在するため、現行治療抵抗性の病的新生血管および虚血に対する新規治療法の開発が期待されている。

このように血管は多くの眼疾患の発生や進行に関与することから、血管がどのように形成されるのかを解明することが重要である。そこで、我々は血管新生の際に中心的な役割を果たす潜在的増殖活性の高い血管内皮細胞が存在する可能性があるとする仮説のもと、このような細胞の同定を試みている(下図)。



具体的には FACS (fluorescence activated cell sorting) および蛍光標識モノクローナル抗体を用いた精度の高い血管内皮細胞単離法を確立し、さらに DNA 結合性色素 Hoechst33342 染色を用いた Side population

(SP) 法を行った。その結果、血管内皮細胞は、Hoechst33342 染色陰性の細胞集団 (SP 細胞) とそれ以外の大部分を占め Hoechst33342 に染色される主集団 (MP 細胞) に分けられることがわかった。血管内皮 SP 細胞は、各臓器の既存血管中の血管内皮細胞の約 1~3% で存在し、Vitro において血管内皮コロニー形成能が有意に高いことがわかった (EMBO J 2012, IOVS 2013)。幹細胞マーカーとして知られる CD133 の発現は SP 細胞で優位に高かった。さらに Vivo において血管内皮 SP 細胞は低酸素刺激でその割合および増殖活性が増加し機能的血管を構築することがわかり、血管新生に中心的な役割を果たす可能性が推察された。

2. 研究の目的

本研究では、既存血管に存在し血管新生に中心的な役割を果たす血管内皮細胞を同定し、その生物学的特性や血管新生との関連を新たに解明することにより血管新生を制御する新規治療法の開発を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

DNA マイクロアレイを用いて、マウスの生体より回収した血管内皮 SP 細胞および血管内皮 MP 細胞の遺伝子発現群のプロファイルを網羅的に解析する。まず、細胞表面抗原を探索する。マイクロアレイデータをもとに血管内皮 SP 細胞と血管内皮 MP 細胞の発現比率を網羅的に検証し、SP 細胞で発現比率が高くかつ十分なシグナル強度を認める遺伝子を候補遺伝子とする。候補遺伝子のなかから細胞表面に発現するものを選ぶ。リアルタイム PCR により血管内皮 SP 細胞における発現を確認し、特異的な表面抗原の絞り込み作業を行う。血管内皮 SP 細胞に特異的な遺伝子 X を同定できた場合、モノクローナル抗体を作製し FACS において CD31 陽性 CD45 陰性の血管内皮細胞分画に特異的分

子陽性の分画が存在するかを確認するとともに、血管内皮 SP 細胞の局在を免疫組織学的に証明する。

次に、血管内皮 SP 細胞が生体内で実際に血管新生に貢献するかにつき検証するために DNA マイクロアレイを用いて同定した SP 細胞に最も特異性が高く潜在的増殖能力に相関する遺伝子 X に変異型 Estrogen 受容体融合蛋白 (CreERT2) を発現した BAC(大腸菌人工染色体)トランスジェニックマウスを作製し解析する。

4. 研究成果

DNA マイクロアレイにより SP 細胞に特異的に発現する遺伝子 X を同定した。抗体を複数作成し免疫染色を行ったところ、マウス網膜血管・脈絡膜血管いずれにおいても SP 細胞は既存血管に存在することがわかった。また特異的マーカー X 陽性の血管内皮細胞を FACS で回収したところ、特異的マーカー X 陽性の網膜血管内皮細胞および脈絡膜血管内皮細胞は vitro 上で高い血管内皮コロニー形成能を有することが判明した。

遺伝子 X に変異型 Estrogen 受容体融合蛋白 (CreERT2) を発現した BAC(大腸菌人工染色体)トランスジェニックマウスを作製した。マウスの受精卵に直接トランスジーンを導入して作成し、トランスジーンを発現したマウスが 4 ライン得られたため、このマウスと 2 つの loxP 配列を有し EGFP を Cre 切断依存的に発現するレポーターマウスとを交配した上で、タモキシフェン誘導性に Cre recombinase 活性を導き、生体内で血管内皮 SP 細胞特異的分子 X を EGFP で標識し解析した。

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 2 件)

1. Tahara H, Naito H, Kise K, Wakabayashi T, Kamoi K, Okihara K, Yanagisawa A, Nakai Y, Nonomura N, Morii E, Miki T, Takakura N. Evaluation of PSF1 as a prognostic biomarker for prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2015;18:56-62. doi: 10.1038/pcan.2014.46.
2. Naito H, Wakabayashi T, Kidoya H, Muramatsu F, Takara K, Eino D, Yamane K, Iba T, Takakura N. Endothelial side population cells contribute to tumor angiogenesis and anti-angiogenic drug resistance. Cancer research 2016 in press.

[学会発表](計 4 件)

1. Wakabayashi T. Newly identified vascular endothelial stem-like cells and ocular angiogenesis. 30th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress. China, Apr 1-4, 2015
2. 若林卓、内藤尚道、高倉伸幸、西田幸二. 網膜血管の再生医療. 第 15 回日本再生医療学会総会. 大阪, 3/17-19, 2016
3. Wakabayashi T. Vascular regeneration. 31th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress. Taipei, Mar 24-27, 2015
4. 若林卓、内藤尚道、高倉伸幸. 「人工多能性幹細胞(iPS 細胞)作製・制御等の医療基盤技術」研究領域. 既存血管に存在する新規血管内皮幹細胞の同定と血管新生における役割. 兵庫, 10/27-29, 2014

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

若林 卓 (WAKABAYASHI TAKU)
大阪大学医学部附属病院眼科・医員
研究者番号：20733116