

# 幹細胞ニッチの形成機構解明と血管再生療法への応用

平成 26 年 5 月 22 日受付

板 野 直 樹

京都産業大学総合生命科学部生命システム学科

石 井 泰 雄

京都産業大学総合生命科学部生命システム学科

今 野 兼次郎

京都産業大学総合生命科学部動物生命医科学科

## 要 旨

難治性末梢血管疾患の治療法として、自己の骨髓幹細胞を患部に移植して血管再生を促す治療が注目されている。幹細胞移植を効果的な血管再生療法として展開していくためには、発生過程における血管形成機構を分子・細胞レベルで詳細に解析し、機能する血管を再生するための技術的基盤を確立することが求められる。本研究で我々は、血管内皮細胞特異的にヒアルロン酸合成酵素遺伝子を欠損するノックアウトマウスモデルを作製し、血管内皮細胞特異的なヒアルロン酸合成の欠損が血管発生に及ぼす影響について解析した。また、閉塞した冠動脈の機能を補う治療法の一つとして、血管を新たに形成するというアプローチが考えられる。心臓の表面を覆う心外膜は、主に未分化な増殖細胞から成り、冠動脈の全ての構成細胞すなわち内皮、平滑筋、線維芽細胞の前駆細胞を含んでいる。このことから、心臓幹細胞の重要な起源の一つと考えられている。そこで今回は、ニワトリ胚およびアフリカツメガエル胚心臓を用いて、心外膜由来前駆細胞のマーカーとして知られる転写因子遺伝子 Tbx18 および Wilms' Tumor 1 (Wt1) の発現を解析した。その結果、冠動脈の走行が、心外膜由来幹細胞/前駆細胞の維持および集積を介して制御されている可能性が示唆された。

キーワード：幹細胞、ニッチ、ヒアルロン酸、末梢血管疾患、冠動脈閉塞

## 1. はじめに

生活習慣病の増加に伴って、虚血性心疾患や難治性の末梢血管疾患が急増している。末梢血管疾患は、血管閉塞により虚血が進行する結果、手足など末梢組織の潰瘍や壊死をきたす難治性の疾患である。これらの症状改善には、血管を新たに再生して虚血状態を解消する必要がある。

る。近年、有効な治療法として自己の骨髄幹細胞を患部付近に移植して血管再生を促す治療が世界中で広く試行されている。しかし、幹細胞成分の患部への生着率や血管再生効率の低さが克服すべき重要な課題となっている。幹細胞移植を効果的な血管再生療法として展開していくためには、血管発生の過程をよく理解し、上述の諸問題を解決することが急務である。我々はこれまでに、血管形成に働く因子の解析から、細胞外マトリックス糖鎖成分のヒアルロン酸とそれに結合性を示すコンドロイチン硫酸プロテオグリカンが、複合体形成によって血管の形成促進と骨髄幹細胞の生存に働くことを見出している[1-4]。この研究成果は、マトリックス型複合糖質からなる生体分子が、幹細胞集積と生着のためのニッチとして機能し、血管の形成促進に働く可能性を示唆している。

また、生涯にわたって絶えず拍動を続ける心臓は、酸素の消費量の最も多い臓器の一つである。成熟した心臓は厚い筋肉組織をもつため、心臓の内腔からの拡散のみでは、心壁全体にわたって酸素や栄養分を供給することは難しい。このため心壁の内部を走る冠動脈が、心筋のすみずみまで酸素と栄養分を供給する。冠動脈が何らかの要因で狭窄を起こすと、心筋の一部が虚血状態となり、狭心症や心筋梗塞といった心疾患がおこる。心疾患に対する治療法の一つとして、閉塞した冠動脈の機能を補う血管を新たに形成するというアプローチが考えられる。近年、G-アクチン結合タンパク質であるサイモシン  $\beta 4$  が、心臓の再生を促進するタンパク質として同定され、注目されている[5]。傷害を与えた心臓にサイモシン  $\beta 4$  を加えると、心筋の細胞死が抑制されるとともに、心臓を覆う心外膜の細胞運動および血管や心筋への分化が促進される。発生イベントの一部を再開させることのできるこのような分子の発見は、再生医療にとってきわめて重要な進歩と言えるが、現在のところは、著しい傷害を受けていない成体の心臓の特定の部位に、効率的に血管を発生させる技術は確立されていない。

このような問題を解決するためには、冠動脈の発生の過程をよく理解することが重要であるが、現時点では、冠動脈のもとになる細胞がどこに生まれ、どのように移動し、なぜ心臓の特定の場所にのみ血管を作るのかといった点について十分に明らかにされているとはいいがたい。冠動脈は心外膜原基と呼ばれる、発生の一時期に心臓の外にできる特殊な細胞集団から生じる(図1)。心外膜原基は、心臓に向かって成長し、その表面に接着・融合したのち、心臓表面を覆う心外膜を形成する。その一部の細胞が、上皮-間充織転換を経て心壁内部へともぐり込み、冠動脈を構成する内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞に分化する。しかしこれらの細胞の各々の起源および移動経路の詳細については不明な点が多い。とりわけ冠動脈内皮細胞の起源に関しては、平滑筋や線維芽細胞と同様、心外膜から生じるという説と、肝臓や静脈洞に近い心外膜原基基部から生じるとする説がある。また冠動脈の走行を決定するメカニズムに関しては、他の組織との相互作用と心外膜原基自身に内在するプログラムの両方が重要と考えられるものの、それを明確に示した研究は現在のところ報告されていない。

鳥類胚は、ヒトと同じ羊膜類に属すること、母体外で発生し胚が比較的大きいため観察や実

験的操作をしやすいこと、比較的安価で世界中で入手可能であることから、発生生物学における重要なモデル生物として古くから研究がなされてきた。心臓の発生に関しても多くの知見の蓄積がある。鳥類胚の心臓の表面を覆う心外膜は、主に未分化な増殖細胞から成り、冠動脈の全ての構成細胞すなわち内皮、平滑筋、線維芽細胞の前駆細胞を含んでいる。このことから心外膜は心臓幹細胞の重要な起源の一つと考えられている[6]。冠動脈が生じる際には、心外膜の細胞の一部が、上皮-間充織転換を経て心壁内部に向かって潜り込み、血管形成の場となる心外膜下結合組織を形成する。この結合組織が幹細胞の集積と分化のための環境、すなわち幹細胞ニッチを提供している可能性がある。我々は、心臓由来の BMP2 が心外膜原基を心臓へと誘引することを明らかにしている[7]。BMP2 を高発現する心臓の房室接合部は、心外膜原基が心臓に最初に接着する領域であり、また冠動脈発生のある場でもある。このことから、BMP2 が、心外膜原基の誘引だけでなく、多段階に渡って冠動脈形成の促進に働いていることが強く示唆された。心血管系の発生イベントの一部を再開させるこのような分子の発見は、冠動脈の再生医療にとってきわめて重要な進歩と言える。

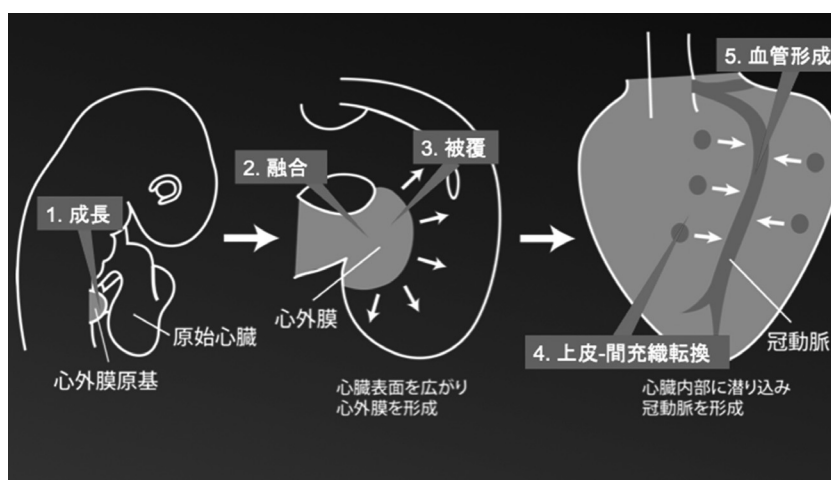


図1 心外膜原基の前駆細胞集団による冠動脈の形成過程

## 2. 血管内皮細胞特異的なヒアルロン酸合成酵素 2 遺伝子欠損マウスの解析

血管形成に働く因子の解析から、我々は細胞外マトリックス糖鎖成分のヒアルロン酸とそれに結合性を示すコンドロイチン硫酸プロテオグリカンが、複合体形成によって血管の形成促進に働くことを見出している。そこで、血管内皮細胞におけるヒアルロン酸合成の欠損が、血管形成に及ぼす影響について、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子の欠損マウスを用いて解析した。ヒアルロン酸合成酵素 2 (Has2) 遺伝子欠損マウスは胎生致死である為、今回の実験ではまず、Has2 遺伝子をコンディショナルに欠損する (cKO) マウスを作製した。Has2 cKO マウスの

作製に用いたターゲティングベクターは、5' と 3' 側にマウス *Has2* 遺伝子の相同配列を有し、第二エクソンの両側に loxP 配列を、また二つの Frt 配列で挟まれたネオマイシン耐性遺伝子を配して構築されている (図 2)。このターゲティングベクターをマウス胚性幹 (ES) 細胞に遺伝子導入し、相同組換え体を PCR スクリーニングにより得た。この相同組換え ES 細胞の胚移植によりヘテロ変異マウスを得たのち、このマウス同士を交配して *Has2* cKO<sup>Flox/Flox</sup> マウスを得た。*Has2* cKO<sup>Flox/Flox</sup> マウスと全身の細胞で Cre 組換え酵素を発現する CAG-Cre マウスとを交配して、ヘテロ変異 *Has2*<sup>Flox/-</sup> マウスを得た。*Has2* cKO<sup>Flox/Flox</sup> マウスあるいは *Has2*<sup>Flox/-</sup> マウスと血管内皮細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現する Tek-Cre マウスとを交配して、血管内皮細胞特異的にヒアルロン酸合成酵素 2 遺伝子を欠損するマウスを作製した。そして、ヒアルロン酸合成の欠損が血管形成やマウスの生存に及ぼす影響について検討した。その結果、いずれのマウスもメンデル則に従って成体にまで発生した。

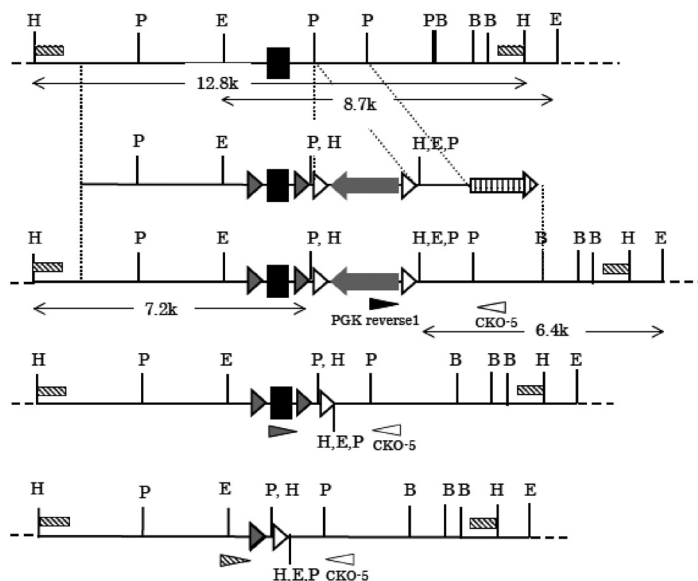


図 2 *Has2* cKO のターゲティングベクターと相同組換えの模式図

■ : *Has2* 第二エクソン ▷ : frt 配列 ▴ : loxP 配列 ➡ : Neo 耐性遺伝子

### 3. 心外膜由来前駆細胞と冠動脈形成

心外膜由来前駆細胞のマーカーとして知られる転写因子遺伝子 *Tbx18* および *Wilms' Tumor 1* (*Wt1*) の胚期心臓における発現を、in situ ハイブリダイゼーション法を用いて解析した。心外膜によって覆われて間もないニワトリ 6 日胚心臓では、*Tbx18* と *Wt1* の強い発現が、心外膜および心外膜から生じた心外膜下結合組織で、心臓全体にわたって広く認められた (図 3 A-D)。冠動脈の形成が進むにつれて、発現は主な冠動脈枝が分布する房室溝および室間溝へ

と局在し（図 3E, F）、孵化直前には心臓のほとんどの領域で検出されなくなった。冠動脈を形成しないアフリカツメガエル（図 3G）では、*Tbx18* と *Wt1* の発現が、形成後の心外膜で急速に消失することが明らかになった（図 3H）。

#### 4. ニワトリ胚心臓への遺伝子導入法の確立

鳥類胚では、心外膜を比較的容易に単離・培養することができるため、その移動および分化に影響を与える数多くの因子が同定されてきた。そのような因子として BMP2、VEGF-A、PDGF-BB、FGF2、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 といった成長因子が知られている[6]。胚体内での冠動脈形成に対する上記因子の作用を明らかにするためには、心外膜に効率よく遺伝子を導入する新たな技術が必要である。われわれは心筋に最適化された従来のリポフェクション法を改良し、心外膜への遺伝子導入を可能とする新たな条件を見いだした（図 4A）。加えて、Tol2 トランスポゾンベクター（Sato et al., 2007）を採用することにより、心臓形成初期に導入した遺伝子の発現を、冠動脈形成期まで長期間にわたって維持させることが可能となった（図 4B, C）。

#### 5. まとめ

今回は、血管内皮細胞特異的にヒアルロン酸合成酵素 2 遺伝子を欠損するマウスを作製し、内皮細胞で産生されるヒアルロン酸が、胚発生過程における血管形成に関与する可能性について解析した。その結果、胚発生の血管形成に内皮細胞由来のヒアルロン酸は必須でない可能性が示された。しかし、血管再生過程には、血管内皮細胞が間葉系細胞の性質を獲得する内皮間葉転換という現象が関与しているとの報告もある。このことから、今後は、血管障害モデルを作製して血管再生過程を評価する必要がある。また、今回の結果から、冠動脈の走行が、心外膜由来幹細胞/前駆細胞の維持および集積を介して制御されている可能性が示された。そこで今後は、心外膜由来幹細胞/前駆細胞の移動と分化に関与すると考えられる BMP2、VEGF-A、PDGF-BB、FGF2、TGF- $\beta$ 1、そして TGF- $\beta$ 2 の遺伝子を組み込んだベクターを作製し、今回確定したリポフェクション法の条件により鶏胚心外膜へ遺伝子導入して冠動脈形成について解析を進める。これらの解析を通じて、心臓に新たな冠動脈をつくるための必要条件が明らかとなり、心疾患に対する新たな治療法の開発につながることを期待できる。

#### 参考文献

- [1] Koyama, H., Hibi, T., Isogai, Z., Yoneda, M., Fujimori, M., Amano, J., Kawakubo, M., Kannagi, R., Kimata, K., Taniguchi, S., and Itano, N. Hyperproduction of Hyaluronan in Neu-Induced Mammary Tumor

- Accelerates Angiogenesis through Stromal Cell Recruitment: Possible Involvement of Versican /PG-M. *Am. J. Pathol.* 170: 1086-1099, 2007.
- [2] Koyama, H., Kobayashi, N., Harada, M., Takeoka, M., Kawai, Y., Sano, K., Fujimori, M., Amano, J., Ohhashi, T., Kannagi, R., Kimata, K., Taniguchi, S., and Itano, N. Significance of Tumor-Associated Stroma in Promotion of Intratumoral Lymphangiogenesis: Pivotal Role of a Hyaluronan-Rich Tumor Microenvironment. *Am. J. Pathol.* 172: 179-193, 2008.
- [3] Kobayashi, N., Miyoshi, S., Mikami, T., Koyama, H., Kitazawa, M., Takeoka, M., Sano, K., Amano, J., Isogai, Z., Niida, S., Oguri, K., Okayama, M., McDonald, J.A., Kimata, K., Taniguchi, S., and \*Itano, N. Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization. *Cancer Res.* 70(18): 7073-7083, 2010.
- [4] Goncharova, V., Serobyan, N., Iizuka, S., Schraufstatter, I., de Ridder, A., Povaliy, T., Wacker, V., Itano, N., Kimata, K., Orlovskaja, I.A., Yamaguchi, Y., and \*Khaldoynidi, S. Hyaluronan expressed by the hematopoietic microenvironment is required for bone marrow hematopoiesis. *J. Biol. Chem.* 287(30): 25419-25433, 2012.
- [5] Wessels, A. and Pelez-Pomares, J.M. The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. *Anat Rec* 276A, 43-57, 2004.
- [6] Ishii, Y., Garriock, R.J., Navette, A.M., Coughlin, L.E and Mikawa, T. BMP signals promote proepicardial protrusion necessary for recruitment of coronary vessel and epicardial progenitors to the heart. *Dev Cell* 19: 307-316, 2010.
- [7] Sato, Y., Kasai, T., Nakagawa, S., Tanabe, K., Watanabe, T., Kawakami, K and Takahashi, Y. Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chick embryos. *Dev Biol* 305, 616-624, 2007.

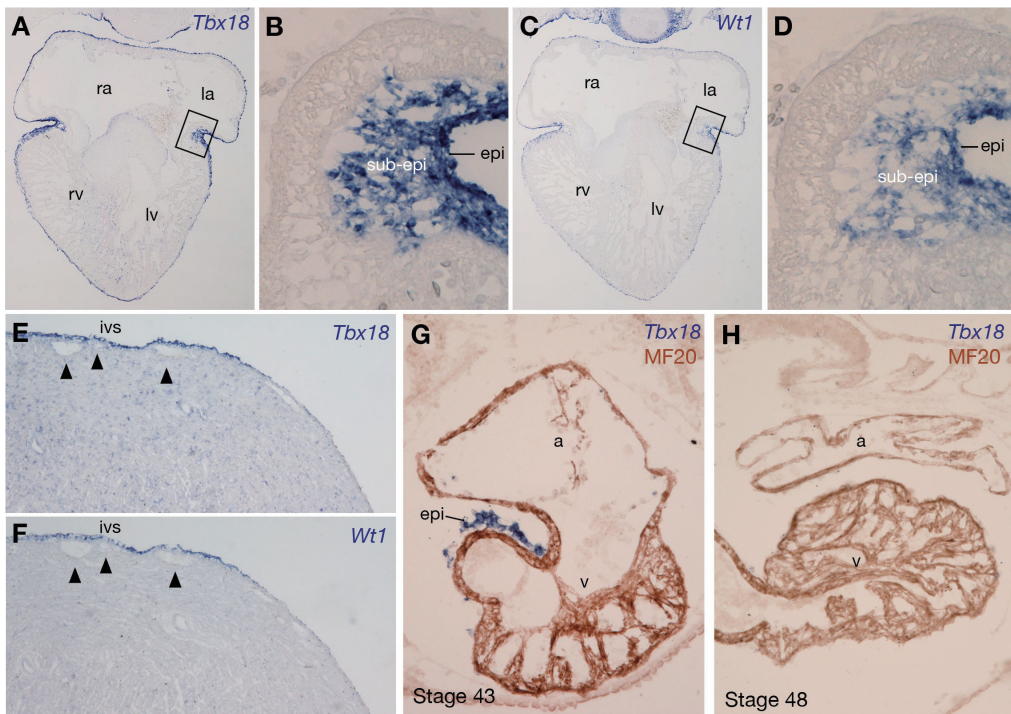


図3 (A-D) ニワトリ 6 日胚心臓における *Tbx18* (A, B)、*Wt1* (C, D) の発現  
B, D はそれぞれ A, C の四角で囲った部分を拡大したもの。心外膜 (epi) および心外膜下結合組織で (sub-epi) で強い発現が認められる。(E, F) ニワトリ 13 日胚心臓における *Tbx18* (E)、*Wt1* (F) の発現。発現は、太い血管 (矢じり) が分布する室間溝 (ivs) 付近に局在している。(G, H) アフリカツメガエル胚期心外膜における *Tbx18* の発現。形成途中の心外膜 (G、ステージ 43) で発現が認められるものの、発現はその後まもなく消失する (H、ステージ 48)。ra、右心房；la、左心房；rv、右心室；lv、左心室

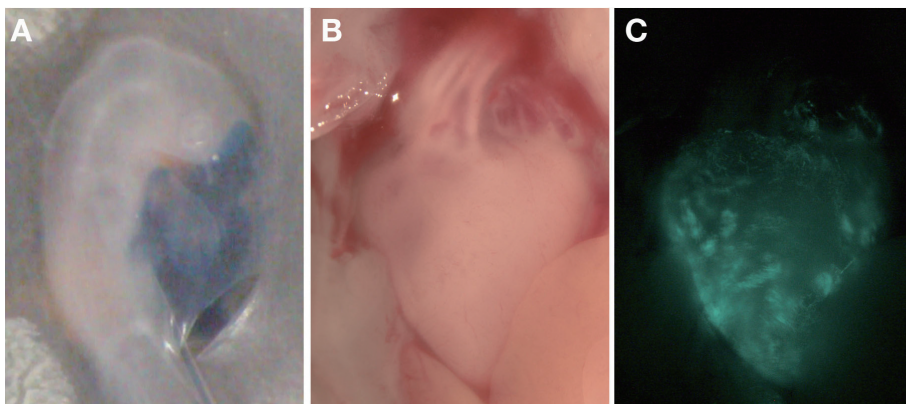


図4 In ovo リポフェクションによる心臓への遺伝子導入  
(A) ニワトリ 2 日胚心腔への DNA-リポフェクタミン 2000 混合液 (青) の注入。(B, C) 8 日胚における導入遺伝子 (EGFP) の発現。明視野 (B) および EGFP シグナル (C)。

## Stem cell niche formation and its application to vascular reconstitution

Naoki ITANO  
Yasuo ISHII  
Kenjiro KONNO

### Abstract

Autologous transplantation of bone marrow-derived stem cells is now a promising new type of therapy for peripheral vascular diseases. In order to properly develop this therapy as an effective treatment for peripheral vascular diseases, investigation of molecular and cellular mechanisms underlying vascular development and establishing a technical basis for the regeneration of functional vasculatures are longed for. In this study, we generated an endothelial cell-specific hyaluronan synthase knockout mice and analyzed how the endothelial cell-specific deficiency in HA biosynthesis affects the vascular formation using the hyaluronan synthase knockout mice. *De novo* formation of coronary vasculatures is one of approaches to cure coronary artery occlusion. The epicardium, the outermost layer of the heart, has been proposed to be an important origin of cardiac stem cells, which give rise to multiple cardiac cell types including endothelial, smooth muscle and fibroblast cells of coronary vessels. Here, we examined an expression of Tbx18 and Wilms' tumor-1 (WT1), markers for epicardium-derived progenitor cells, in developing chick and *Xenopus* hearts by in situ hybridization. Our data supports a model where the pattern of coronary vasculature is controlled by the maintenance and accumulation of epicardium-derived stem/progenitor cells.

**Keywords:** stem cell, niche, hyaluronan, peripheral vascular disease, coronary artery occlusion