

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 27 年 5 月 14 日受付

石井 泰雄

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

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。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。そこで今回我々は、ニワトリ胚を用いて、心外膜原基の細胞移動や分化に影響を与えることが知られている BMP2、VEGF-A、PDGF-BB、FGF2、TGF- β 1、TGF- β 2 といった成長因子について、胚体内での作用を明らかにするため、遺伝子導入による強制発現を行った。その結果、VEGF-A が発生過程の心臓に異所的な血管形成を引き起こすユニークな活性をもつことが明らかになった。

キーワード：幹細胞、VEGF-A、心外膜、冠動脈、心臓

1. はじめに

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起こる。

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。これを実現するためには、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も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言いがたい。冠動脈の重要な起源の一つが、心外膜原基と呼ばれる心臓の外に生じる特殊な細胞集団である。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（図1）。多くの段階からなるこの一連の過程の中で、どのステップがどのような機構によって制御された結果、冠状血管特有の走行を生じるかは、現在のところ不明である。

鳥類胚では、心外膜原基が大きく単離・培養が容易であることから、その細胞の移動や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- β 1、TGF- β 2 といった成長因子が知られている [1]。今回我々は、これらの因子の胚体内での作用を明らかにするため、遺伝子導入による強制発現を行った。

2. VEGF-A による心異所性血管の形成

上記成長因子の遺伝子を Tol2 トランスポゾンベクター [2] に挿入し、平成 26 年度に我々が確立した新たなリポフェクション法のプロトコルを用いて、ニワトリ胚およびウズラ胚の心外膜に導入した。その結果、VEGF-A を強制発現させた心臓できわめて明瞭な影響が見られた。心臓の表面にはいくつもの隆起が生じ、その分布は高レベルに遺伝子が導入された領域とほぼ一致した。血管に注入した墨汁がこれらの隆起内部に蓄積されることから、これらの隆起内に血管とつながった腔所があることが推測された。それを裏付ける結果が、組織切片の観察から得られた。隆起部位では、心外膜下部の結合組織が著しく肥厚し、その内部には腔所が認められた。この腔所は、カルデスモン陽性の平滑筋および QH1 陽性の内皮からなる血管壁様の組織によって取り囲まれていた。VEGF-A 発現細胞の多くは心外膜を離れ、その下部の結合組織や血管様組織に分布していた。これは VEGF-A が心外膜細胞の上皮-間充織転換を促進する作用をもつことを示唆している。なお、細胞増殖や細胞死に対する明瞭な影響は認められなかった。このような VEGF-A の作用は、冠循環系のあまり発達しない心房でも観察され、心臓の広い範囲が VEGF-A に対する反応性をもつことが明らかになった。なお、BMP2、PDGF-B、FGF2、TGF- β 1、TGF- β 2 を導入した胚では、目立った異常は認められなかった。

3. まとめ

本研究により、VEGF-A が発生過程の心臓に異所的な血管形成を引き起こすユニークな活性をもつことが明らかになった。しかし現時点では、(a) VEGF-A が心外膜に直接作用する

のか、それとも心筋を介して間接的に作用するのか、(b) VEGF-A は心外膜由来幹細胞／前駆細胞の分布に影響を与えるか、(c) VEGF-A 以外の VEGF ファミリーメンバーも同様の活性をもつか、(d) VEGF-A の作用は、実際の生体内での VEGF の機能をどの程度反映しているか、(e) VEGF は成体の心外膜にも作用しうるか、といった疑問が残る。これらの点を今後明らかにすることにより、冠動脈形成の理解が深まり、心疾患に対する新たな血管形成療法への道が拓かれるであろう。

参考文献

- [1] 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).
- [2] 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).

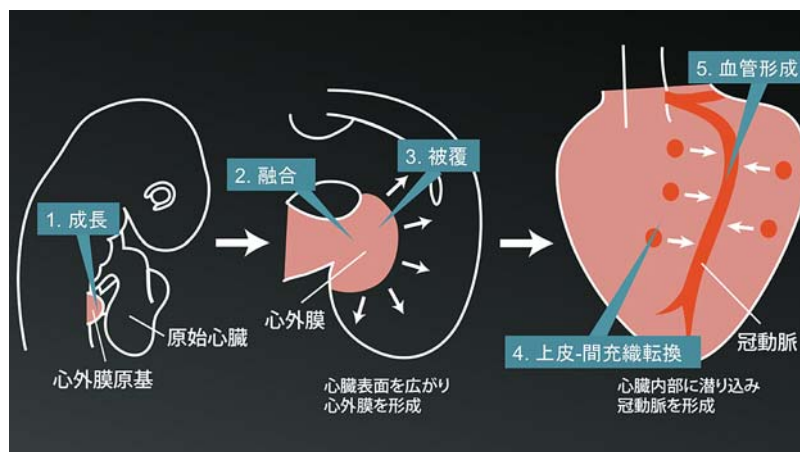


図1 心外膜原基の前駆細胞集団による冠動脈の形成過程

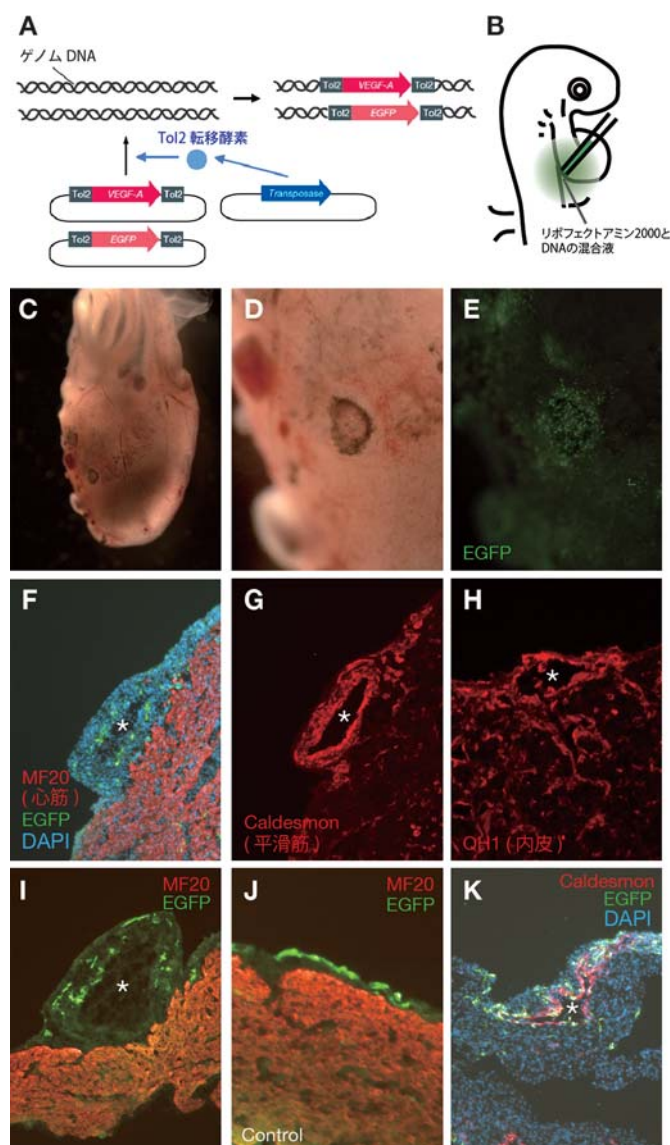


図2 Tol2 転移システムと In ovo リポフェクションによる心外膜への遺伝子導入

(A) Tol2 転移システム. 共発現させたトランスポゾンの働きにより、目的の遺伝子がエンハンサー・プロモーターとともにゲノムに挿入される。そのため遺伝子発現は長い期間にわたって維持される。(B) In ovo リポフェクションによる心外膜への遺伝子導入. ニワトリあるいはウズラ 2.5 日胚心外膜原基の表面に DNA・リポフェクトアミン 2000 混合液 (緑) を注入すると、DNA が取り込まれる。(C-E) VEGF-A を強制発現させた心臓。固定前に血管に墨汁を注入した。D は A を拡大したもの。E は、共発現させた EGFP を検出することにより、VEGF 発現細胞を可視化したもの。(F) 隆起の組織切片。隆起は、MF20 陰性の非筋組織の肥厚によるものであり、その多くは内部に腔所 (*) をもつ。その腔所は、平滑筋 (G) と血管内皮 (H) によって取り囲まれている。(I) VEGF 発現細胞のほとんどが、心外膜を離れ、心壁内部に分布する。(J) EGFP のみを強制発現させたコントロール胚では、発現細胞の多くが心外膜にとどまる。(K) VEGF-A は、心房でも非筋組織を増大させ異所的な血管様構造を形成させる。

Stem cell niche formation and its application to vascular reconstitution

Yasuo ISHII
Naoki ITANO

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, cellular mechanisms underlying vascular development and establishing a technical basis for the regeneration of functional vasculatures are longed for. The epicardium, the outermost layer of the heart, has been proposed to be an important origin of cardiac stem cells, which can differentiate into coronary vessels. It remains unclear, however, how they differentiate and coalesce into blood vessels in regionally restricted manners within the embryonic heart. Here, we show that *in vivo* expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A in the epicardium of the avian embryonic heart promotes migration of epicardial cells and ectopic formation of blood vessel-like cysts surrounded by the endothelial and smooth muscle layers. Bmp2, PDGF-BB, FGF2, TGF- β 1 and TGF- β 2 showed no obvious effect. Thus, VEGF-A has a distinct activity to modulate coronary vascular patterns by promoting migration and differentiation of epicardial cells.

Keywords: Stem cell, VEGF, epicardium, coronary artery, heart

