

# 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 28 年 5 月 18 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

心臓表面を覆う心外膜は、冠動脈の形成にとって不可欠である。しかしその冠動脈形成に果たす役割の詳細はよくわかっていない。心外膜の細胞の一部は心壁内部に向かってもぐり込み、心外膜と心筋層の間に間充織を形成する。主な冠動脈はこの間充織の中から生じる。この間充織の分布と冠動脈の発生の関係を明らかにするため、血管内皮細胞増殖因子 (*Vegf*) -*a* 遺伝子を心外膜に導入し、強制発現させた。導入された心外膜細胞は心外膜下に移動し、間充織層を著しく肥厚させた。この肥厚した間充織の内部には、動脈マーカーを発現する異所性血管が生じた。心筋で強制発現させた *Vegf-a* にはこのような作用は見られなかった。心外膜を起源とする細胞は、VEGF-A の影響下で、血管を形成する幹細胞の集積や分化を促進する周囲環境 (ニッチ) を提供するのかもしれない。

キーワード：幹細胞、VEGF-A、心外膜、冠動脈、心臓

## 1. はじめに

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新たな血管をつくる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し、その特有の走行がどのようにして生じるかを理解する必要がある。

心臓の表面は、一層の細胞層からなる薄い上皮組織によって覆われている。この上皮組織は心外膜とよばれ、冠動脈の発生にとって必須である<sup>1)</sup>。心外膜が冠動脈の起源であるかどうかは、長い間議論の対象であった。主に 1990 年代に行われた鳥類胚を用いた細胞標識実験や組織移植実験は、心外膜の前駆体が冠動脈の内皮と平滑筋の両方に寄与しうることを示した<sup>2,3,4)</sup>。しかし近年、遺伝子改変マウスを用いた細胞系譜解析がなされ、冠動脈内皮のかなりの部分が

心内膜や静脈洞内皮から生じることがわかってきた<sup>5,6,7,8,9)</sup>。すなわち、冠動脈の発生を理解するためには、起源や性質の異なる複数の細胞集団の間の相互関連を明らかにしなければならない。

冠動脈は早い時期から心臓の中である程度決まった分布を示す<sup>10)</sup>。このことから心臓は、冠動脈形成の初期段階から、冠動脈の走行に影響を与える何らかの位置情報を持っていると考えられる。その位置情報に関する手がかりを得るため、明瞭な冠動脈をもつ鳥類胚心臓と冠動脈をもたない両生類の心臓の間で、心壁の組織構築を比較した(図1)。鳥類胚の心臓の一部、特に房室溝と室間溝には、心外膜直下に厚い間充織があり、冠動脈の形成の場となっている。一方、冠動脈を持たないアフリカツメガエルの心臓にはこの間充織がほとんどない。この観察結果からわれわれは、心外膜下の間充織の分布が冠動脈の発生に関係していると考え、その仮説を遺伝子導入実験によってさらに検討することにした。

心外膜下の間充織は、心外膜細胞の上皮-間充織転換によって生じる(図2)。これまでにわれわれは、*in vitro*培養系への添加実験により、VEGF-A、FGF-2、PDGF-B、TGFβ1、TGFβ2といった成長因子が、心外膜の間充織転換を促進することを明らかにしてきた<sup>11)</sup>。しかし、これらの因子が胚体内の心外膜に同じように作用するかはわかっていなかった。平成26年度にわれわれは、上記の成長因子遺伝子を Tol2 トランスポゾンベクター<sup>12)</sup>に組み込み、*in ovo*リポフェクション法<sup>11)</sup>を用いてニワトリ胚心外膜に導入し、強制発現させた。テストした遺伝子の中で *Vegf-a* が際立った効果を示した(図3)。遺伝子を導入された心外膜細胞の大部分が間充織へと転換し、心外膜下の間充織層を著しく肥厚させた。さらに重要なことに、その肥厚の中に、内皮と平滑筋に囲まれた血管様の胞状構造が生じた。平成27年度は、この構造に関してさらに詳しい解析を行った。

## 2. VEGF-A は心外膜に作用し動脈形成を促進する

上記の血管様構造が、動脈、静脈、リンパ管のいずれの特徴を持っているかを明らかにするため、マーカー遺伝子の発現を調べた(図4)。*Vegfr-2*(全ての血管内皮)、*EphrinB2*(動脈)、*Nrp2*(静脈)、*Prox1*(リンパ管)の4遺伝子をクローニングし、それらのmRNAを*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて検出した。異所性の血管様構造は *Vegfr-2* および *EphrinB2* 陽性の内皮によって覆われ、その内皮は *Nrp2* 陰性かつ *Prox1* 陰性であった。*VEGF-A* 強制発現によって形成される異所性の血管様構造が、動脈の特徴を示すことが明らかになった。

心外膜で強制発現させた VEGF-A は、心臓のどの細胞集団に作用することによって、血管形成を促進するのであろうか。われわれは VEGF-A の受容体をコードする4つの遺伝子 *Vegfr-1*、*Vegfr-2*、*Nrp1*、*Nrp2* の発現を調べた。これらの遺伝子は心外膜および心外膜下の間充織で強く発現しており(図5A-D)、VEGF-A はこれらの細胞集団に作用すると考えられ

た。実際、*Vegf-a* 遺伝子を心筋で強制発現させた場合には、異所性血管の形成は見られなかった (図 5E)。

*Vegf-a* 遺伝子を導入した心外膜細胞の大部分は心外膜下の間充織へと移動し、それらの近くにはカルデスモン陽性の平滑筋細胞が多く分布していた (図 6)。しかし、*Vegf-a* を発現する細胞自身が、異所性血管の内皮や平滑筋に積極的に寄与することを示唆する結果は得られなかった (図 6)。

### 3. まとめ

*Vegf-a* 遺伝子を心外膜で強制発現させると、心外膜下の間充織が肥厚するとともに、動脈マーカーを発現する心異所性血管を生じた。本研究の結果は、心外膜の上皮-間充織転換と血管形成が、共通のシグナル分子の制御のもとで起こる、互いに関連した発生イベントであるという考えを支持する証拠と言える。

本研究の結果は、心外膜下間充織の肥厚と血管形成の間の因果関係を証明するものではない。強制発現させた VEGF-A が直接心壁中の血管前駆細胞に作用し、分化や管腔形成を促進した可能性を完全には排除できないからである。しかし、心筋で VEGF-A を強制発現させた場合には明瞭な異所性血管が見られなかったことから、VEGF-A による異所性血管の形成が、心外膜を介した間接的作用によって起こったものである可能性は高い。VEGF-A の作用によって増大した心外膜下間充織が、血管前駆細胞の集積や分化をサポートする周囲環境 (ニッチ) として機能するのかもしれない。

### 謝 辞

本研究の一部は、先端科学技術研究所共同研究プロジェクトと日本学術振興会科学研究費基盤研究 B (課題番号 23370092) の支援を受けて行った。

### 参考文献

- 1) Pennisi, D.J., Ballard, V.L., and Mikawa, T. Epicardium is required for the full rate of myocyte proliferation and levels of expression of myocyte mitogenic factors FGF2 and its receptor, FGFR-1, but not for transmural myocardial patterning in the embryonic chick heart. *Dev. Dyn.* 228, 161-172, 2003.
- 2) Mikawa, T., and Fischman, D.A. Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9504-9508, 1992.
- 3) Mikawa, T., and Gourdie, R.G. Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth

- muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev Biol* 174, 221–232, 1996.
- 4) Poelmann, R.E., Gittenberger-de Groot, A.C., Mentink, M.M., Bokenkamp, R., and Hogers, B. Development of the cardiac coronary vascular endothelium, studied with antiendothelial antibodies, in chicken-quail chimeras. *Circ Res* 73, 559–568, 1993.
  - 5) Chen, H.L., Sharma, B., Akerberg, B.N., Numi, H.J., Kivela, R., Saharinen, P., Aghajanian, H., McKay, A.S., Bogard, P.E., Chang, A.H., Jacobs, A.H., Epstein, J.A., Stankunas, K., Alitalo, K., and Red-Horse, K. The sinus venosus contributes to coronary vasculature through VEGFC-stimulated angiogenesis. *Development* 141, 4500–4512, 2014.
  - 6) Red-Horse, K., Ueno, H., Weissman, I.L., and Krasnow, M.A. Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature* 464, 549–553, 2010.
  - 7) Tian, X., Hu, T., Zhang, H., He, L., Huang, X., Liu, Q., Yu, W., Yang, Z., Yan, Y., Yang, X., Zhong, T.P., Pu, W.T., and Zhou, B. Vessel formation. De novo formation of a distinct coronary vascular population in neonatal heart. *Science* 345, 90–94, 2014.
  - 8) Wu, B., Zhang, Z., Lui, W., Chen, X., Wang, Y., Chamberlain, A.A., Moreno-Rodriguez, R.A., Markwald, R.R., O'Rourke, B.P., Sharp, D.J., Zheng, D., Lenz, J., Baldwin, H.S., Chang, C.P., and Zhou, B. Endocardial cells form the coronary arteries by angiogenesis through myocardial-endocardial VEGF signaling. *Cell* 151, 1083–1096, 2012.
  - 9) Tian, X., Pu, W.T., and Zhou, B. Cellular origin and developmental program of coronary angiogenesis. *Circ Res* 116, 515–530, 2015.
  - 10) Kattan, J., Dettman, R.W., and Bristow, J. Formation and remodeling of the coronary vascular bed in the embryonic avian heart. *Dev Dyn* 230, 34–43, 2004.
  - 11) Ishii, Y., Garriock, R.J., Navetta, 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.
  - 12) Sato, Y., Kasai, T., Nakagawa, S., Tanabe, K., Watanabe, T., Kawakami, K., and Takahashi, Y. Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos. *Dev Biol* 305, 616–624, 2007.

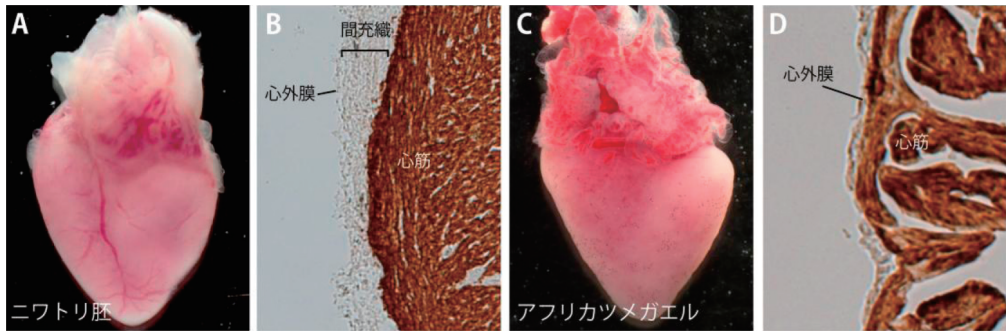


図1 鳥類胚と両生類の心臓の比較

- (A) 16日胚ニワトリ心臓（背側から見たところ）。血管がはっきりと見える。
- (B) 12日胚ニワトリ心臓（房室溝に近い心室）の組織切片。心筋をMF20抗体で免疫染色（茶）。心外膜下間充織を主とする厚い非筋組織が心筋を覆っている。
- (C) アフリカツメガエル成体心臓。明瞭な冠動脈をもたない。
- (D) アフリカツメガエル心壁の組織切片（心室）。心外膜下間充織をほとんど持たない。

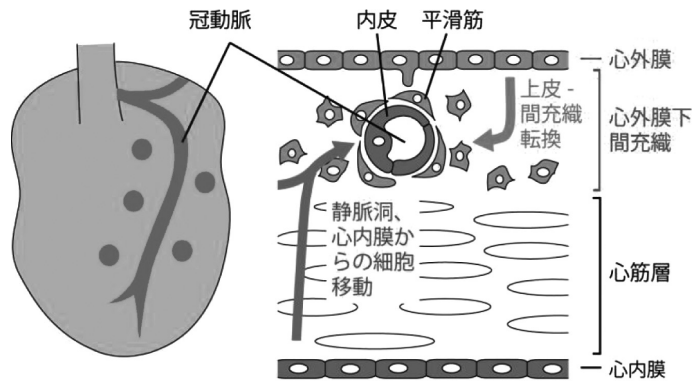


図2 心外膜細胞の上皮-間充織転換および冠動脈の形成

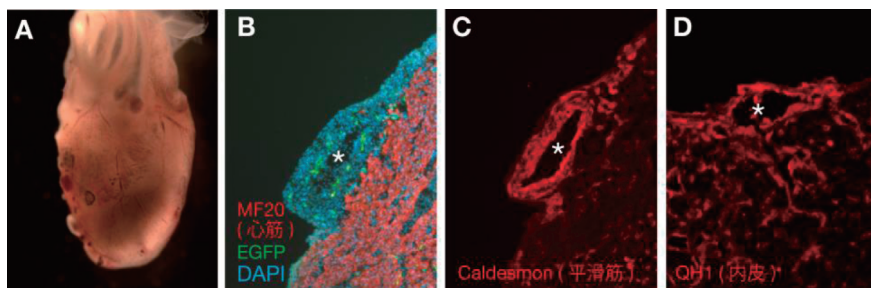


図3 Vegf-a 強制発現による間充織の肥厚および心異所性血管の形成

- (A) ニワトリ 10.5 日胚心臓。In ovo リポフェクション法を用い、*Vegf-a* 遺伝子を組み込んだ Tol2 トランスポゾンベクターをトランスポゼース発現ベクターとともに 2.5 日胚の心外膜前駆体に導入し、発生を進めた。固定前に墨汁を血管に注入した。心臓表面に墨汁を含んだ隆起が見られる。
- (B) 隆起の組織切片。隆起は MF20 (赤) 陰性の非筋組織の肥厚によって生じたものである。*Vegf-a* 発現細胞を共発現させた EGFP で (緑)、すべての細胞の核を DAPI (青) で染色した。
- (C) (B) の近傍の切片を、平滑筋マーカーであるカルデスモンで染色したもの。  
\* は異所性血管の内腔を示す。
- (D) *Vegf-a* を強制発現させた 10.5 日胚ウズラ胚心臓の切片を血管内皮認識 QH1 抗体を用いて免疫染色したもの。

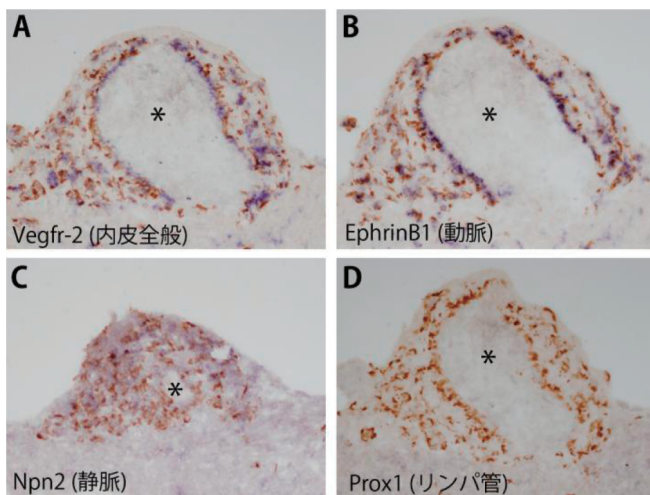


図4 心異所性血管は動脈の性質を示す

*Vegf-A* 遺伝子を心外膜で強制発現させた 10.5 日胚ニワトリ胚心臓における *Vegfr-2* (A)、*EphrinB1* (B)、*Npn2* (C)、*Prox1* (D) の発現 (青紫)。*Vegf-A* 遺伝子が導入された細胞を、共発現させた EGFP に対する免疫染色により可視化した (茶)。

\* は異所性血管の内腔を示す。

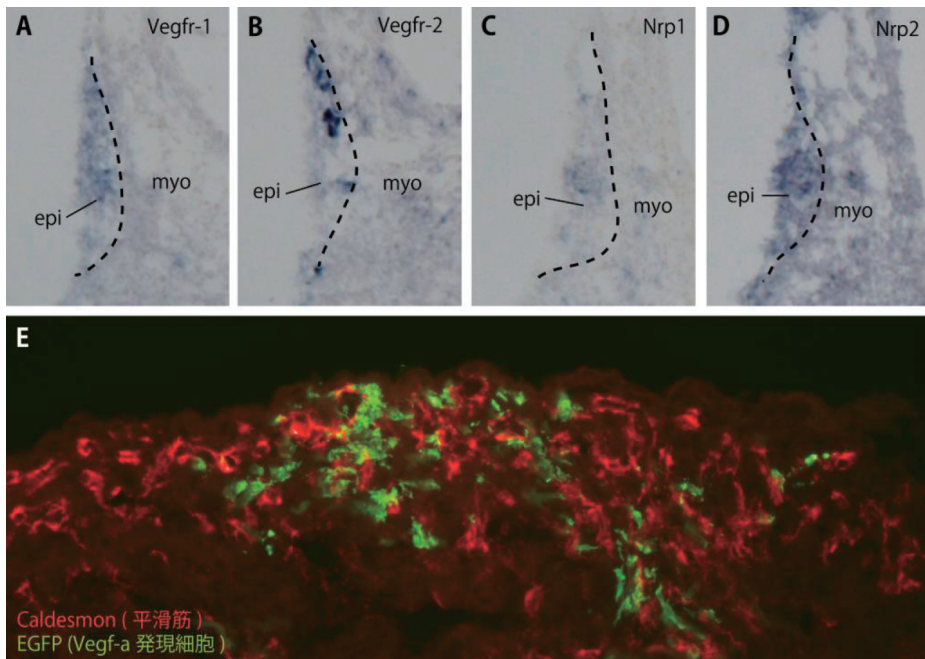


図5 VEGF-A は心外膜に作用する

VEGF-A 受容体をコードする *Vegfr-1* (A)、*Vegfr-2* (B)、*Nrp1* (C)、*Nrp2* (D) の発現パターン。*Vegfr-1* と *Nrp2* が心外膜およびその直下の間充織(epi) で、*Vegfr-2* および *Nrp1* が間充織の一部の細胞で強く発現する。(E) 心筋での *Vegf-a* 強制発現。10.5日胚ニワトリ胚心臓。カルデスモン (赤)、EGFP (緑) を検出。明瞭な血管形成促進作用は認められない。

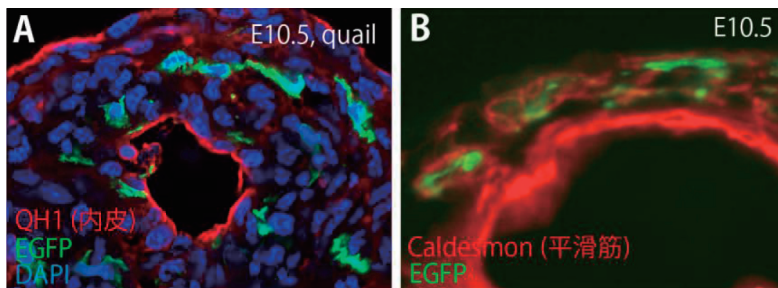


図6 *Vegf-a* 強制発現の細胞分化への影響

10.5日胚ウズラ心臓 (A) およびニワトリ心臓 (B)。*Vegf-a* 遺伝子を発現する心外膜由来細胞 (EGFP、緑) の多くは、異所性血管の内皮 (A、QH1、赤) にも平滑筋 (B、カルデスモン、赤) にも寄与しない。

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

Yasuo ISHII  
Naoki ITANO

### Abstract

The epicardium is a single layer of epithelial cells that covers the entire surface of the heart. After the entry to the heart and subsequent spreading over the myocardial surface, epicardial cells undergo an epithelial-mesenchymal transformation (EMT) to generate the subepicardial mesenchyme, a major site of coronary vasculogenesis. Some growth factors, including vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, promote the epicardial EMT in vitro. To investigate whether the epicardial EMT affects the development of coronary vascular system in vivo, we misexpressed candidate factors in epicardial progenitor cells in chick, using transposon-mediated gene transfer. Among factors we tested, VEGF-A showed a distinct effect to stimulate epicardial EMT, leading to local thickenings of subepicardial mesenchyme in transfected areas. These thickenings contained blood-filled cysts, whose lumen was lined by ephrinB2-positive arterial endothelium surrounded by caldesmon-positive smooth muscle. Majority of transfected cells were negative for either endothelial or smooth muscle markers. Vegf-a misexpression in the myocardium showed no obvious effect. These results are consistent with the model in which VEGF-stimulated epicardium-derived cells provide supportive environment for coronary artery development.

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