

## 血管内皮幹細胞による血管再生療法の開発

内藤尚道

大阪大学 微生物病研究所 情報伝達分野

### 【研究の背景】

血管の内腔を覆う血管内皮細胞は、血液と組織の境界に位置し、物質交換を担っている。炎症が生じると、内皮細胞は活性化して、炎症細胞の組織への遊走を助けると同時に、虚血に応答して新たな血管を新生する。既存の血管から新たな血管が形成される過程である血管新生は、内皮細胞が血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) に応答して活性化し増殖することで開始する。これまでの血管研究では、全ての血管内皮細胞は均一であるとされ、血管新生が開始する部位は、VEGF の濃度勾配にしたがって確率論的に決定されると考えられていた。私たちは、このようなこれまでの概念は必ずしも正しくなく、内皮細胞には増殖能という点で多様性が存在することを見出してきた<sup>1)</sup>。

増殖能が高い内皮細胞は、CD157 を発現し、CD157 陽性細胞は CD157 陰性細胞への一方向性の分化を示す。また生体内で高い血管構築能を示し、移植実験で自己複製能を示すことから、「幹細胞」としての性質を有する内皮細胞である<sup>2)</sup>。本細胞を用いて血管を再生する方法を確立すると、虚血性疾患の治療に応用できる可能性が期待できる。

### 【目 的】

本研究では「幹細胞性」を示す内皮幹細胞の遺伝子発現解析を通じて、内皮幹細胞の活性化機構の解明をめざす。そして内皮幹細胞の遺伝子発現特性から得られた情報をもとに、ES/iPS 細胞から内皮幹細胞の誘導する方法の基盤となる技術の確立を目的とした。

### 【方 法】

マウス下肢筋肉の血管内皮細胞を分離して、シングルセル解析にて個々の内皮細胞の遺伝子発現を調べた。特に CD157 陽性内皮細胞に着目して解析を実施した。さらにマウス下肢虚血モデルを作製して、虚血下肢筋肉の血管内皮細胞のシングルセル解析を行った。得られた結果から、定常状態と虚血状態の内皮幹細胞分画の遺伝子発現変化を解析して、内皮幹細胞の機能特性と活性化に重要であると考えられる複数の遺伝子を絞り込み、それらの機能解析を行った。

### 【結 果】

最初にマウスから内皮幹細胞と内皮細胞を効率よく分離して解析する方法を確立して<sup>3)</sup>、10x シングルセルシステムを用いて一細胞レベルで内皮細胞の遺伝子発現を明らかにした。遺伝子発現情報をもとに主成分解析を行い、細胞分布を 2 次元で展開すると、内皮細胞は多様性を認め、CD157 を発現する内皮細胞は特定の内皮細胞クラスターに集積していることが明らかになった。CD157 陽性細胞の遺伝子発現情報と、CD157 陽性細胞を含むクラスターの遺伝子発現情報を取得し、他の内皮細胞と比較することで、CD157 陽性細胞に特異的に発現している遺伝子を 20 個抽出した。同様の解析を下肢虚血モデル(虚血後 3 日目)で実施した。また得られた遺伝子情報をもとにバイオインフォマティクス解析を駆使して、内皮細胞の動態を推測すると、虚血時には内皮細胞は CD157 陽性細胞を含む特定のクラスターが中心となって細胞増殖しているとの結果が得られた(投稿準備中)。

次に得られた遺伝子の機能解析を行った。最初に内皮細胞株を用いて、目的の遺伝子の発現の有無を qRT-PCR で評価した。細胞株では発現している遺伝子と、発現していない遺伝子を認めた。発現を認めない遺伝子に関しては、遺伝子クローニングの上、過剰発現細胞株を作製した。発現を認める遺伝子に関してはノックダウンを行った。得られた細胞株を用いて細胞増殖能、ネットワーク形成能、遊走能の評価を行っている。さらに細胞増殖が亢進した遺伝子に関しては ES 細胞への導入を試みている。遺伝子導入した ES 細胞を内皮細胞に分化させて、マウスに移植実験を行う予定である。

## 【考 察】

本研究を通じて、①内皮細胞に多様性を認めること、②CD157 陽性内皮細胞は特定のクラスターに集積すること、③内皮細胞が増殖する際には特定の内皮細胞集団が重要であることが明らかになった。内皮細胞の多様性に着目した血管再生機構の解明につながる重要な成果であると考えられる。一方で膨大な遺伝子発現情報から、重要な情報を絞り込む作業には困難が伴い、1 年間の研究期間では遺伝子機能解析を十分に実施できなかった。今後も継続して解析を行う予定である。内皮細胞の多様性と幹細胞性に着目した血管再生実験に関しても、現在実験系の確立を行っている。引き続き研究を行い効率的な血管再生療法の確立を目指す予定である。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

虚血性疾患において血管を効果的に再生できれば、臨床的意義は非常に高い。これまでも、血管内皮前駆細胞 (EPC) を利用した臨床治験が行われており、一定の成果が認められている。しかし血管再生において EPC が内皮細胞そのものとして貢献する割合は低いと考えられている。そのため内皮幹細胞の細胞特性を解明して、誘導することができれば、従来とは異なる血管再生法を確立できる可能性を秘めている。内皮幹細胞を単独で使用するだけでなく、EPC のパラクライン効果を期待した併用法や、VEGF や HGF などのサイトカインとの併用など、いくつかの応用方法も期待できる。血管再生治療の効果を劇的に向上させる可能性がある。将来的にはヒト iPS 細胞を用いて血管内皮幹細胞の誘導を目指したい。誘導した血管内皮幹細胞のバンク化ができれば、虚血性疾患に対して有効な治療法となると考えられる。また、血管内皮幹細胞の特徴を明らかにして、通常の内皮細胞をリプログラミングにより「幹細胞化」ができれば、新たな治療法の開発につながる事も期待できる。生体内で、内皮細胞を「増殖能が高い」状態にできれば、細胞移植に依存しない治療法が可能になるかもしれない。

## 【参考・引用文献】

- 1) Naito H., Kidoya H., Sakimoto S., Wakabayashi T. & Takakura N. Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels. *The EMBO Journal* 31: 842-855, 2012
- 2) Wakabayashi T.<sup>1</sup>, Naito H.<sup>1</sup> (<sup>1</sup> first authors), Suehiro JI., Lin Y., Kawaji H., Iba T., Kouno T., Ishikawa-Kato S., Furuno M., Takara K., Muramatsu F., Weizhen J., Kidoya H., Ishihara K., Hayashizaki Y., Nishida K., Yoder MC. & Takakura N. CD157 Marks Tissue-Resident Endothelial Stem Cells with Homeostatic and Regenerative Properties. *Cell Stem Cell* 22:384-397 e386, 2018
- 3) Naito H., Wakabayashi T., Ishida M., Gil CH., Iba T., Rahmawati FN., Shimizu S., Yoder MC., Takakura N. Isolation of tissue-resident vascular endothelial stem cells from mouse liver. *Nature Protocols* 15: 1066-1081, 2020