

網膜血管内皮コロニー形成細胞の調節機構の解明と疾患モデルへの関与

崎元 晋

大阪大学大学院医学系研究科 脳神経感覚器外科学(眼科学)

【研究の背景】

報告者は、ヒト臍帯血より *ex vivo* にて誘導した血管内皮幹/前駆細胞の分画の一つである血管内皮コロニー形成細胞 (Endothelial Colony-Forming Cell, ECFC) 由来の生理活性物質による虚血性網膜症および網膜神経変性疾患に対する神経-血管保護による治療効果を報告した (JCI insight, 2017)。さらに ECFC 由来の細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EVs) の虚血性網膜症保護効果についても検討を行った (JCI insight, 2022)。それらの研究より、ECFCを用いた細胞治療は虚血性網膜症の治療法として、パラクラインのメカニズムにおいて効果があるものの、網膜血管に対するECFCの生着は認められなかった。

【目的】

本研究では、細胞治療に用いる ECFC ではなく、組織中に存在し、血管形成に関わるとされる広義の ECFC に関する研究を、所属研究室より報告のあった血管内皮幹細胞マーカーである XX と組み合わせることにより、網膜における血管内皮幹細胞システムの解明を目的とする。

【方法】

A. 網膜での血管内皮幹細胞 (ECFC) の同定とその局在およびその機能

① XXCreERT2 マウス解析: 申請者はすでに XXCreERT2-IRES-tdTomato マウスを導入済である。本研究では本マウスの免疫組織学的ならびにフローサイトメトリー法 (FACS) による解析を行うことにより、XX 陽性血管内皮細胞の同定を行う。

② XX 陽性血管内皮細胞の機能解析: 上記 XXTg マウスを DTR マウスと交配し、網膜ECFCをノックアウトすることにより網膜血管における生理的リモデリングにおける網膜血管内皮幹細胞が果たす役割に関して解析を行う。

B. 虚血性網膜症における血管内皮幹細胞 (ECFC) の役割

③ OIR モデルでのニッチ環境における ECFC 制御機構: OIR モデルでのニッチ環境の形態的解析を行い、さらにニッチ環境において ECFC がどのように変化するかを時間的・空間的に解析する。

④ OIR モデルにおける Tg マウスの解析: 上記に2種類の Tg マウスを用い、疾患モデルでの、細胞系譜解析ならびに DTR マウスと交配後、XX 陽性もしくは CD157 陽性細胞をノックアウトすることにより虚血性網膜症における ECFC がどのように血管リモデリングに関与するかを明らかにする。

【結果】

報告者は今回の予備実験として、網膜血管(およびニッチ環境)に存在する ECFC(血管内皮幹細胞)を同定した。さらに上記のように初めて網膜血管内皮幹細胞つまり網膜の ECFC が 20 倍以上存在するニッチ環境を同定することに成功した。この網膜血管内皮細胞に対するシングルセル RNAseq 解析により、ECFC が他の細胞集団と全く異なる細胞特性を保有していることがわかっている。また、方法 A の実験により、XX 陽性血管内皮細胞が我々の同定したニッチ環境に豊富に存在す

ることがわかった。また方法 B の実験結果より、OIR モデルにおいても、XX 陽性細胞が虚血性網膜症に関与していたことが明らかとなった。

【考 察】

申請者の目的は、糖尿病網膜症などの虚血性網膜症において、血管の恒常的リモデリング異常が生じているという仮説をたて、これを検証することにある。そのために血管内皮幹細胞のマーカーとして CD157 および XX を用い、網膜血管内皮幹細胞およびそのニッチ環境の同定を行うことにより、網膜血管の幹細胞システムの解明を試みている。最近、血管内皮細胞の特性は、動脈、静脈、毛細血管などの血管床の種類では影響されず、臓器の種類の違いが、血管内皮細胞の heterogeneity に大きく関わっていることが示された (Cell, 2021)。血管内皮細胞でも臓器特異的な不均質性が報告されているため、網膜血管特異的な血管内皮幹細胞システムが存在する可能性がある。しかし、これまで網膜血管でのシングルセル RNAseq は行われておらず、その不均一性も不明である。本研究の予備実験として、申請者は世界に先駆けて網膜血管内皮細胞のシングルセル RNAseq 解析を行った。その結果、網膜における血管内皮幹細胞 (ECFC) の微小環境 (ニッチ環境) ともいべき部位を同定した。これらのニッチ環境において、ECFC が約 20 倍以上存在し、シングルセル RNAseq にて明確なクラスターを形成していた。さらにそれらの細胞は旺盛なコロニー形成能を有しており、ECFC としての特性を有していた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

糖尿病網膜症は、先進国における生産年齢の失明原因の第一位であり、非常に重要な疾患である。近年抗 VEGF 剤により画期的な治療効果をもたらされるようになったが、反復眼内注射が必要など改善を要する点があるため、新たな治療の開発が喫緊の課題である。特に血管そのものを再生し、虚血を改善する網膜症の根本的な治療の開発は非常に重要である。本研究において網膜血管内皮幹細胞による血管リモデリングのメカニズム解明が明らかになれば臨床において全く異なる治療アプローチが可能となる。

【参考・引用文献】

- Naito H, Kidoya H, Sakimoto S, Wakabayashi T, Takakura N. EMBO J. XX2 Feb 15;31(4):842-55. Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels
- Sakimoto S, Marchetti V, Aguilar E, Lee K, Usui Y, Murinello S, Bucher F, Trombley JK, Fallon R, Wagey R, Peters C, Schepke EL, Westenskow PD, Friedlander M. 44 expression in endothelial colony-forming cells regulates neurovascular trophic effect. JCI insight. 2: e89906, XX7.
- Marra KV, Aguilar E, Guoqin W, Usui-Ouchi A, Ideguchi Y, Sakimoto S, Friedlander M. Bioactive extracellular vesicles from a subset of endothelial progenitor cells rescue retinal ischemia and neurodegeneration. JCI Insight. 2022;7(12).
- Kalucka J, de Rooij LPMH, Goveia J, et al. Cell. 2020 Feb XX80(4):764-779. Single-Cell Transcriptome Atlas of Murine Endothelial Cells.