

# Existence and regulation of endothelial stem cell population in the pre-existing blood vessels

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-01-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Takakura, Nobuyuki メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24517/00060343">https://doi.org/10.24517/00060343</a>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



## 【研究紹介】

### 既存の血管に存在する血管内皮幹細胞の存在とその制御

#### Existence and regulation of endothelial stem cell population in the pre-existing blood vessels

大阪大学 微生物病研究所 情報伝達分野  
高 倉 伸 幸

#### 1. はじめに

私が、金沢大学がん研究所(現、がん進展制御研究所)細胞分化研究分野の教授として赴任させていただいたのは2001年4月である。赴任前は、熊本大学発生医学研究所で、造血と血管の発生機序に関わる研究を行っていた。金沢大学では、がんの制圧をミッションに掲げ、(腫瘍)血管形成に関わる新しいメカニズムの解明を志した。発生医学的研究をベースにした、血管形成に関わる血管内皮細胞の分化階層性の解明、そして腫瘍内血管の成熟化の誘導による腫瘍微小環境の改善を、大きなテーマにして研究を遂行した。2006年4月に現所属の大阪大学微生物病研究所に異動したが、金沢大学で開始した研究を継続して、それらを発展させてきた。本稿では、この間、血管内皮細胞の階層性がどこまで理解できてきたのかを主に紹介し、腫瘍血管の成熟化のメリットとは何か、最近の研究成果についても若干触れたい。

#### 2. 脈管形成と血管新生

従来、血管形成には大きく二つのプロセスがあることが教科書的に説明されてきた。つまり、受精卵から胎児が発生する過程において、全く血管が存在しない組織に、中胚葉から分化した血管内皮細胞が管腔を形成し、その周りに基底膜側から、壁細胞(ペリサイトあるいは血管平滑筋細胞)が裏打ちして安定した構造の血管が形成されていく、いわゆるde novoの血管形成の過程である血管発生(脈管形成ともいう)と、既存の血管から新しい血管が発芽機能により伸張していく血管新生の過程である。

血管発生の過程での血管内皮細胞の起源は、中胚葉由来のいわゆるヘマンジオブラスト(近年は、hemogenic angioblastと呼ぶ)という血液細胞と血管内皮細胞の共通祖先細胞であることが示されており、ここに、中胚葉から分化してきた血管内皮幹細胞から血管内皮細胞が発生するということが記述されてこなかった。血管新生の過程においては、既存の血管から血管分枝の移動する方向をガイダンスするtip(先端)細胞の発生に続き、増殖活性の高いstalk(茎)細胞による血管枝の伸長が生じる。また、最終的に血管内皮細胞同士の接着を高め、血管透過性を高度に制御するphalanx(ファランクス)細胞という血管内皮細胞が新生血管の成熟化を誘導する。このように、役割の異なる血管内皮細胞が存在することは記述されてきたが、では血管内皮細胞の中に、血管内皮幹細胞を頂点とした分化の階層性があるのかどうかについては、血管発生の過程においても、血管新生の過程においても明確にされてこなかった。

#### 3. 血管内皮幹細胞様細胞の発見

成体マウスの組織から細胞を分散し、血管内皮細胞だけを回収することは、細胞表面マーカーを利用して、フローサイトメーターを用いれば可能である。血管内皮細胞は血液細胞マーカーであるCD45が陰性で、血管内皮細胞マーカーCD31陽性の細胞として定義できる。CD45陽性CD31陽性のvascular dendritic cellのような細胞が存在するために、単にCD31陽性だけでは定義できない。CD45陰性CD31陽性細胞のいわゆる血管内皮細胞に分化決定している細胞中に、増殖活性が特異的に高い、あるいは長期的に血管の再生能力の高い細胞が存在するかどうかは不明であった。

様々な組織・臓器において、臓器固有の幹細胞は、組織・臓器の長期維持のために外来毒性物質を薬剤排出ポンプの発現を高めて身を守る。例えば、DNA染色色素であるヘキストを取り込ませても、組織幹細胞はヘキストを取り込まない細胞集団(side population; SP細胞)として認識が可能である(例外はある)。マウスを用いた解析で、どのような臓器にもCD45陰性CD31陽性細胞内皮細胞中に、1%程度SP細胞が存在する。この細胞中には、1割程度の確率で、一個の細胞から無尽蔵に血管内皮細胞を産生する能力を持つ細胞が含まれていることが判明した<sup>1)</sup>。また、大腿筋から回収した、血管内皮SP細胞を、大腿動脈結紮除去による下肢の虚血モデルに移植すると、新しい血管が形成され、徐々に既存の血管が移植した血管内皮SP細胞由来の血管内皮細胞で置換されていくことが判明した。血管内皮SP細胞は、骨髄を起源としておらず、つまり、従来から報告されていたような、いわゆるEPC(血管内皮前駆細胞)のような細胞ではなく、既存の血管に存在する血管内皮幹細胞様の細胞であることが判明した。

#### 4. 血管内皮幹細胞から血管内皮細胞への分化階層性の証明

SP細胞から、ヘキストを排出するような終末分化したいわゆるMP(main population)細胞に分化するというのも、一つの階層性を示していることにはなる。血管内皮SP細胞も、血管内皮MP細胞になると、高い増殖活性はなくなってくるため、SP細胞からMP細胞に分化してくと判断された。しかし、いわゆる幹細胞生物学的に階層性を証明していくために、血管内皮細胞に発現する分子により幹細胞を定義し、その分化の系譜をマーカー分子で追跡したいところである。そこで、血管内皮SP細胞とMP細胞に発現する遺伝子の差異をアレイで解析し、

CD157とCD200を発現している血管内皮細胞が、いわゆる血管内皮幹細胞であることを発見した<sup>2)</sup>。例えば、CD157陽性CD200陽性の血管内皮細胞を、肝類洞血管が障害を受けるモデルにおいて肝臓に移植すると、CD157陽性CD200陽性から、CD157陰性CD200陽性(前駆細胞)に分化し、CD157陰性CD200陰性の血管内皮細胞に終末分化することが判明した。また、*in vitro*の解析や、*in vivo*のlineage tracingの解析をもあわせて、CD45陰性CD31陽性の血管内皮細胞中の、CD157陽性CD200陽性が既存の血管内に存在する血管内皮細胞の分化階層性の頂点であることが判明したのである。

このような血管内皮幹細胞は、虚血性疾患における血管再生治療に利用することができるが、我々はいわゆるアンジオクリン機構による病気の改善にも応用できることを証明した。例えば、肝臓の類洞血管内皮細胞は凝固第Ⅷ因子を特異的に分泌することが知られている。そこで、血友病Aモデルマウスの肝臓に正常マウス由来のCD157陽性CD200陽性血管内皮幹細胞を移植して、肝臓血管を正常血管内皮細胞で置換すると、凝固第Ⅷ因子の継続的な分泌が誘導され、本マウスで観察される出血傾向が完全に改善することが判明した。

マウスの各臓器を解析したところ、このようなCD157陽性CD200陽性の血管内皮幹細胞はどの様な臓器にも存在していることが判明している。最近、このような血管内皮幹細胞の詳細な回収方法について報告しているので参考にさせていただきたい<sup>3)</sup>。この細胞の特徴については引き続き解析を続けており、single cell RNA sequenceデータによる、血管内皮幹細胞から終末分化した血管内皮細胞への分化について、トランスク립ト解析の結果報告も近々行う予定である。

#### 腫瘍血管の成熟化 —終わりにかえて—

金沢大学がん研究所(現、がん進展制御研究所)在籍時代のミッションと同様に、腫瘍内の血管についての研究も継続している。前述した血管内皮幹細胞の腫瘍血管形成への貢献性も大きいことが判明したことから、この細胞の制御が腫瘍血管新生の治療においては考慮すべき点である<sup>4)</sup>。一方で、我々は腫瘍内の未成熟な血管を成熟化することで、薬剤の送達性や、腫瘍免疫状態を改善する方法の開発も行ってきており、その成果を紹介して本稿を閉じる。

##### 1) Apelin

血管内皮細胞同士の接着に関わるレセプター型チロシンキナーゼ、Tie2の活性化により血管内皮細胞で発現が亢進する遺伝子の網羅的解析により単離した分子である。最終的に13個のアミノ酸で構築される生理活性ペプチドである。血管径の制御機構と<sup>5)</sup>、動脈—静脈の併走性<sup>6)</sup>に重要な機能を果たしていることを見出してきたが、腫瘍では成熟血管を誘導して、薬剤送達性と免疫細胞浸潤を活発にさせることが判明している<sup>7)</sup>。

##### 2) LPA4活性化物質

血管内皮細胞同士の接着を誘導する新規物質の探索の過程で、リゾホスファチジン(LPA)が発見された。LPA

は血管内皮細胞に発現するG蛋白共役型受容体のLPA4を活性化すると、ジャンクションを形成させるVE-cadherinを血管内皮細胞上に動員し、線状接着帯の形成を誘導することが判明した<sup>8)</sup>。LPA4の活性化で、腫瘍への薬剤送達性、腫瘍免疫が改善する<sup>8, 9)</sup>。

#### 謝 辞

執筆の機会をいただきましたことを、金沢大学医学系長・眼科教授の杉山和久先生に感謝いたします。

#### 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. *EMBO J* 31: 842-855, 2012.
- 2) Wakabayashi T, Naito H, 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, 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. *Nat Protoc.* 15: 1066-1081, 2020
- 4) Naito H, Wakabayashi T, Kidoya H, Muramatsu F, Takara K, Eino D, Yaman Ke, Iba T, Takakura N. Endothelial side population cells contribute to tumor angiogenesis and antiangiogenic drug resistance. *Cancer Res.* 76: 3200-3210, 2016.
- 5) Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, Fujii R, and Takakura N. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J.* 27: 522-534, 2008.
- 6) Kidoya K, Naito H, Muramatsu F, Yamakawa D, Jia W, Ikawa M, Sonobe T, Tsuchimochi H, Shirai M, Adams RH, Fukamizu A, Takakura N. APJ Regulates Parallel Juxtapositional Alignment of Arteries and Veins in the skin. *Dev Cell* 33: 247-259, 2015.
- 7) Kidoya H, Kunii N, Naito H, Muramatsu F, Okamoto Y, Nakayama T, Takakura N. The apelin/APJ system induces maturation of the tumor vasculature and improves the efficiency of immune therapy. *Oncogene* 31: 3254-3264, 2012.
- 8) Takara K, Eino D, Ando K, Yasuda D, Naito H, Tsukada Y, Iba T, Wakabayashi T, Muramatsu F, Kidoya H, Fukuhara S, Mochizuki N, Ishii S, Kishima H, Takakura N. Lysophosphatidic Acid Receptor 4 Activation Augments Drug Delivery in Tumors by Tightening Endothelial Cell-Cell Contact. *Cell Rep.* 20: 2072-2086, 2017.
- 9) Eino D, Tsukada Y, Naito H, Kanemura Y, Iba T, Wakabayashi T, Muramatsu F, Kidoya H, Arita H, Kagawa N, Fujimoto Y, Takara K, Kishima H, Takakura N. LPA4-Mediated Vascular Network Formation Increases the Efficacy of Anti-PD-1 Therapy against Brain Tumors. *Cancer Res.* 78: 6607-6620, 2018.