

血管内皮幹細胞の分離法を確立

—血管の修復と再生につながる研究成果—

【研究成果のポイント】

- ◆ これまで生体内で血管を作る事は困難でしたが、血管には血管内皮幹細胞（※1）と呼ばれる血管の幹細胞が存在していて、この幹細胞を利用すると、生体内で血管を再生できることを以前に報告しました。
- ◆ 今回、血管内皮幹細胞を高効率かつ簡便に分離する方法を確立しました。
- ◆ 本分離法を用いると、特殊な実験機器を使用しなくとも、多くの研究者が高い再現性を持って容易に血管内皮幹細胞を分離することができます。
- ◆ 本方法は幹細胞だけではなく、通常の血管内皮細胞（※2）も分離もでき、今後様々な血管研究へ応用して、血管研究の発展に大きく寄与する事が期待できます。

概要

大阪大学微生物病研究所の内藤 尚道准教授と高倉 伸幸教授らの研究グループは、2018年に血管を作る源となる血管の幹細胞（血管内皮幹細胞）を発見し、その解析を継続してきました。今回、血管内皮幹細胞を高効率に分離できる方法を確立し論文発表しました。

血管は癌、虚血性疾患、慢性炎症性疾患などを始め、多くの疾患の発症機序や病態形成に深く関与しています。そのため、血管の機能や構築メカニズムを明らかにする事で、これらの疾患の病態の理解が進み、より良い治療法を確立できると考えられます。これまで、生体から血管内皮細胞を大量に分離することが困難であり、血管研究を行う上で大きな障害となっていました。今回、数種類の酵素反応と力学作用を組み合わせることで、従来よりも簡便に血管内皮細胞と血管の幹細胞を分離する方法を確立し発表しました。本研究成果は、英国科学誌「Nature Protocols」2020年3月号（1月31日オンライン）に掲載されました。

研究の背景

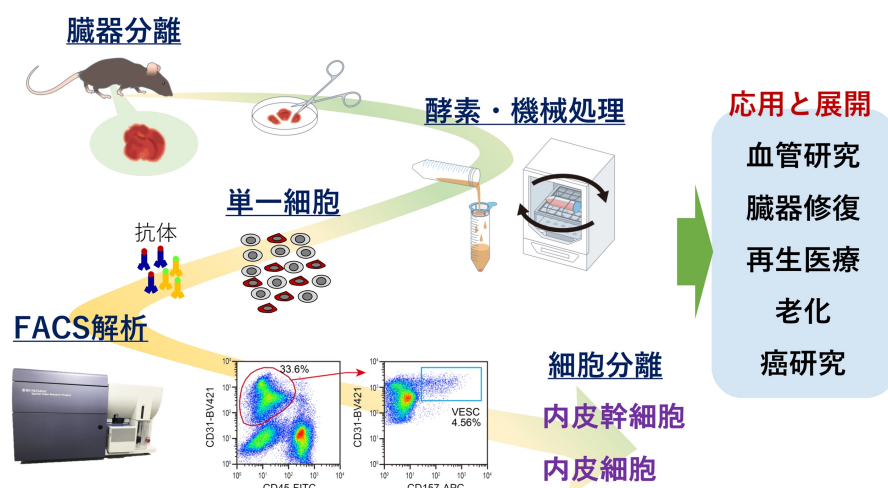
血管は全身に限なく張り廻り、血液を体の隅々まで行き渡らせ、組織に酸素や栄養素を届け、老廃物を組織から受け取り除去します。ヒトでは血管の全表面積は 700m² にも及び、その全ての内腔は必ず一層の扁平な形をした血管内皮細胞によって覆われます。臓器が傷害を受け、傷害された場所が低酸素状態になると、血管内皮細胞が増殖を開始して、血管新生（※3）が生じて新たな血管が作られます。血管新生は傷害された組織が修復されるために必須ですが、癌、炎症、線維化、動脈硬化巣の形成、さらには脂肪形成に至るまで、様々な病態にも深く関与しているため、血管新生を制御する分子メカニズムを解明することは、病態を理解して治療法を開発する上で重要です。そのため血管新生の制御メカニズムは、近年非常によく研究され、その結果、血管新生を誘導する増殖因子（血管内皮増殖因子）の作用を阻害する薬（血管新生阻害剤）が開発され、癌などの治療薬として臨床治療に応用されています。

血管新生が生じるためには、血管を構築する血管内皮細胞の増殖が必要です。これまで、生体内の血管内皮細胞は全て同じで、増殖する能力も全ての内皮細胞で等しいと考えられていました。私たちは、この概念は正確ではなく、成体の血管内皮細胞には増殖能力の「差」があることを明らかにしてきました。増殖能力の高い内皮細胞は、たった一つの細胞から体の中で大きく太い血管を作る事ができることから、血管の幹細胞のような性質を持つ、特殊な細胞であることがわかっています。これまで、このような細胞を見つける事が困難であったのは、内皮細胞を体から分離して、一つ一つの内皮細胞の性質を解析する事が困難であった事が一因と考えられます。これまでに臓器から内

皮細胞を分離する方法はいくつか報告されていますが、血管内皮幹細胞の分離に適した方法は確立されていませんでした。そこで私たちは、体の中の様々な臓器から内皮細胞を分離して、その中に含まれる血管内皮幹細胞を効率よく分離できる方法を確認するため、検討を重ねてきました。

◆ 本研究の内容

内皮幹細胞分離の概略図



本技術により血管研究の発展が期待できる

今回確立したプロトコルの利点は、簡単で単純な操作により内皮細胞と内皮幹細胞を効率よく分離できるという点にあります。今回の論文ではマウスの肝臓から内皮幹細胞を分離する方法を、具体的に細かな手順を説明しながら紹介しています。

まずマウスの肝臓を解剖用のハサミを使って細かく刻みます。次に細胞の周囲を囲む細胞間マトリックス(※4)を分解する酵素である、ジスパーゼ(※5)とコラゲナーゼ(※5)を用いて、刻まれた組織片をさらに細かく分解していきます。その際、刻まれた組織片と酵素が効率よく反応するために、1mm以下の断片になるように、鋭利なハサミを用いて細かく刻んでおく事が非常に重要です。切った組織片をより細かく分解するために、細胞外マトリックスを分解する数種類の酵素を用いて、組織片を分散させていきます。この酵素と反応させる際に、通常は酵素液の中に組織片をつけて温めるだけですが、本法では、さらに力学的作用を加える事によって、より効率よく細胞分散を行います。具体的には、組織片を浸した酵素液が入ったチューブを連続的に機械で振盪します。酵素液を十分に振盪させることで非常に効率よく、組織が分散されていきます。この工程を、酵素液を交換しながら数回繰り返すことにより、細胞外マトリックスが分解され、細胞同士が分離される事で最終的には単一の細胞に分散されます。

今回確立した手法を用いることで、従来の方法と比べ、より短時間で細胞を分離することが可能となりました。また、この処理時間の短縮が、生細胞の割合の増加と細胞表面マーカーの保持に繋がり、フローサイトメーターによる細胞分離が可能になります。さらに本論文では、得られた肝臓の内皮幹細胞と内皮細胞の培養実験や、RNAの発現解析、内皮細胞の系統分類についても紹介しています。

本プロトコルを用いる事で、血管内皮幹細胞を効率良く分離する事ができ、さらには内皮細胞も大量に分離できることから、今後様々な血管研究への応用が期待されます。また本法は、酵素反応の時間を変更することで、肝臓のみならず、肺や心臓、皮膚といった他の臓器からも同様に血管

内皮幹細胞を含む血管内皮細胞を大量に分離することができるので、全身の血管研究の発展につながる事が期待されます。

◆ 今後の発展性

- 血管内皮幹細胞の研究が進むと、組織に栄養を届ける血管の修復と再生が可能になり、組織や臓器の修復と再生の研究につながる事が期待できます。
- 血管は癌や心筋梗塞、脳梗塞、炎症性疾患など様々な疾患の病態と深く結びついているので、本方法を用いて、血管内皮幹細胞と血管内皮細胞の解析が可能になれば、これらの疾患に対する新たな治療法の開発につながる事が期待できます。

◆ 用語説明

※1 血管内皮幹細胞

血管内皮細胞の中に含まれる増殖能力の非常に高い細胞。細胞膜表面に CD157 分子を発現している。体の中で血管を作る事ができ、血管の幹細胞としての働く細胞。

※2 血管内皮細胞

全身の血管の内腔を覆う扁平で薄い細胞。血液と周囲の組織との間の細胞移動や、栄養素や老廃物、酸素や二酸化炭素などの物質交換を担っている。加齢や糖尿病、高血圧などが様々な原因で機能低下をきたし、疾患の発症や病態に深く関与する。

※3 血管新生

既存の血管から新たな血管が形成される現象。血管内皮増殖因子(VEGF)が内皮細胞に働き、細胞が活性化して増殖し、新たな血管が作られる。大人では特に癌、炎症性疾患、網膜症などの疾患の病態形成に密接に関わっている。

※4 細胞外マトリックス

生体を構成する体細胞の外側にある非細胞性の線維状や網目状の構造体。細胞にとって物理的な足場となるだけではなく、組織の形態形成や分化・維持に重要である。細胞外マトリックスの成分は、コラーゲン、フィブロネクチン、エラスチン、ラミニンなどの構造タンパク質と、プロテオグリカン、ヒアルロン酸などの複合多糖に大別することができる。

※5 ジスパーゼとコラゲナーゼ

細胞外マトリックスを構築するコラーゲンやフィブロネクチンなどの繊維を分解する酵素。細胞にはあまり傷害を与えず細胞分散を行う事ができる。

掲載論文・雑誌

論文タイトル : “**Isolation of tissue-resident vascular endothelial stem cells from mouse liver**”

「マウス肝臓からの血管内皮幹細胞の分離法」

掲載雑誌 : Nature Protocols 15, 1066-1081 (2020)

<https://doi.org/10.1038/s41596-019-0276-x>

著者 : Hisamichi Naito*, Taku Wakabayashi, Masako Ishida, Chang-Hyun Gil, Tomohiro Iba, Fitriana Nur Rahmawati, Shota Shimizu, Mervin C. Yoder*, Nobuyuki Takakura* (*Corresponding authors)



特記事項

本研究は、インディアナ大学との共同研究チームによって実施されました。

本研究は日本医療研究開発機構（AMED）革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ（PRIME）「生体組織の適応・修復機構の時空間的解析による生命現象の理解と医療技術シーズの創出（研究開発総括：吉村昭彦）」の研究課題「血管内皮幹細胞システムを基軸とした血管の恒常性維持と修復機構の解明（研究代表者：内藤尚道）」、老化メカニズムの解明・制御プロジェクト「個体・臓器老化研究拠点」（研究代表者：片桐秀樹）の研究課題「血管老化の分子機構の解明とその制御（研究分担者：高倉伸幸）」、次世代がん医療創生研究事業（P-CREATE）の研究課題「腫瘍血管正常化によりがん悪性化を制御する治療法の開発（研究代表者：高倉伸幸）」、文部科学省科学研究費補助金、公益財団法人武田科学振興財団、公益財団法人高松宮妃癌研究基金、公益財団法人第一三共生命科学研究振興財団、および公益財団法人 SGH 財団の研究支援を受け実施されました。



本件に関する問い合わせ先

<研究内容に関する問い合わせ先>

大阪大学 微生物病研究所 情報伝達分野

教授 高倉 伸幸（たかくら のぶゆき）

TEL : 06-6879-8316 FAX: 06-6879-8314

E-mail: ntakaku@biken.osaka-u.ac.jp

ホームページ: <http://st.biken.osaka-u.ac.jp/>

准教授 内藤 尚道（ないとう ひさみち）

TEL : 06-6879-8312

E-mail : naitohi@biken.osaka-u.ac.jp

<取材に関する問い合わせ先>

大阪大学微生物病研究所企画広報推進室

中込 咲綾（なかごみ さや）