

## 血管内皮幹細胞の同定と血管新生・リモデリングのメカニズム

高倉 伸幸

### 1. はじめに

血管は、全身臓器・組織へ酸素、養分そして免疫細胞を送達させるという基本的な機能を有する以外にも、組織特異的な細胞に対してアンジオクラインシグナルを放出して、組織の長期的維持に重要な役割を果たしている。血管の新生過程や長期維持の機序の分子細胞レベルでの解明は、個体の恒常性維持を解明あるいは増強させる意味において重要である。血管新生の過程では、先端細胞、茎細胞、ファランクス細胞という血管内皮細胞が現れて、新しく血管が形成されることが示されてきたが、既存の血管中の血管内皮細胞に幹細胞性を有する血管内皮細胞が存在することが示唆されてきており、今後血管新生を考える上でこの細胞の幹細胞性の維持調整機構の解明が必要である。また、血管の予備能の維持や血管の細胞の生存に、TGF $\beta$  activated kinase-1 (TAK1) の機能の重要性が明らかになりつつある。本稿では、筆者らが解析し報告してきた、血管内皮幹細胞画分の単離と、この細胞による長期血管の維持について、また、腸管内細菌によりマクロファージから分泌が誘導されるTNF $\alpha$ が血管の生存機構にいかに関わっているのかを紹介する。

### 2. 脈管形成と血管新生

血管形成は、受精卵から個体が形成されていく際に血管が誘導される脈管形成（血管発生）と、既存の血管から新しい血管が分岐して伸張する血管新生に大別される。脈管形成においては、中胚葉組織から分化した血管内皮細胞どうしが連結し、管腔を形成していくが、血管内皮細胞のみ

で形成される血管は脆弱であり、毛細血管や細静脈ではペリサイト（周皮細胞）、通常の静脈や動脈では血管平滑筋細胞（これらを合わせて壁細胞と呼ぶ）が血管内皮細胞の基底膜側から覆うことで構造的に安定した血管が形成される<sup>1)</sup>。

中胚葉から血管内皮細胞が発生する過程や、その後の血管内皮細胞の増殖・管腔形成は、vascular endothelial growth factor (VEGF) が中心となって、血管内皮細胞に発現するVEGF受容体2 (VEGFR2, Flk1とも呼ぶ) を活性化させることにより誘導される。VEGF (主にVEGF-A) はVEGFR2を活性化させsrcを起点とする細胞内シグナルにより、血管内皮細胞どうしを接着させるvascular endothelial (VE)-cadherinの細胞内領域をリン酸化させて細胞内に移行させるため、血管透過性が亢進する<sup>2)</sup>。しかし、生理的な血管形成では、このような透過性の亢進は抑制されている。血管形成の際には、血管内皮細胞からはplatelet derived growth factor (PDGF)-BBが放出され、血管内皮細胞の近傍に壁細胞の動員が誘導される。また、この壁細胞から分泌されるAngiopoietin-1は血管内皮細胞に発現するTie2受容体を活性化させ、VE-cadherinのリン酸化を抑制して、血管内皮細胞どうしの接着を誘導して、透過性の抑制された血管形成を誘導する。血管新生が生じている際に、Tie2の活性化シグナルが大きく入った内皮細胞では、apelinの分泌が増加する。Apelinは77個のアミノ酸として細胞外に放出され、最終的に酵素修飾を受けたC末端の13個のアミノ酸残基 (apelin13) が血管内皮細胞に発現するその受容体 (APJ; 7回膜貫通型のGタンパク質共役受容体) を活性化し、内皮細胞どうしの細胞集塊を大きくさせて、毛細血管レベルでの血管径を太くさせる<sup>3)</sup>。

従来、動脈と静脈の区別的な発生と、動静脈の境界の形成は、静脈内皮細胞に発現する受容体型チロシナーゼEphB4が、動脈内皮細胞に発現するその細胞膜結合型のリガンドであるephrinB2により刺激され、動脈静脈の双方向に反発し合う運動性を誘導することでもたらされるとされてきた。我々は、その他の機序として、動脈内皮細胞から分泌されるapelinが、静脈内皮細胞のAPJを活性させることで、secreted frizzled-related protein 1 (sFRP1) の発現を誘導し、sFRP1は動静脈の間に集合してきている好中球からマトリックス消化酵素 (主にMMP9) を誘導し、静脈の外側のコラーゲンを分解させること、そしてapelinがAPJ陽

大阪大学微生物病研究所情報伝達分野 (〒560-0871 大阪府吹田市山田丘3-1)

**Identification of endothelial stem cell population and mechanism of vascular remodeling and angiogenesis**

**Nobuyuki Takakura** (Department of Signal Transduction, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamada-oka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920453

© 2020 公益社団法人日本生化学会

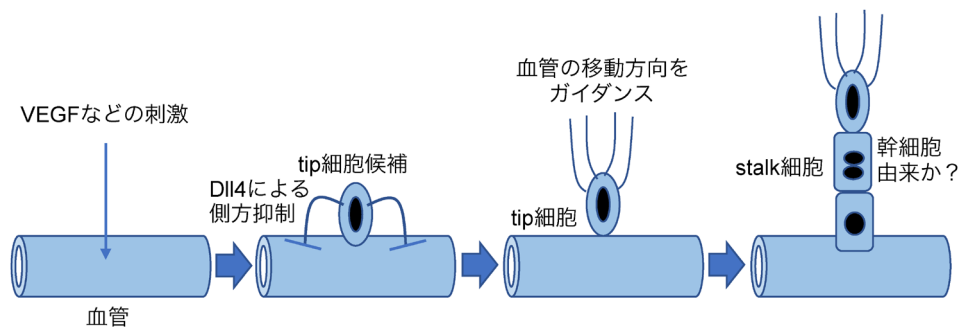


図1 血管新生の機序の概要  
内容は本文参照.

性の静脈の血管束移動（管腔を維持したままの血管の側方移動）を誘導して，動静脈の近接性が誘導されていることを発見している<sup>4)</sup>。

### 3. 血管新生の時期に現れる茎（stalk）細胞とは何者か？

すでに動静脈から毛細血管による血管の階層的な支配が体内で形成されたのちにおいては，組織の増大や，組織の炎症や低酸素に適應するために，既存の血管から新しい血管が血管新生の過程により生じる。この過程では，まず密接に接着していた血管壁細胞の内皮細胞からの離脱が生じる。Tie2受容体の脱リン酸化がAngiopoietin-1のアンタゴニストであるAngiopoietin-2により誘導されて，壁細胞が離脱すると考えられているが，これはまだ，血管内皮細胞と壁細胞の接着の詳細なメカニズムが不明瞭であることから，遺伝子改変マウスの表現型などから類推された機能という段階で研究が止まっている。

壁細胞離脱の生じた領域から，新しい血管が発芽して伸張する。これは，炎症や低酸素組織から分泌されるVEGFが既存の血管内皮細胞を刺激することで生じる。すべての血管内皮細胞が移動を始めるわけにはいかないので，血管の分岐の先端を移動するいわゆる先端（tip）細胞の候補がVEGFによって誘導される<sup>5)</sup>。つまり，既存の血管の内皮細胞の中でVEGFの影響を強く受けた細胞は，Notchのリガンドであるdelta like protein 4 (Dll4) を分泌する。Dll4は先端細胞候補の横の血管内皮細胞のNotchを活性化させることで，Notchの下流でSox17の発現を誘導させる。Sox17はVEGFRの発現維持に関わる転写因子であり，Notchの活性化した内皮細胞はVEGF不応性となって，先端細胞とならずに，移動が抑制される<sup>6)</sup>。

先端細胞は細胞表面に多くの糸状仮足（filopodia）を発現し，低酸素領域などに血管の分岐方向をガイダンスしていくが，その後方に増殖活性の高い血管内皮細胞が先端細胞に密着して同時に移動していく。このような増殖性の高

い血管内皮細胞を茎（stalk）細胞と呼ぶが，この細胞が何に由来しているのかは不明であった。筆者らは，既存の血管の中に，定常状態では非増殖性であるものの，低酸素などの刺激により活性化して，果敢な増殖性を示すような，いわゆる血管内皮幹細胞のような細胞が存在するのではないかと考えてきた（図1）。

一般的に，いずれの組織においても，多剤排出トランスポーターを発現することにより薬剤耐性を有するというのが，組織幹細胞の共通性であることが示唆されている。そこで，ヘキストというDNA染色色素を用いて，たとえば下肢の筋肉内の血管内皮細胞を染色すると，血管内皮細胞全体中1%程度の割合で，ヘキストに染色されないside population (SP) 細胞が存在した。そして，これらの細胞のうち約1割の細胞は，1個の細胞からきわめて多くの血管内皮細胞を産生する能力を有することが判明した<sup>7)</sup>。

血管内皮SP細胞はどのような臓器にも存在しており，たとえば大腿動脈を結紮除去する下肢虚血モデルにおいては，下肢筋肉内の血管内皮SP細胞だけの移植でも，長期にわたって維持可能な新たな血管が誘導される。また，モノクローリンを用いた類洞血管を障害させるモデルでも，肝臓内の血管内皮SP細胞を移植すると，類洞血管のみでなく，肝静脈や門脈の血管内皮細胞として，新しい血管ユニットが長期にわたって形成される。このSP細胞は血管壁細胞には分化しないことから，いわゆる胎児期に観察されるような血管系の前駆細胞とは異なり，血管内皮細胞に分化コミットメントしているが，増殖的な観点で幹細胞性を有していると考えられた（図2）。

### 4. 血管内皮細胞の分化の階層性

先の血管内皮SP細胞は，1個の細胞移植によっても長期的な血管構築に参加できる。そして，移植後数か月後において，多くはSP細胞からヘキストを取り込むタイプのmain population (MP) 細胞に分化するが，SP細胞としても維持されている細胞が存在することから，血管内皮SP

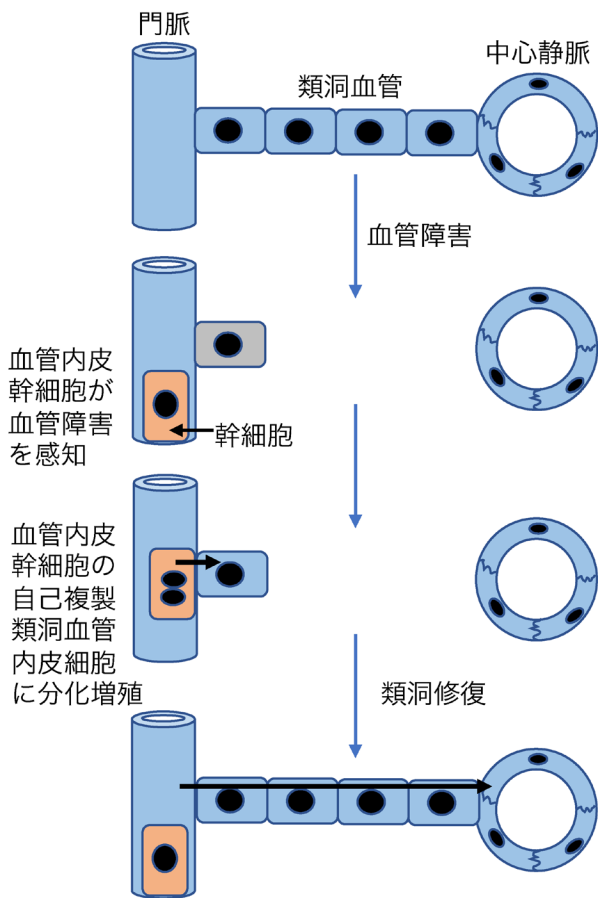


図2 肝臓内血管内皮幹細胞による類洞血管の修復  
どの臓器にも血管内皮幹細胞様の細胞は存在し、臓器特異的な血管形成に関わると考えられる。

細胞は自己複製による細胞数の維持と、MP細胞への分化が両立していると考えられる。このようなSP細胞からMP細胞への分化は一種の階層性とも呼べるが、薬剤排出能というのは細胞の状況に応じた細胞の解析法にすぎず、真の階層性を証明するためには、特定のマーカーにより単離した、血管内皮細胞からの分化系譜を証明する必要がある。

そこで、筆者らは血管内皮細胞のSP細胞画分とMP細胞画分の遺伝子の発現をマイクロアレイにより解析し、CD157とCD200がSP細胞画分で高いことを見いだした<sup>8)</sup>。もちろん、この解析では、SP、MP細胞集団全体としての遺伝子の発現を解析しているものであり、SP細胞であるからCD157とCD200がすべての細胞で発現が高いとは限らない。そこで、細胞表面抗原に対する抗体を用いて、たとえば肝臓内の血管内皮細胞を解析するとCD157とCD200をともに発現する細胞は数%、CD157陰性でCD200陽性細胞が20%程度、そして、CD157陽性CD200陰性という細胞は存在せず、残りはCD157もCD200も陰性であった。OP9というストロマ細胞を用いた試験管内培養実験と、前述のモノクローリン誘導性の肝障害モデルを用いて、

CD157陽性CD200陽性の血管内皮細胞は幹細胞性を有し、この細胞は1個の細胞でも大量の血管内皮細胞を産生する能力があり、その分化はCD157陰性CD200陽性、CD157陰性CD200陰性へと進んでいき、CD157陰性CD200陰性になった血管内皮細胞はすでに分裂能がなくなった終末分化した血管内皮細胞となることが判明した(図2)。

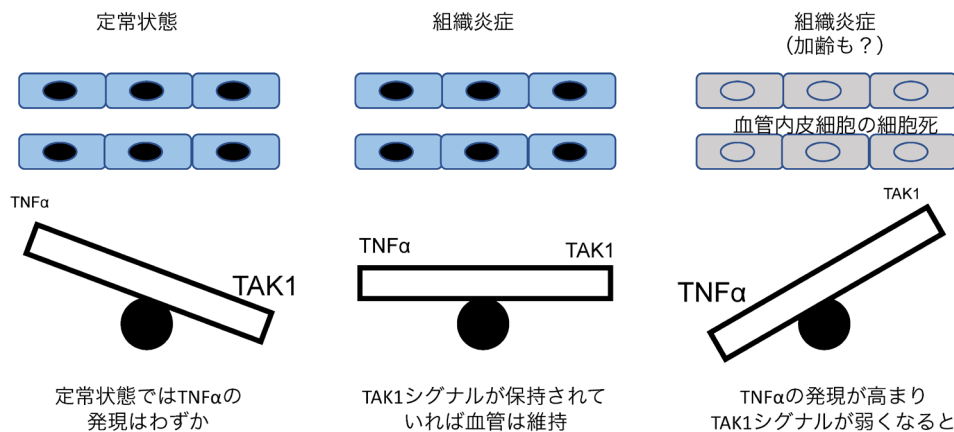
たとえば、CD157陽性の血管内皮細胞は、肝臓では動脈血管内皮細胞内にも観察されるが、門脈領域に多く、この細胞にGFPをラベルして分化を追跡すると、門脈から類洞血管領域に分岐したGFP陽性細胞は、中心静脈に向かって増殖分裂して、類洞血管を維持させることが判明した。

CD157陽性の血管内皮細胞は、どのような臓器にも観察されており、ある一定の割合で各臓器に存在する<sup>9)</sup>。これらの血管内皮細胞は共通して試験管内での血管内皮細胞の産生能が高く、各臓器に備わる血管予備能に関連する血管内皮幹細胞画分ではないかと考えられる。このような細胞の幹細胞性や、幹細胞性維持の機序が明確になることで、血管内皮幹細胞を階層性の頂点とした血管の長期維持のメカニズムが明らかになると考えられる。

## 5. 血管の長期的な生存を誘導する機構

血管内皮細胞のターンオーバーは比較的長いとされているが、たとえば、皮膚の毛細血管においては加齢により徐々に短縮していることから、血管内皮細胞は細胞死により徐々に減少していると考えられている<sup>10)</sup>。また、脳においても、動脈の短縮は観察されていないが、毛細血管の密度が低下し、それによる血流量の低下、神経細胞死も観察されている<sup>11)</sup>。このように、我々の個体内では、何らかの血管内環境因子により常に血管内皮細胞死が誘導されようとしているが、それに対峙して生存し続けているのではないかと考えられる。近年、加齢による腸内細菌叢の異常が、腸管内での炎症を誘導し、それが全身性に波及して慢性的な組織炎症・障害を誘導している可能性が示唆されてきている<sup>12)</sup>。そこで、我々は炎症の中心的な役割を果たす、tumor necrotizing factor (TNF)  $\alpha$ に着目し、この分子による血管の維持・破綻を解析した。

マウスを用いた解析では、TNF $\alpha$ の発現は若年マウスにおいては、腸管の絨毛粘膜のマクロファージ以外では分泌している細胞が観察されなかった<sup>13)</sup>。一方で、抗生剤を長期投与して、腸内細菌叢を減少させると、TNF $\alpha$ の発現も減弱することから、腸内細菌がマクロファージにおけるTNF $\alpha$ の発現を誘導しているものと考えられた。一方で、TNF $\alpha$ はcaspaseの発現誘導などで細胞死を誘導する作用をもたらすが、若年マウスの腸管において、絨毛粘膜のマクロファージに近接して存在する血管において、内皮細



**図3** 組織炎症と血管内皮細胞の細胞死の抑制  
炎症などで、TNF $\alpha$ 発現が高まっても、TAK1シグナルが維持されていれば、血管内皮細胞の細胞死は防御される。何らかの要因でTAK1シグナルが減弱すると血管内皮細胞の細胞死が誘導される。

胞の細胞死が誘導されているわけではなかった。TNF $\alpha$ は caspaseによる細胞死を誘導するのとは相反して、TGF $\beta$  activated kinase 1 (TAK1) からのシグナルによりNF $\kappa$ Bを活性化させ、c-FLIPの発現誘導などにより caspaseの発現を抑制して、細胞死を抑制する作用も有する。そこで、TAK1の発現をVE-cadherin 遺伝子のプロモーター制御下で欠損させる条件つきノックアウトマウスを作製して解析したところ、血管内皮細胞においてTAK1が欠損すると、たちまち若年マウスにおいても血管内皮細胞に細胞死が誘導されて、絨毛毛細血管の多くが欠損するようになる。興味深いことに、小腸絨毛の毛細血管で血管の破綻が生じると、その近傍臓器のマクロファージにおいてTNF $\alpha$ の産生が増強し、おそらく血管透過性の亢進作用が誘導されて、最も近接に存在する肝臓内の類洞血管周囲にまで炎症が波及して、この類洞血管周囲のマクロファージにおけるTNF $\alpha$ の産生が誘導されて、類洞血管の血管内皮細胞においても細胞死が誘導されていくことが観察された(図3)。

本遺伝子欠損マウスは、TAK1の発現抑制を誘導したのち、ほぼ10日で致死となるために、肝臓における血管障害は観察されたものの、それより遠隔臓器での血管障害は観察されていない。腸管細菌叢異常は全身的な組織炎症へと波及していくことを証明するために、たとえば、TAK1発現抑制を部分的に小腸で誘導することで、血管障害を軽減させたようなマウスモデルを作製することで、マウスを延命させて、遠隔臓器への炎症を観察することが必要であると考えられた。

## 6. まとめ

本稿では、血管発生から成体における血管の維持機構について、血管内皮幹細胞による血管予備能の維持、そして加齢による炎症の波及から血管内皮細胞死を抑制する分子

実体としてのTAK1について我々の最近の研究成果をもとに解説した。血管内皮幹細胞様の細胞の存在はこれまで明確ではなかったが、近年、他の研究グループも我々と類似した研究成果を報告してきており<sup>14)</sup>、また、血管平滑筋細胞に旺盛に分裂・分化する壁細胞幹細胞様細胞も報告されてきており<sup>15)</sup>、今後、血管生物医学の中で、血管幹細胞に注目した血管形成のメカニズムの解析が進んでくると考えられる。また後半の、炎症の波及による血管の破綻作用においても、腸-脳、膵臓-脳の血管を介した臓器連環が報告されてきており、血管の破綻と臓器維持についてもさらに明らかにされていくことが期待される。

## 謝辞

本研究成果を得るためにご協力いただいた多くの研究者に感謝を申し上げます。

## 文 献

- 1) Augustin, H.G., Koh, G.Y., Thurston, G., & Alitalo, K. (2009) Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 165–177.
- 2) Gavard, J., Patel, V., & Gutkind, J.S. (2008) Angiopoietin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability by sequestering Src through mDia. *Dev. Cell*, **14**, 25–36.
- 3) Kidoya, H., Ueno, M., Yamada, Y., Mochizuki, N., Nakata, M., Yano, T., Fujii, R., & Takakura, N. (2008) Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J.*, **27**, 522–534.
- 4) Kidoya, H., Naito, H., Muramatsu, F., Yamakawa, D., Jia, W., Ikawa, M., Sonobe, T., Tsuchimochi, H., Shirai, M., Adams, R.H., et al. (2016) APJ regulates parallel alignment of arteries and veins in the skin. *Dev. Cell*, **33**, 247–259.
- 5) Phng, L.K. & Gerhardt, H. (2009) Angiogenesis: A team effort coordinated by notch. *Dev. Cell*, **16**, 196–208.
- 6) Yang, H., Lee, S., Lee, S., Kim, K., Yang, Y., Kim, J.H., Adams, R.H., Wells, J.M., Morrison, S.J., Koh, G.Y., et al. (2013) Sox17

- promotes tumor angiogenesis and destabilizes tumor vessels in mice. *J. Clin. Invest.*, **123**, 418–431.
- 7) Naito, H., Kidoya, H., Sakimoto, S., Wakabayashi, T., & Takakura, N. (2012) Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels. *EMBO J.*, **31**, 842–855.
  - 8) Wakabayashi, T., Naito, H., Suehiro, J.I., Lin, Y., Kawaji, H., Iba, T., Kouno, T., Ishikawa-Kato, S., Furuno, M., Takara, K., et al. (2018) CD157 marks tissue-resident endothelial stem cells with homeostatic and regenerative properties. *Cell Stem Cell*, **22**, 384–397.
  - 9) Naito, H., Wakabayashi, T., Ishida, M., Gil, C.H., Iba, T., Rahmawati, F.N., Shimizu, S., Yoder, M.C., & Takakura, N. (2020) Isolation of tissue-resident vascular endothelial stem cells from mouse liver. *Nat. Protoc.*, **15**, 1066–1081.
  - 10) Kajiya, K., Bise, R., Commerford, C., Sato, I., Yamashita, T., & Detmar, M. (2018) Light-sheet microscopy reveals site-specific 3-dimensional patterns of the cutaneous vasculature and pronounced rarefaction in aged skin. *J. Dermatol. Sci.*, **92**, 3–5.
  - 11) Li, Y., Choi, W.J., Wei, W., Song, S., Zhang, Q., Liu, J., & Wang, R.K. (2018) Aging-associated changes in cerebral vasculature and blood flow as determined by quantitative optical coherence tomography angiography. *Neurobiol. Aging*, **70**, 148–159.
  - 12) Thevaranjan, N., Puchta, A., Schulz, C., Naidoo, A., Szamosi, J.C., Verschoor, C.P., Loukov, D., Schenck, L.P., Jury, J., Foley, K.P., et al. (2017) Age-associated microbial dysbiosis promotes intestinal permeability, systemic inflammation, and macrophage dysfunction. *Cell Host Microbe*, **21**, 455–466.
  - 13) Naito, H., Iba, T., Wakabayashi, T., Tai-Nagara, I., Suehiro, J.I., Jia, W., Eino, D., Sakimoto, S., Muramatsu, F., Kidoya, H., et al. (2019) TAK1 prevents endothelial apoptosis and maintains vascular integrity. *Dev. Cell*, **48**, 151–166.
  - 14) Singhal, M., Liu, X., Inverso, D., Jiang, K., Dai, J., He, H., Bartels, S., Li, W., Abdul Pari, A.A., Gengenbacher, N., et al. (2018) Endothelial cell fitness dictates the source of regenerating liver vasculature. *J. Exp. Med.*, **215**, 2497–2508.
  - 15) Tang, J., Wang, H., Huang, X., Li, F., Zhu, H., Li, Y., He, L., Zhang, H., Pu, W., Liu, K., et al. (2020) Arterial Sca1<sup>+</sup> vascular stem cells generate *de novo* smooth muscle for artery repair and regeneration. *Cell Stem Cell*, **26**, 81–96.

#### 著者寸描

##### ●高倉 伸幸 (たかくら のぶゆき)

大阪大学微生物病研究所教授。医学博士。

■略歴 1988年三重大学医学部卒業。1997年京都大学大学院医学研究科博士課程修了。2001年金沢大学がん研究所教授。06年より現職。

■研究テーマと抱負 血管形成の機序を解明し、虚血疾患や腫瘍など血管病といわれる疾患の治療に応用させていきたい。特に、血管内皮幹細胞から血管内皮細胞への分化階層性を明らかにしたい。

■ウェブサイト <http://st.biken.osaka-u.ac.jp/>