

## 組織常在性線維芽細胞は新生血管の内皮細胞に分化する

## Fibroblasts Resident in the Tissue Transform into Vascular Endothelial Cells of Newly-formed Blood Vessels

藤原 隆<sup>a</sup>, 昆 和典<sup>b</sup>, 樅木 勝巳<sup>c</sup>, 大沼 俊名<sup>a</sup>

Takashi Fujiwara, Kazunori Kon, Katsumi Mominoki and Toshina Oonuma

<sup>a</sup>愛媛大学総合科学研究支援センター生物資源分野<sup>b</sup>愛媛県立大学保健科学部臨床検査学科<sup>c</sup>岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門

**要旨** 血管新生は重要な生命現象であるが、その機序や新生血管の内皮細胞の由来については必ずしも明らかではない。我々は結合組織常在性線維芽細胞の血管内皮細胞への分化転換について検討した。ウサギ皮下組織の細胞を培養し、<sup>3</sup>H-チミジン等種々の方法で標識し、耳窓に自家移植したところ、新生血管内皮細胞に標識が観察された。しかし、皮下組織の培養細胞には血管内皮細胞の混入の可能性があり、また標識物が移動する可能性もあるので、遺伝子組換えマウスの角膜を移植に用いた。Flk1-lacZ マウスの角膜基質の培養細胞を野生型の担癌マウスの尾静脈から移植、あるいは Tie2-GFP マウスの角膜基質移植片を野生型マウスの角膜に移植したところ、新生血管に lacZ あるいは GFP の発現が観察された。これらの結果から組織常在性線維芽細胞は新生血管の内側又は外側から血管内皮に入り込み、血管内皮細胞に分化転換することが明らかになった。

キーワード：血管新生、血管内皮細胞、線維芽細胞

## 1. はじめに

血管新生は、個体発生時や成体の成長、創傷治癒、癌増殖時等に見られる重要な生命現象である。このため血管新生に関する研究、中でも血管新生の機序と血管内皮細胞の由来に関する研究は非常に多い。機序については、約10年前までは既存血管の内皮細胞の分裂、遊走、出芽等による出芽法が広く認められ<sup>1,2)</sup>、内皮細胞の由来については「血管の内皮細胞は既存血管の内皮細胞から生じる」と信じられてきた。しかし、1996年、野一色等により骨髄に血管内皮前駆細胞の存在が示唆され<sup>3)</sup>、翌年、浅原等により末梢血から血管内皮前駆細胞が分離されたことから<sup>4)</sup>、血管新生機序は出芽法のみによるものでなく、内皮細胞は既存血管のみに由来するものでないことが明らかになった。さらに真皮<sup>5)</sup>の Mesenchymal stem cells (MSCs) が内皮細胞の抗原性を示すことや吸引した脂肪組織の細胞 (Processed lipoaspirate cells あるいは Adipose-derived stem cells (ASCs) 等と呼ばれる。) が内皮細胞の表面抗原を発現したり<sup>6)</sup>、内皮細胞への分化能を有

すること<sup>7-9)</sup>等が報告されるに至り、出芽法は見直しが必要になった。また、内皮細胞の由来については、骨髄や真皮、脂肪組織等色々な組織の可能性が示唆されているが、真皮や脂肪組織は多種類の細胞を含んでいるので、これらの組織のどの細胞が内皮細胞に分化するかは必ずしも明らかとは言えない。

筆者等は、血管内皮前駆細胞の発見より前から線維芽細胞に着目して血管新生の研究を行ってきた。線維芽細胞は真皮の結合組織をはじめ体内の至る所の結合組織中に広く分布する細胞である。本稿では、血管新生の研究に常用されるラビットイヤーチャンパー (REC) やマウス角膜法を用いて得られた実験結果に基づいて血管内皮細胞の由来と血管新生機序について検討した結果を中心に述べることにする。

## 2. REC における血管新生の形態的研究

## 2.1 新生血管の透過型電子顕微鏡観察

REC で伸長する新生血管を透過型電子顕微鏡で観察すると、開放性血管のように内皮に孔があり、そこから赤血球が血管外に漏出する像が希に認められた (図 1A)。また、100 μM トリフルオロプラジンで細胞膜が細胞質内に落ち込むように加工した赤血球を耳介動脈から灌流し、透過型電子顕微鏡で観察したところ、不連続な細胞により取り囲まれる内方陥没型赤血球が観察された (図 1B)<sup>10)</sup>。加工赤血球を囲むこの細胞は粗面小胞体が良く発達し、線維芽細胞の形態的

<sup>a</sup> 〒791-0295 愛媛県東温市志津川  
TEL: 089-960-5445; FAX: 089-960-5447  
E-mail: tfujiwar@m.ehime-u.ac.jp

<sup>b</sup> 〒791-2101 愛媛県伊予郡砥部町高尾田 543 番地

<sup>c</sup> 〒700-8558 岡山市鹿田町 2-5-1

2008年2月11日受付

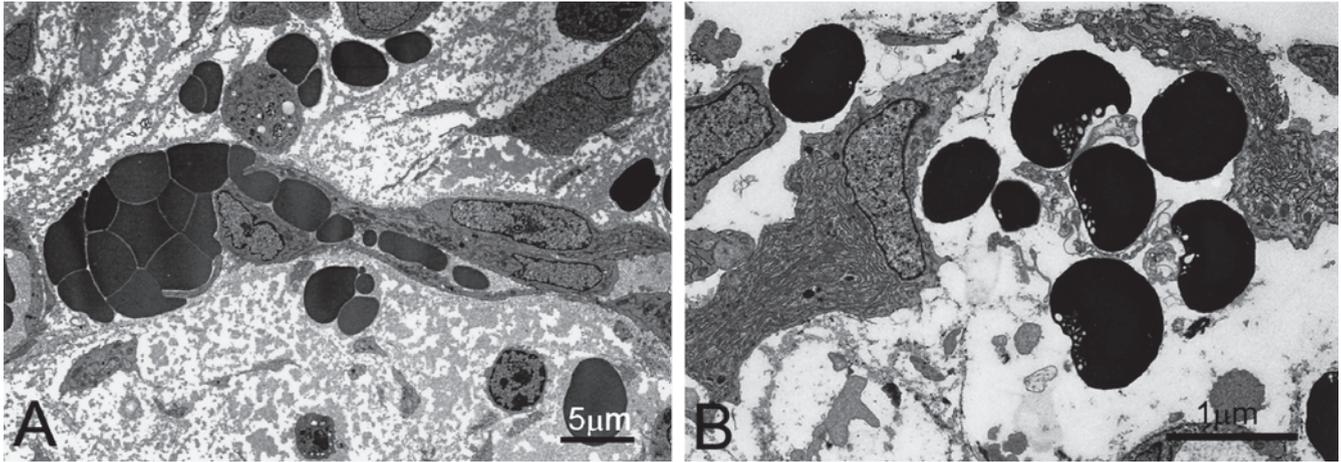


図1 RECの中を成長する新生血管の透過型電子顕微鏡像。A. 血管先端。内皮の孔から赤血球が漏出している。B. 線維芽細胞様の内皮細胞。この細胞は動脈から灌流された加工赤血球を取り囲むので、血管内皮細胞と見なし得る。粗面小胞体が著しく発達しており、線維芽細胞との類似性を示唆する。

特徴を備えていた。このような構造は、Rhodin等のconnective tissue channel<sup>2)</sup>に相当するものと思われた。これらの観察結果から、結合組織に常在する線維芽細胞が血管から漏出した赤血球を取り囲み、これがそのまま血管内皮細胞に分化するのではないかと、すなわち組織常在性線維芽細胞が付加することにより血管が伸長するのではないかと推察された。

## 2.2 皮下組織の線維芽細胞の標識

線維芽細胞から血管内皮細胞への分化を検証するために、ウサギ耳介皮下組織の線維芽細胞を培養した。この培養細胞にラテックスビーズや墨汁<sup>11)</sup>あるいはトリチウムチミジン

を別々に取り込ませて標識した。標識細胞を装着2日目のRECに自家移植し、数日後に新生血管を固定したところ細胞質にラテックスビーズや墨汁粒子を含む内皮細胞が透過型電子顕微鏡により観察された(図2)。標識された内皮細胞は、隣接細胞と密に結合し、また周皮細胞により取巻かれていた。

ラテックスビーズや墨汁で標識された内皮細胞を透過型電子顕微鏡により観察するのは容易ではない。一方、光学顕微鏡で標識内皮細胞を見つけるのは困難ではないが、解像力不足のため標識と細胞内小器官との識別に不確かさが残る。そこで墨汁で標識した血管内皮細胞のエポソニウム超薄切片を光学

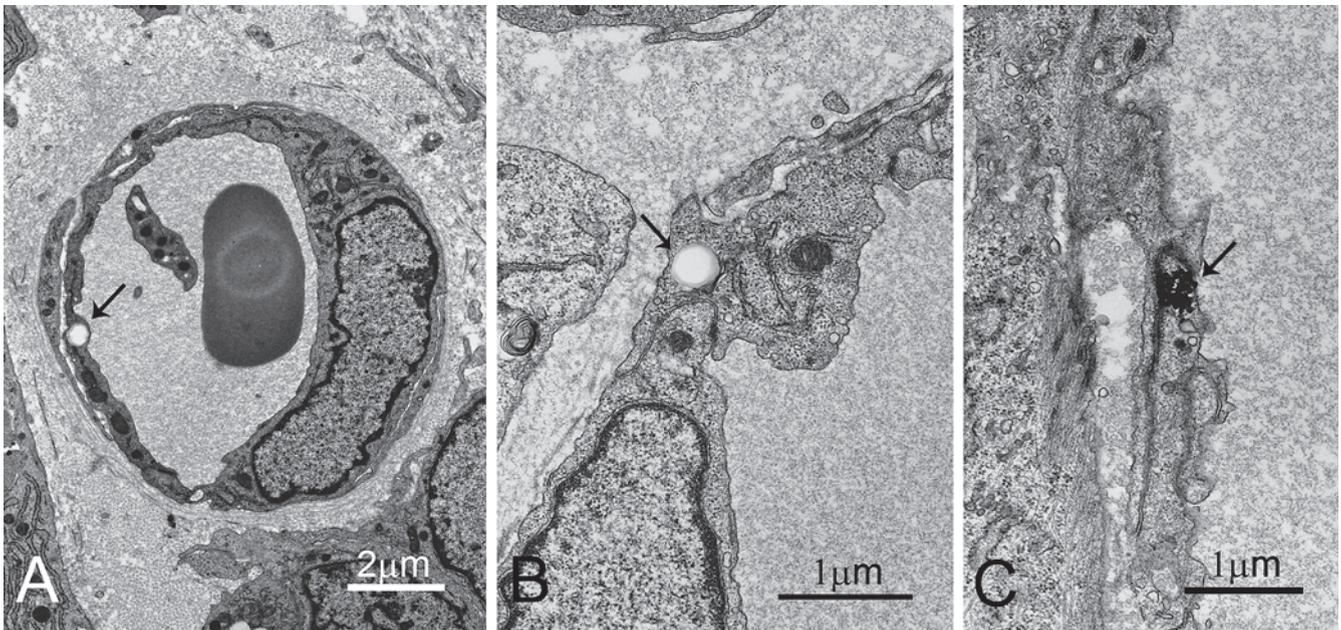


図2 ラテックスビーズ(A, B)または墨汁(C)で標識された新生血管内皮細胞の透過型電子顕微鏡像。ウサギ皮下組織の線維芽細胞をラテックスビーズあるいは墨汁で標識した後、RECに自家移植した。A. 内皮細胞の細胞質にビーズ(矢印)が観察できる。B. ビーズ(矢印)を有する内皮細胞は隣接の内皮細胞と結合している。C. 墨汁粒子(矢印)を含む内皮細胞。標識された内皮細胞は皮下組織の線維芽細胞に由来することを示唆する。

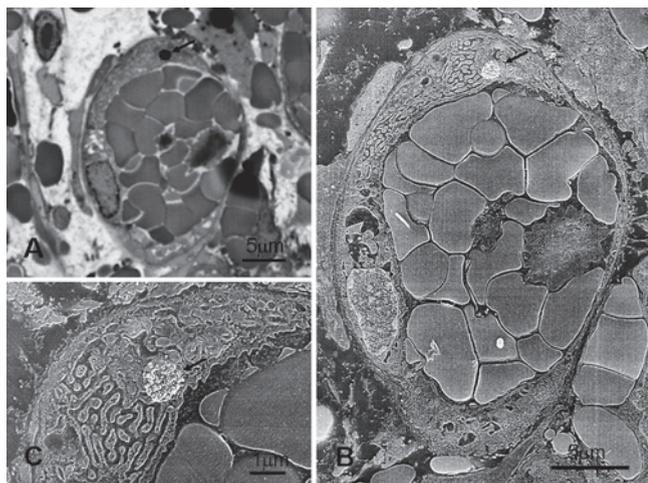


図3 墨汁粒子の観察。ウサギ皮下組織の線維芽細胞を培養し、墨汁で標識した後、RECに自家移植した。A. 新生血管のエポソニ準超薄切片の光学顕微鏡像。BとC. Aの切片の走査型電子顕微鏡像。Aのエポソニ準超薄切片にイオンエッチングを施した後、観察した。矢印は墨汁粒子と思われる構造を示す。

顕微鏡で撮影した後、イオンエッチングを施し、走査型電子顕微鏡で観察した(図3)。光学顕微鏡像と同じ位置に微小な粒子の集合が観察できた。この様な粒子は走査型電子顕微鏡のX線元素分析により炭素(墨汁)であることが示され<sup>12)</sup>、この細胞は培養線維芽細胞に由来することが示唆された。

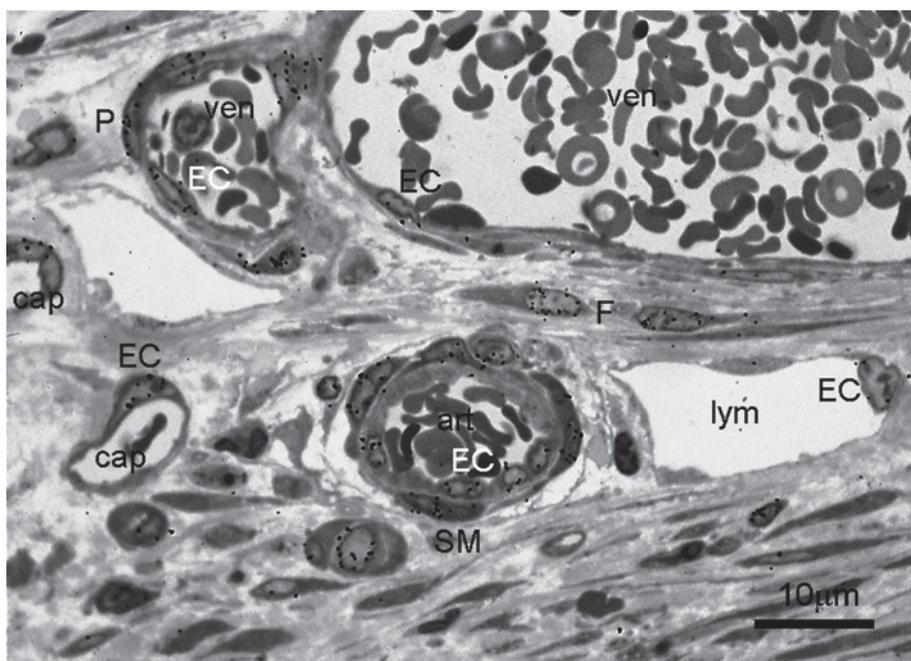


図4 トリチウムチミジンを用いたオートラジオグラフィ。ウサギ皮下組織の線維芽細胞を培養し、これにトリチウムチミジンを取り込ませて、RECに自家移植した。細動脈(art)の内皮細胞(EC)と平滑筋細胞(SM)、細静脈(ven)の内皮細胞(EC)と周皮細胞(P)、毛細血管(cap)の内皮細胞(EC)と周皮細胞(P)、毛細リンパ管(lym)の内皮細胞(EC)のそれぞれの核に銀粒子が明瞭に認められる。線維芽細胞(F)の核にも銀粒子が認められる。標識された内皮細胞や平滑筋細胞、周皮細胞等は培養線維芽細胞に由来することを示唆している。

トリチウムチミジンを培養線維芽細胞に取り込ませて行ったオートラジオグラフィでは細動脈、毛細血管、細静脈及びリンパ管の内皮細胞、細動脈の平滑筋細胞、毛細血管及び細静脈の周皮細胞等のそれぞれの核に銀粒子が観察された<sup>13)</sup>。血管内皮細胞の核は66.8%、線維芽細胞の核は55.9%が銀粒子を持っていた。

ラテックスビーズや墨汁、トリチウムチミジン等の取り込み実験から新生血管内皮の標識細胞は移植した線維芽細胞に由来すると考えられた。しかし、骨髄細胞はES細胞と一緒に培養すると融合し、ES細胞様の全能性幹細胞に分化転換したかのように見えることがあるので、細胞の移植実験においては移植した細胞が組織の細胞に変化したと見なすのは危険であると指摘する報告がある<sup>14)</sup>。筆者等の実験では、標識された内皮細胞の大きさから、その恐れがないことは明確である。しかし、内皮細胞には貪食能があるので<sup>15)</sup>、ラテックスビーズや墨汁粒子が線維芽細胞から外に出た場合、血管内皮細胞がそれを貪食する可能性や線維芽細胞のラジオアイソトープを血管内皮細胞が取り込む可能性等は完全に否定できない。そこで別の細胞標識法を用いることとした。

### 3. マウスにおける血管新生の形態的研究

#### 3.1 皮下組織の線維芽細胞の標識実験

マウスは近交系が確立されているので自家移植の必要性が無く、また発色遺伝子を組み込んだマウスが揃っているため、移植実験や細胞分化の解析には適している。

まず、標識が細胞間を移行しない細胞膜の蛍光染色法を用いた。マウス皮下組織を培養し、PKH26 蛍光色素で染色した後、同系統のマウス角膜ポケットに移植し、硝酸銀焼灼で血管新生を誘発した。血管新生の後、切片を観察すると血管内皮細胞に一致して蛍光が認められた（図5）。この結果からウサギで報告した<sup>13)</sup> 皮下組織線維芽細胞の血管内皮細胞への分化がマウスにおいても確認できた。しかし、皮下組織の培養細胞には線維芽細胞の他、微小血管の内皮細胞、微小血管内の血管内皮前駆細胞、脂肪細胞等の混入が否定できない。そこで線維芽細胞の単一組織である角膜基質を用いることにした。

### 3.2 角膜基質の線維芽細胞を用いた実験

血管内皮細胞特異的マーカーである Flk1 のプロモーターに lacZ 遺伝子を結合させたマウスの角膜基質細胞を培養し、この培養細胞を肉腫移植により血管新生を誘発した同系統の野生型マウスの尾静脈から注入、移植した。3日後に固定し、X-Gal 染色を行った後、パラフィン切片を作製した。血管内皮細胞に lacZ 遺伝子産物の青緑色の粒子が観察された（図6）。粒子を有する血管の割合は16.0%であった。

次に、GFP 遺伝子を Tie2 遺伝子のプロモーターに結合したマウスを用いた。マウスの角膜基質を摘出し、同系統の野生型マウスの角膜ポケットに移植した。移植片の着生後、硝酸銀焼灼により血管新生を誘導し、その3日後に観察したところ、新生血管内皮の所々に GFP の蛍光が認められた（図7）。

さらに線維芽細胞が *in vitro* で血管内皮細胞に分化するかどうかについて検討した。Tie2-GFP マウスの角膜基質細胞を、血管新生を惹起した組織の抽出液を入れた培養液で培養したところ GFP 蛍光を発する細胞が観察された。

以上、線維芽細胞の純粋な組織である角膜基質を用いた実

験により、組織常在性線維芽細胞は血管内皮細胞に分化することが明らかになった。

この実験結果とこれまでの報告を総合すると、新生血管内皮細胞の由来については、1) 既存血管の内皮細胞、2) 血管内皮前駆細胞、3) MSCs、4) ASCs 及び5) 組織常在性線維芽細胞の5種類の細胞が考えられる。また、血管新生機

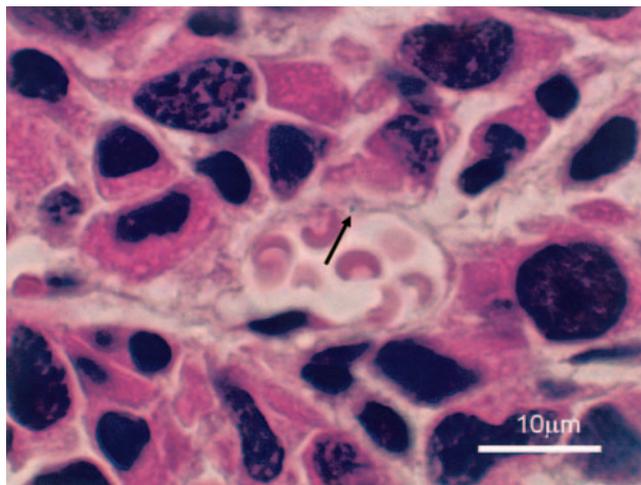


図6 X-Gal 陽性の血管内皮細胞. Flk1-lacZ マウスの角膜基質細胞を培養し、これを、角膜に腫瘍細胞を植え付けて血管新生を誘導した同系統の野生型マウスの尾静脈から移植した。Flk1-lacZ マウスの lacZ は血管内皮細胞においてのみ発現するので、X-Gal 陽性の細胞は角膜基質細胞、すなわち線維芽細胞に由来する血管内皮細胞であることを示唆している。

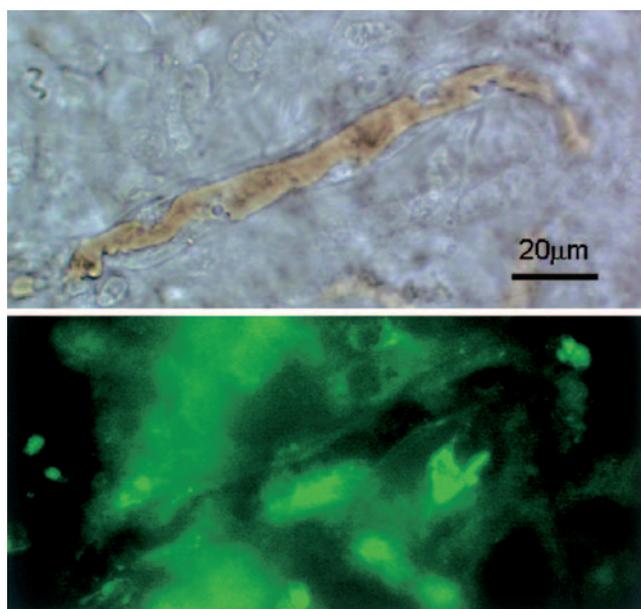


図7 GFP 陽性の血管内皮細胞. Tie2-GFP マウスの角膜基質の組織片を同系統の野生型マウスの角膜に移植し、移植片の着生後に硝酸銀焼灼により血管新生を誘導した。新生血管内皮細胞（上）の幾つかが蛍光を発している（下）。蛍光を発する細胞は角膜基質細胞、すなわち線維芽細胞に由来する血管内皮細胞であることを示唆している。

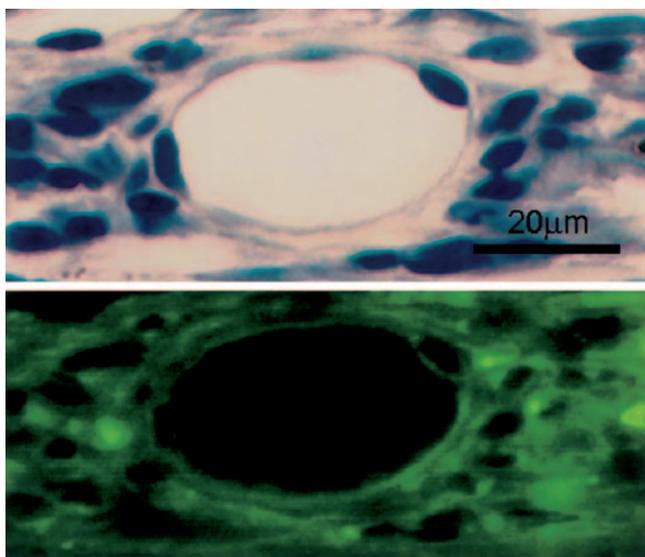


図5 マウス角膜の新生血管内皮細胞. マウス皮下の培養線維芽細胞を蛍光色素で染色し、同系マウスの角膜に移植した。線状の内皮に沿って（上）、蛍光が認められる（下）。蛍光を発する内皮細胞は培養線維芽細胞に由来することを示唆する。

序については、内皮細胞の由来の違いや移植法の違い、すなわち静脈からの注入あるいは角膜への移植等を考えると、1) 1 番目の既存血管内皮細胞は血管内皮において分裂、遊走して新生血管内皮に入る、後 4 者は新生血管の孔<sup>16)</sup>を塞ぐように、また漏出した血液を囲むように血管の 2) 内側からあるいは 3) 外側から血管内皮に入るという 3 通りの方法が考えられる。

#### 4. おわりに

動脈硬化症や虚血性疾患等の疾患では血管の再生医療が現実のものとなりつつある。再生医療に必要な細胞の入手元として、容易さから脂肪組織が注目され、多くの研究が行われている。筆者らは皮下組織等に広く常在する線維芽細胞が血管の再生医療のために活用できることを示した。しかし、基礎医学的に重要な、線維芽細胞の血管内皮への加入の機序に関する形態的研究や線維芽細胞の血管内皮細胞への分化に関わる因子の生化学的解析等については今後の課題である。

#### 謝 辞

本研究は、科学研究費補助金 (TF), 一般研究 (C) (03807152, 04807164, 07833007), 萌芽的研究 (10877285) 及び基盤研究 (C) (16591260, 18591416) の援助を得て行われた。

#### 文 献

- 1) Furcht, L.T.: *Lab. Invest.*, **55**, 505–509 (1986)
- 2) Rhodin, J.A.G. and Fujita, H.: *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **21**, 1–34 (1989)
- 3) Noishiki, Y., Tomizawa, Y., Yamane, Y. and Matsumoto, A.: *Nat. Med.*, **2**, 90–93 (1996)
- 4) Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G. and Isner, J.M.: *Science*, **275**, 964–967 (1997)
- 5) Young, H.E., Steele, T.A., Bray, R.A., Hudson, J., Floyd, J.A., Hawkins, K., Thomas, K., Austin, T., Edwards, C., Cuzzourt, J., Duenzl, M., Lucas P.A. and Black, A.C. Jr.: *Anat. Rec.*, **264**, 51–62 (2001)
- 6) Martínez-Estrada, O.M., Muñoz-Santos, Y., Julve, J., Reina, M. and Vilaró, S.: *Cardiovasc. Res.*, **65**, 328–333 (2005)
- 7) Miranville, A., Heeschen, C., Sengenès, C., Curat, C.A., Busse, R. and Bouloumié, A.: *Circulation*, **110**, 349–355 (2004)
- 8) Planat-Benard, V., Silvestre, J.S., Cousin, B., André, M., Nibbelink, M., Tamarat, R., Clergue, M., Manneville, C., Saillan-Barreau, C., Duriez, M., Tedgui, A., Levy, B., Pénicaud, L. and Casteilla, L.: *Circulation*, **109**, 656–663 (2004)
- 9) Cao, Y., Sun, Z., Liao, L., Meng, Y., Han, Q. and Zhao, R.C.: *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **332**, 370–379 (2005)
- 10) Fujiwara, T. and Kon, K.: in Zilla, P. and Greisler, H.P. (Ed.), *Tissue Engineering of Vascular Prosthetic Grafts*, R.G. Landes Company, Austin, Texas U.S.A., 1999, p. 417–423
- 11) Fujita, H., Nishii, Y., Yamashita, K., Kawamata, S. and Yoshikawa, K.: *Arch. Histol. Cytol.*, **51**, 285–294 (1988)
- 12) Fujiwara, T., Shimizu, D., Kon, K., Isshiki, N., Tsunokuni, H. and Aoyagi, S.: *J. Electron Microsc.*, **49**, 551–558 (2000)
- 13) Kon, K. and Fujiwara, T.: *Cell Tissue Res.*, **278**, 625–628 (1994)
- 14) Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y., Meyer, E.M., Morel, L., Petersen, B.E. and Scott, E.W.: *Nature*, **416**, 542–545 (2002)
- 15) Gibson, R.L., Lee, M.K., Soderland, C., Chi, E.Y. and Rubens, C.E.: *Infect. Immun.*, **61**, 478–485 (1993)
- 16) Shimizu, D., Fujiwara, T., Kon, K., Isshiki, N. and Tsunokuni, H.: *J. Electron Microsc.*, **50**, 51–55 (2001)