

## 血管新生における造血幹細胞の意義

高倉 伸幸

**要 旨：**血管は脈管形成と血管新生という2種類の過程により構築される。成長因子，接着分子，細胞外マトリックスの産生，消化にかかわる多くの分子がこの血管形成にかかわることが明らかにされてきている。このような分子ネットワークは，血管形成にかかわる細胞間の相互作用によってもたらされており，本総説では，造血幹細胞による血管内皮細胞の移動の誘導機構，および血管の安定化 / 成熟化について解説した。( J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 247-253 )

Key words: hematopoietic stem cell, angiogenesis, endothelial cell, permeability

### はじめに

近年，血管形成にかかわる遺伝子，分子の単離が進み，血管細胞の分化のメカニズムや，血管細胞による管腔形成，また既存の血管からの血管伸張について，その機序が徐々に明らかになりつつある。血管は，酸素をはじめとして養分やその他の分子および免疫細胞を組織の局所に運搬する重要な役目を持つことは周知である。このような血液細胞の運搬という基本的な血管機能に加え，血管が臓器・組織の形成に必須であることを示す報告もなされてきている。もちろん血管がなければ，酸素や養分が供給されないために，臓器の形成が成立しないのは当然であるが，血管内皮細胞の機能として，臓器の幹細胞の増殖に重要な，いわゆる生態学的適所(niche: ニッチ)として機能することも神経系組織をはじめ明らかになってきている。造血系組織でも，造血幹細胞はそもそも血管内皮細胞にも分化する共通祖先細胞，ヘマンジオブラストから発生するという，造血系と血管系の発生的共通性があるうえに，発生初期では造血幹細胞の増殖が，血管内で営まれるということが数多く報告されている<sup>1)</sup>。われわれは以前から，造血と血管の発生段階の相互作用の研究から，造血幹細胞の血管形成に対する作用を詳細にしてきた。これまで，造血幹細胞が血管内皮細胞に対して，ある特定の領域に血管を侵入させるためのガイド

ポストとして働く機能を解明，報告してきた<sup>2)</sup>。また，最近，造血幹細胞分画が血管新生の進行中に血管の脆弱性を抑制する機能や，また，血管新生が終了した後に壁細胞に分化して，血管構造を安定化させる生理的機能を有することを見出している<sup>3)</sup>。このような造血幹細胞機能は，血管再生のための基本的概念として臨床的に利用可能なものであり，現在実施されている骨髓前駆細胞移植による，血管再生の有効性の原理を説明する現象の1つになると考えている。また，逆に，種々の病態の悪化に直接かかわっている血管新生においても，このような造血幹細胞機能が利用されていることを見出しており<sup>4)</sup>，病的血管新生における造血幹細胞の機能を抑制する手段を講じる必要がある。そこで，本稿では，われわれが従来より明らかにしてきた，造血幹細胞の血管新生における機能的意義について概説したい。

### 血管新生の概要

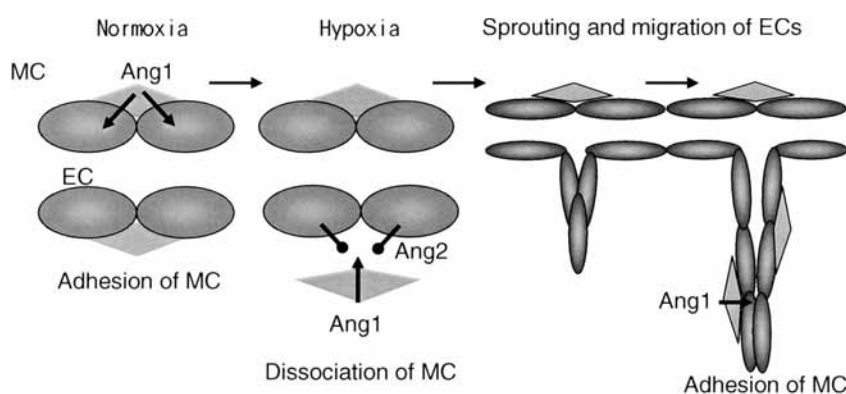
血管形成の最初に生じるイベントは無血管領域における血管内皮細胞の集合と管腔形成である。これが，いわゆる脈管形成 / 血管発生の開始であり，内皮細胞の周囲を，ペリサイトあるいは血管平滑筋細胞(これらは総称して壁細胞と呼ばれる)が裏打ちして構造的に安定した血管が形成される。この内皮細胞と壁細胞の細胞間相互作用ではおもにplatelet derived growth factor (PDGF)-Bとその受容体PDGFR $\beta$ ，angiopoietin-1 (Ang1)

とその受容体Tie2のシステムにより制御される。PDGF-Bは血管内皮細胞および壁細胞に発現するが、その受容体は壁細胞に発現しており、壁細胞の増殖や移動にかかわる。PDGF-B欠損マウスでは壁細胞の接着の欠失した血管が全身で認められることから、PDGF-Bは壁細胞の内皮細胞への動員に重要な役割を果たすことが明らかにされた<sup>5,6)</sup>。壁細胞が動員された後の血管内皮細胞との接着には、壁細胞から恒常的に分泌されるAng1が内皮細胞上のTie2を刺激することにより生じ、この接着には内皮細胞におけるintegrinの活性化が関与する<sup>1)</sup>。このように通常、正酸素状態では、内皮細胞は壁細胞の分泌するAng1により内皮細胞-壁細胞間の接着が保たれているが、局所で低酸素が生じると血管内皮細胞からAng1のアンタゴニストであるAng2の産生が高まり、Tie2の活性化を一時的に抑制して内皮細胞-壁細胞間の接着を抑制する<sup>7)</sup>(Fig. 1)。壁細胞の解離により移動が可能になった内皮細胞は増殖を開始し、血管を覆っていたマトリックスを消化して局所に侵入していく。これが発芽的血管新生の開始である。血管が虚血や低栄養部分に新しい血管網を形成すると、再度、壁細胞の内皮細胞への接着が誘導され血管は安定化し、血管の伸長は終了する。しかし、血管内皮細胞からのAng2の発現が継続すると、壁細胞の内皮細胞への接着が抑制され、壁細胞の欠失した血管は構造的に安定化できず、さらに壁細胞から分泌され、内皮細胞

生存因子としても機能するAng1の供給が絶たれて細胞死が誘導される<sup>8)</sup>。これが、血管新生の際、余剰に形成された血管の退縮過程である。われわれはこの血管新生の過程において、造血幹細胞が種々の役割を果たすことを解明してきており、無血管領域に侵入していく血管内皮細胞の方向性の決定機構、血管新生の最中に、壁細胞のみからなる脆弱な血管の透過性抑制、血管壁細胞への分化能により、新生血管の構造的安定化にかかわることが判明してきた。

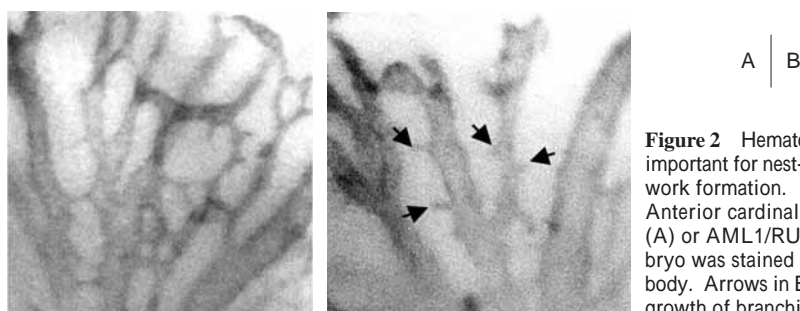
### 造血幹細胞による 血管内皮細胞移動の方向性決定機構

発芽を開始した血管内皮細胞は静止期から細胞周期を回復させ、血管を必要とする領域を目差して移動していかなければならない。この際、血管内皮細胞がどのように局所に入り込んでいくのかについて、さまざまな研究がなされてきている。たとえば、VEGF (vascular endothelial growth factor) の濃度勾配により内皮細胞の遊走刺激が生じるということ、また移動していく最も先端部の血管内皮細胞に複数のマトリックス消化酵素 (matrix metalloproteinase: MMP) が発現して局所への移動を可能にするなどである。しかし、この内皮細胞の移動のメカニズムに関しては、まだ十分に理解されていないのが現状である。われわれは、この発芽的血管新生における血管内皮細胞の移動に、造血幹

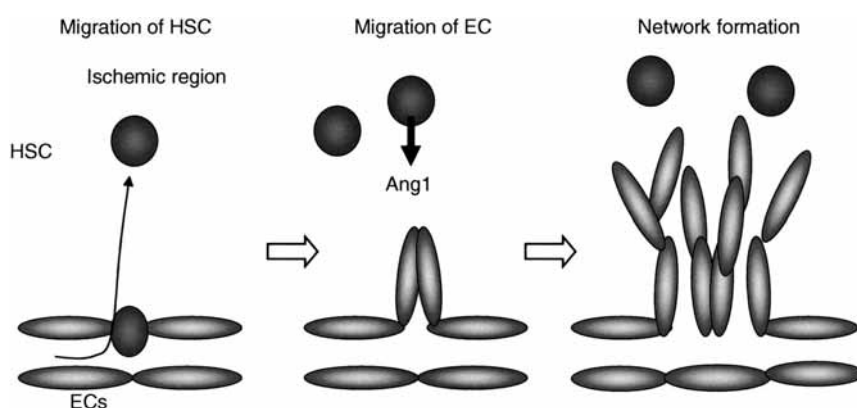


**Figure 1** Schematized Tie2-Angiopoietin system for blood vessel formation.

There are two kinds of ligand for Tie2. Ang1 produced by mural cells (MCs) stimulates Tie2 and promotes adhesion between endothelial cells (ECs) and MCs. In this situation, a blood vessel is structurally stable. Ang2 is an antagonist of Ang1 and inhibits the binding of Ang1 to Tie2 receptor. Ang2 is produced in ECs under tissue hypoxia and promotes dissociation between ECs and MCs. This inactivation of Tie2 triggers the process of angiogenesis. Newly developed blood vessels are covered with MCs again.



**Figure 2** Hematopoietic stem cells are important for nest-like blood vessel network formation. Anterior cardinal vein from wild type (A) or AML1/RUNX1 mutant (B) embryo was stained with anti-CD31 antibody. Arrows in B indicate insufficient growth of branching vessels.



**Figure 3** Process of angiogenesis associating with hematopoietic stem cells. Hematopoietic stem cells (HSCs) migrate into avascular area before endothelial cells (ECs) migrate in such hypoxic region. HSCs produce Ang1 and stimulate Tie2 on ECs for the migration of ECs. Further details are in the text.

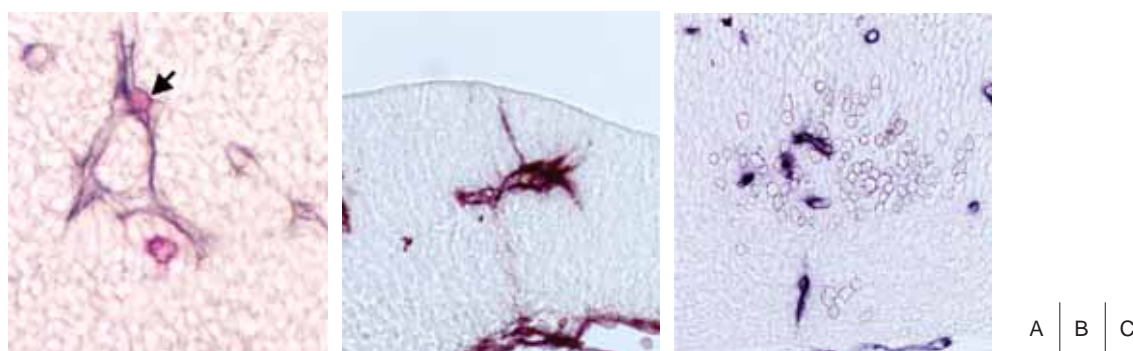
細胞が細胞間相互作用を介してかかわることを従来より詳細に検討してきた。

造血幹細胞あるいは血液細胞による血管形成の作用は、造血幹細胞の発生を完全に欠損するAML1/RUNX1転写因子のノックアウトマウスの表現型において、既存の血管から発芽する血管の伸長が抑制されていることから、血管新生の中でも緻密な血管網の形成に関係していることが予想された (Fig. 2)。試験管内で血管新生を観察することのできるP-Sp (para-aortic splanchnopleural mesoderm: 傍大動脈臓側板中胚葉) 培養系において、このAML1/RUNX1遺伝子のノックアウトマウスのP-Spを培養すると、血液細胞の発生抑制と同時に血管網の形成抑制も認められた。しかし、ここに正常な造血幹細胞を添加すると、血液細胞のコロニーの形成領域に一致して血管網が形成されることが判明した。そして種々の解析結果、血管新生に重要な役割を果たすAng1がこの血管網の形成に重要であり、この培養系ではAng1は造血幹細胞が特異的に分泌していることが判明

した。また生体内での解析から、頭部神経管内では無血管領域に血管内皮細胞より先に侵入した造血幹細胞はAng1を分泌し、血管内皮細胞の遊走を刺激して、血管内皮細胞の局所における正確な移動の方向性を決定するのに重要な役割を果たすことが判明した (Fig. 3)。

### 造血幹細胞の血管壁細胞への分化

さて、このように造血幹細胞は血管新生を促進する細胞として、いわゆるproangiogenic accessory 細胞としての機能を有することが判明したが、それではこのように血管内皮細胞を誘導した後、この造血幹細胞の最終的な運命とはどうなっているのだろうかという疑問が生じる。そこで、造血幹細胞の局在を詳細に解析すると、Fig. 4Aに示したように、造血幹細胞は血管新生により伸長が終了した内皮細胞に接着している領域が高頻度に観察された。このことから、造血幹細胞は血管新生を誘導した後、血管に接着して血管構造の安定化を誘導しているのではないかと推測される。この仮



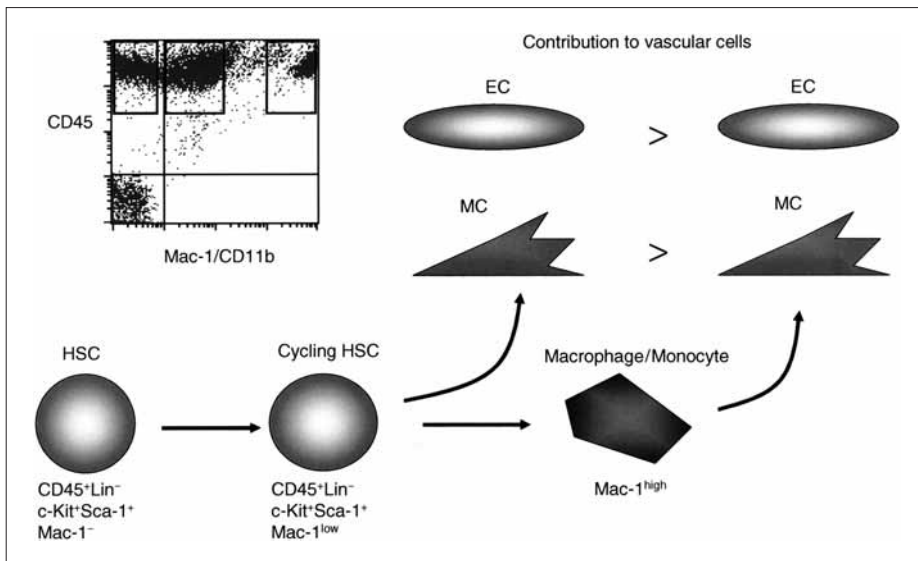
**Figure 4** Mechanical stabilization of blood vessels by hematopoietic stem cells. Brain ectodermal layer of embryo from wild type (A) or AML1/RUNX1 at E11.5 was stained with anti-CD31 antibody (dark blue) and anti-c-Kit antibody (red). Arrow in A indicates hematopoietic stem cell adhering to endothelial cells. Note that blood vessels observed in ectodermal layer of AML1 mutant show disorganized shape (B) and finally show rupture (C).

説は前述した造血幹細胞の発生を欠く AML1/RUNX1 ノックアウトマウスでは、神経層内に無秩序な方向性をもって侵入した血管が、最終的に破綻していることから強く支持された (Fig. 4B, C)。成体の動脈硬化などの病態時には、骨髄から動員された造血幹細胞分画が動脈硬化巣において血管平滑筋細胞に分化していることが示されてきたが、この造血幹細胞の壁細胞分化については、生理的血管新生においても観察されるのか否かは証明されてこなかった。われわれは、AML1/RUNX1 ノックアウトマウスの神経層内に壁細胞の発生が認められないこと、さらに正常マウスの神経層内に存在する CD45 (汎血球系抗原) 陽性の血液細胞中、Lin (血球系分化抗原) 陰性、c-Kit 陽性の造血幹細胞を回収し、PDGF の存在下で培養すると、容易に血管壁細胞が分化してくることから、胎児期の生理的血管新生の際にも、造血幹細胞が壁細胞に分化し、実際に血管構造の安定化に必要であることを証明した<sup>3)</sup>。

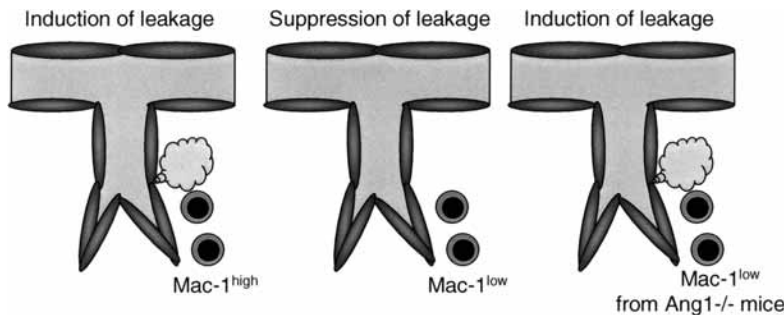
さて、それではこのような造血幹細胞の壁細胞分化であるが、血管再生の治療を考えた際には、新生血管の構造的安定化に寄与するという観点で重要な意味を持つと考えられる。そこで、胎児期でなく、成体における虚血時に、末梢血中に存在する造血幹細胞が壁細胞に分化可能かどうかを検討した。正酸素状態のマウスの末梢血単核球を培養しても、血管壁細胞への分化はほとんど認めないが、大腿動脈結紮による虚血を誘導したマウスの末梢血単核球では高頻度に壁細胞の分化が認められる。そこで、どのような分画からこのよ

うな壁細胞が発現するのかを種々のマーカーを用いて解析した。末梢の CD45 発現細胞、つまり血液細胞を、これまで血管内皮細胞が分化することで知られている単球分画の細胞が発現する Mac-1/CD11b により分画すると<sup>9,10)</sup>、CD11b 陰性、CD11b 弱陽性、CD11b 強陽性の 3 種類になる (Fig. 5)。このうち、CD11b 陰性の細胞分画からは、血管壁細胞の分化は認められなかったが、CD11b 弱および強陽性の両者から血管内皮細胞および壁細胞 (合わせて血管細胞と呼ぶ) が分化した。この CD11b 弱および強陽性の分画を詳細に検討すると、CD11b 弱陽性の細胞から血管細胞に分化する頻度が高く、さらに、これら両者の細胞を大腿動脈結紮の虚血モデルマウス的大腿部に移植し比較すると、両者とも血管新生の誘導能を有し、さらに血管細胞として既存の血管に取り込まれて血管細胞として貢献する。しかし、CD11b 弱陽性の細胞のほうが、より長期に血管細胞、特に血管壁細胞として貢献していることが判明した。CD11b 強陽性細胞はさまざまなマーカー解析から成熟した単球であり、また CD11b 弱陽性細胞は、c-Kit および Sca-1 という造血幹細胞マーカーを発現していることや、試験管内での血液細胞のコロニー形成能が高いことから、いわゆる分裂期の造血幹細胞<sup>11)</sup> であると考えられた。つまり、胎児期に観察されたのと同様、成体でも虚血時ににおいて、骨髄から末梢血に動員された造血幹細胞は、血管壁細胞に分化して、血管の構造的安定化に寄与すると考えられた (Fig. 5)。





**Figure 5** Hematopoietic stem cell (HSC) population differentiates into mural cells (MCs) as well as endothelial cells (ECs). Fraction of hematopoietic cells in peripheral blood after induction of ischemia (top left) and schematic presentation of differentiation pathway of hematopoietic stem cells into vascular cells.

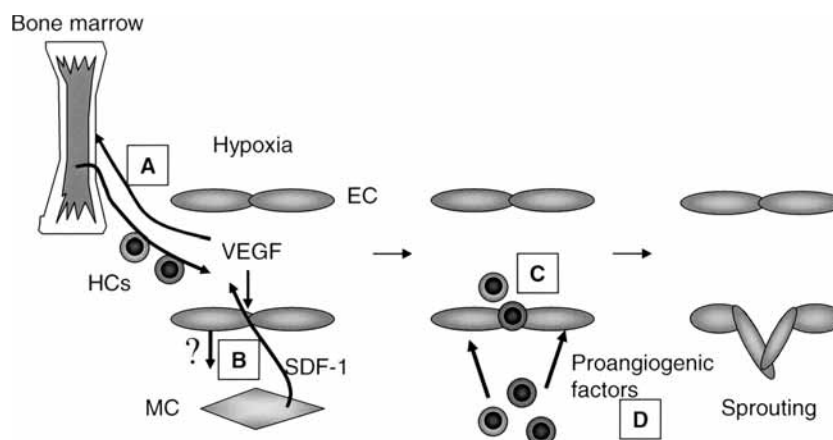


**Figure 6** CD11b<sup>low</sup>/Mac-1<sup>low</sup> hematopoietic stem cell population suppresses vascular leakage through Ang1. Further details are in the text.

### 造血幹細胞による 血管新生時の脆弱血管の透過性抑制機構

さて、血管は血管内皮細胞と壁細胞が接着して構造的に安定化しており、この際には血管の透過性も抑制された状態である。VEGF遺伝子による血管新生の誘導では、血管浮腫が生じることが知られており<sup>12)</sup>、これはVEGFが内皮細胞の増殖を誘導しても、壁細胞の発生が追い付かず、構造的に安定化しない未熟な血管が誘導されることが原因の一つと考えられている。しかし、通常の生理的血管新生の際には壁細胞の裏打ちのない、血管内皮細胞単独の血管が局所に分枝を伸ばしていても血管浮腫が誘導されることはないことから、この過程では何らかの血管透過性抑制のシステムが制御していると考えられる。これまで、VEGFによ

る血管透過性の亢進はAng1により抑制されることが報告されており<sup>13)</sup>、造血幹細胞にもAng1の発現が高いことから、血管新生を誘導する最中における血管脆弱化の抑制、つまり血管透過性の抑制を造血幹細胞がAng1の産生を介して誘導している可能性が考えられる。そこで、前述した虚血時に動員されるCD11b弱陽性の造血幹細胞分画と、CD11b強陽性の成熟単球を解析すると、確かにCD11b弱陽性分画でAng1の発現が高いことが判明した。CD11b弱と強陽性の細胞におけるVEGFの発現を解析すると、両者ともその発現が認められるが、CD11b強陽性の細胞により高い発現が認められた。そこで、この両者を虚血領域に移植した際の血管透過性をレクチン染色で解析すると、CD11b強陽性では血管透過性を誘導するのに対し、CD11b弱陽性ではそのような透過性亢進は認められず、さらにAng1ノッ



**Figure 7** SDF-1 traps proangiogenic hematopoietic cells (HCs).  
 A: A heterogeneous mixture of cells is recruited from the bone marrow to the peripheral blood in response to overexpression of VEGF in ischemic foci. B: VEGF overexpression in ischemic foci also induces the expression of SDF-1 in mural cells (MCs) around blood vessels. C: As a result, recruited bone marrow-derived circulating cells expressing CXCR4, the receptor for SDF-1, are entrapped and correctly positioned around the vessels expressing SDF-1. D: Such trapped HCs produce proangiogenic cytokines and chemokines, resulting in the initiation of angiogenesis.

クアウトマウス由来のCD11b弱陽性細胞では透過性を亢進させてしまうことから、CD11b弱陽性細胞はAng1の分泌により、VEGFによる血管透過性を抑制することが証明された( Fig. 6)。このことから、造血幹細胞の血管新生時における機能として、血管新生時の内皮細胞単独の脆弱な血管の透過性を抑制して、血管浮腫のない生理的血管を形成するのに寄与していることが判明した。

### おわりに

以上、造血幹細胞の血管新生における機能的意義を解説した。近年、骨髄幹/前駆細胞を用いて血管を再生する治療が実施されるに至っており、またG-CSF (granulocyte colony stimulating factor)を用いて末梢に造血幹細胞を動員し、血管形成を促進する治療も開始されている。この治療法がさらに発展していくためには、動員あるいは移植した造血幹細胞をいかに効率よく虚血領域にデリバリーするかが課題である。これを克服するためには、生理的な条件下での、骨髄から虚血領域への造血幹細胞の移動のメカニズムを詳細にすることが必要と考えられる。本件においては、最近、Grunewaldら<sup>14)</sup>が、これまで使われてきたVEGF遺伝子あるいは分子の過剰投与といった非生理的な条件では

なく、VEGFを生理的な発現量で条件付きに発現させることのできるトランスジェニックマウスを用いて、骨髄細胞の虚血領域への移動のメカニズムを報告している。この論文によれば、まず、虚血を感知した血管内皮細胞が分泌するVEGFが骨髄からVEGF受容体(R)1や2を発現する骨髄細胞を動員し、さらにVEGFによるオートクラインループにより内皮細胞から何らかの分子が分泌され、壁細胞からCXCR4のリガンドのSDF(stromal cell derived factor)1の分泌を高める。このSDF-1がCXCR4を発現する骨髄細胞を虚血領域にデリバリーするのに用いられるというストーリーである( Fig. 7)。もちろん、Grunewaldらはこのような骨髄細胞がproangiogenic accessory細胞として、血管新生を誘導することも示している。このような多段階におよぶ種々のサイトカインネットワークが骨髄細胞の局所への動員にかかわっていることは以前から周知ではあるが、さらにこのSDF-1の産生制御を明らかにすることで、造血幹細胞を局所にデリバリーする方法論が確立されるものと考えられる。

### 文 献

- 1) Takakura N, Huang XL, Naruse T et al: Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis. *Immunity*, 1998, 9: 677-686.

- 2) Takakura N, Watanabe T, Suenobu S et al: A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell*, 2000, **102**: 199–209.
- 3) Yamada Y, Takakura N: Physiological pathway of differentiation of hematopoietic stem cell population into mural cells. *J Exp Med*, 2006, **203**: 1055–1065.
- 4) Okamoto R, Ueno M, Yamada Y et al: Hematopoietic cells regulate the angiogenic switch during tumorigenesis. *Blood*, 2005, **105**: 2757–2763.
- 5) Lindahl P, Johansson BR, Leveen P et al: Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*, 1997, **277**: 242–245.
- 6) Lindblom P, Gerhardt H, Liebner S et al: Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes Dev*, 2003, **17**: 1835–1840.
- 7) Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF et al: Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 1997, **277**: 55–60.
- 8) Holash J, Maisonpierre PC, Compton D et al: Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*, 1999, **284**: 1994–1998.
- 9) Rehman J, Li J, Orschell CM et al: Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*, 2003 **107**: 1164–1169.
- 10) Fujiyama S, Amano K, Uehira K et al: Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res*, 2003, **93**: 980–989.
- 11) Randall TD, Weissman IL: Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment. *Blood*, 1997, **89**: 3596–3606.
- 12) Isner JM, Vale PR, Symes JF et al: Assessment of risks associated with cardiovascular gene therapy in human subjects. *Circ Res*, 2001, **89**: 389–400.
- 13) Thurston G, Suri C, Smith K et al: Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science*, 1999, **286**: 2511–2514.
- 14) Grunewald M, Avraham I, Dor Y et al: VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*, 2006, **124**: 175–189.

## Development of Regulatory Mechanism for Angiogenesis with Hematopoietic Stem Cells

Nobuyuki Takakura

Department of Signal Transduction, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan

**Key words:** hematopoietic stem cell, angiogenesis, endothelial cell, permeability

In this study, the functions of hematopoietic stem cells for angiogenesis are discussed. Blood vessel formation consists of the following two processes: vasculogenesis and angiogenesis. Multiple ligand-receptor systems, adhesion molecules, matrix generation and degradation systems are involved in these processes. Hematopoiesis and blood vessel formation are closely related. There are common progenitors termed hemangioblasts that can differentiate into hematopoietic cells as well as endothelial cells. In addition, endothelial cells can support hematopoiesis. We have been investigating a correlation between hematopoietic cells and endothelial cells with a special focus on the functions of hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. (J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 247–253)