

血管恒常性維持・血管新生におけるペリサイトの役割

日本医科大学 先端医学研究所 病態解析学部門

福原 茂朋

1. はじめに

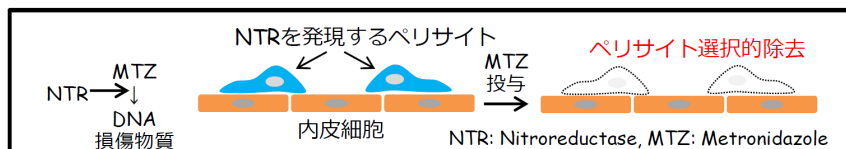
血管は、生命維持に必須のライフラインであり、全ての細胞に酸素や栄養を運搬し、二酸化炭素や老廃物を回収することで、臓器の機能を維持している。また、血管は臓器間ネットワークを構築することで、メッセージ物質を介した多臓器間相互作用を制御し、生体恒常性維持に寄与している。さらに、近年の研究は、組織特異的な血管内皮細胞がアンジオクリン因子の産生や組織微小環境を整えることにより、血管の普遍的な役割に留まらず、積極的に臓器の発生・再生を制御することを明らかにしている。このように、血管は多様な機能を有しており、その異常は様々な疾患と密接に関連する。

全血管の90%以上を占める毛細血管の血管壁にはペリサイト（周皮細胞）が被覆している¹。ペリサイトは、中枢神経系における血液脳関門の形成・維持に重要であり、その破綻は脳虚血や認知症などの脳疾患と関連する。そのため、これまで中枢神経系におけるペリサイトの機能が精力的に研究されてきた。一方、抹消組織の毛細血管を被覆するペリサイトに関しては、その血管恒常性維持における重要性が示唆されているものの、その詳細は明らかになっていない。例えば、これまで加齢に伴う老化には、毛細血管の減少が関与することが示唆されているが、その際、毛細血管を被覆するペリサイトが減少することが報告されている²。この知見は、ペリサイトが毛細血管の恒常性を維持しており、その機能が加齢によって影響を受ける可能性を示唆しているが、その詳細は不明である。

また、ペリサイトは血管新生にも関与することが示唆されている³。組織が損傷などにより虚血状態に陥ると、それを解消するため血管新生が誘導され、虚血組織に新たな血管網を構築する。これまで正常な血管新生においては、血管新生因子が血管壁からペリサイトを剥離し、血管の出芽・伸長を促すと考えられてきた。さらに、癌や糖尿病網膜症などの疾患で起こる病的血管新生では、ペリサイトが新生血管に動員されず、それにより機能的に未熟な血管が形成され、これら疾患の病態を悪化させると考えられている。しかし、血管新生におけるペリサイトの機能とその制御メカニズムに関しては、未だ不明な点が多いのが現状である。

我々はこれまで、臓器の発生や構造がヒトと類似したゼブラフィッシュをモデル脊椎動物として用い、また、蛍光イメージング技術を駆使することで、血管形成の制御機構について研究を進め、その一端を明らかにしてきた⁴⁻⁸。また、生体内のペリサイトの動態を高解像度でライブイメージング可できるゼブラフィッシュを樹立し、ペリサイトが血管を被覆する機序を明らかにし報告した⁹。さらに最近、これまで技術的に困難であったゼブラフィッシュ成魚を長時間麻酔下で固定する方法を確立し、成魚の長時間ライブイメージングを可能にした。この技術を用いて、成魚皮膚の創傷治癒に伴う血管新生における内皮細胞・ペリサイトの動態をライブイメージングにより解析し、組織修復過程における血管新生プロセスの全貌を明らかにした¹⁰。特に、血管新生におけるペリサイトの機能に関して、これまでの概念と矛盾する現象を見出した。上述の通りこれまで、血管新生の誘導によってペリサイトは血管壁から乖離し内皮細胞の出芽を促すと考えられてきた。しかし、創傷による血管新生の誘導によって、ペリサイトの血管壁からの乖離は認められず、逆にペリサイトは血管内皮細胞とともに増殖し、蛇行血管を構築する内皮細胞を被覆することが分かった。さらに、その後、数ヶ月に渡って血管内皮細胞、ペリサイトは数を

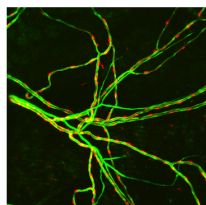
NTR/MTZシステムによるペリサイトの選択的除去法



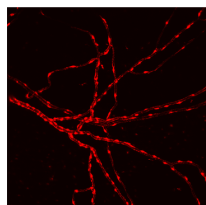
*Tg(kdr1:EGFP);TgB(pdgfrb:gal4);
(UAS:NTR-mCherry) fish*



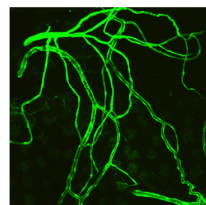
内皮細胞
ペリサイト(NTR)



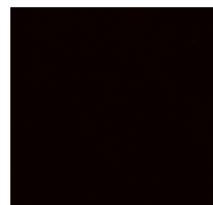
ペリサイト(NTR)



内皮細胞
ペリサイト(NTR)



ペリサイト(NTR)



減少させ、血管が正常化することが示された。これら知見は、ペリサイトが血管新生プロセスを積極的に制御している可能性を示唆している。そこで、われわれは、「生理的血管新生において、ペリサイトは増殖し血管壁を被覆することで、過剰な内皮細胞の出芽を抑え、機能的な血管網の形成に寄与する一方、病的血管新生では、ペリサイトによる血管壁の被覆が起こらず、それにより過剰な内皮細胞の出芽が起こり、未熟な血管が形成される」との仮説を立てた。

本研究では、抹消組織の毛細血管の恒常性維持におけるペリサイトの機能を明らかにするとともに、血管新生に関する上記仮説の検証を通して、血管新生におけるペリサイトの真の役割とその制御機構の解明を目的とした。

2. 方法および結果

(1) ペリサイトをコンディショナルに除去可能なゼブラフィッシュの樹立

血管恒常性維持・血管新生におけるペリサイトの役割を明らかにするため、バクテリア由来ニトロ還元酵素 (Nitroreductase: NTR) とNTRによってアポトーシス誘導物質へと変換するメトロニダゾール (Metronidazole: MTZ) を利用して、ペリサイトをコンディショナルに除去可能なトランスジェニック (Tg) ゼブラフィッシュを樹立した。ペリサイトを含む壁細胞で活性化する*pdgfrb*プロモーター制御下でGal4FFを発現する*TgBAC(pdgfrb:Gal4FF)*フィッシュ系統とGal4の認識配列UASの下流でNTR-mCherryを発現する*Tg(UAS:NTR-mCherry)*フィッシュ系統を樹立し、さらに血管内皮細胞を可視化する*Tg(kdr1:EGFP)*系統と交配することで、内皮細胞でEGFP、ペリサイトでNTR-mCherryをそれぞれ発現するゼブラフィッシュを樹立した。さらに、同Tgフィッシュ成魚をMTZで処理したところ、処理後2日目には、皮膚血管を被覆するペリサイトのほとんどが消失していた (図1)。以上により、ペリサイトをコンディショナルに除去可能なゼブラフィッシュを樹立した。

(2) 正常組織の毛細血管を被覆するペリサイトの機能解析

(1) で開発したペリサイトをコンディショナルの除去可能な系を用いて、成魚皮膚の毛細血管を被覆するペリサイトを除去したときの血管構造の変化を観察した。その結果、ペリサイトの除去により血管が拡張することがわかった。また、ペリサイト除去数日後には、内皮細胞が既存血管から出芽し、新たな血管を形成することが示された。これらの結果は、正常組織の毛細血管を被覆するペリサイトは、内皮細胞を休止期の状態に留め、安定な血管構造を維持している可能性を示唆している。また、興味深いことに、加齢ゼブラフィッシュの皮膚毛細血管を観察したところ、毛細血管を被覆するペリサイトが減少し、過密な血管網が認められた。これらの結果から、加齢によってペリサイトが減少し、それによって内皮細胞が活性化することで、過密な血管網が形成される可能性が示された。現在、正常組織の毛細血管を被覆するペリサイトの機能に関する仮説を検証するため、コントロールおよびペリサイトを除去した成魚皮膚から内皮細胞を単離しRNAseq解析を行っている。

(3) 創傷治癒に伴う血管新生におけるペリサイトの機能解析

創傷治癒に伴う血管新生におけるペリサイトの機能を明らかにするため、上記システムを用いて、成魚皮膚の毛細血管を被覆するペリサイトをアブレーションしたのち、創傷を加え血管新生を誘導した。その結果、ペリサイトを除去していないコントロールフィッシュと同様に、創傷後に損傷血管の伸長と非損傷血管からの出芽が起こり、1~2週間で、密度の高い血管網が形成された。この際、ペリサイトを除去した群においては、血管から内皮細胞の出芽が優位に増加しており、結果としてより過密な血管網の形成が観察された。これらの結果から、血管新生の誘導によって、ペリサイトは増殖し内皮細胞を被覆することで、過剰な血管の出芽を抑えていることが示唆された。また、コントロールフィッシュでは、損傷血管は一方向性に伸長し、損傷前と同様な血管網を構築したのに対し、ペリサイトを除去した群では、損傷血管が湾曲しながら伸長し、損傷前と異なる異常な血管ネットワークが形成されていた。これまでの血管新生における内皮細胞とペリサイトの動態解析から、ペリサイトは伸長する血管枝を被覆することが分かっている。以上の結果から、血管新生誘導時、ペリサイトは既存血管からの内皮細胞の出芽を制限するとともに、出芽して伸長する血管に対しては、その伸長方向を制御している可能性が示唆された。現在、ペリサイトが内皮細胞の出芽や血管枝の伸長を制御するための分子機構について解析を進めている。

(4) 改良型NTR/MTZシステムを利用した選択的ペリサイトアブレーションシステムの構築

上記解析を行う過程で、*Tg(pdgfrb:Gal4FF);(UAS:NTR-mCherry)*フィッシュを用いてペリサイトを除去すると、その後にペリサイトが再出現してこないことがわかった。これを検証するため、ペリサイトでEGFPを発現する*Tg(pdgfrb:EGFP)*フィッシュを用いてペリサイト除去実験を行ったところ、ペリサイト除去後、数日で血管周囲に*pdgfrb:EGFP*陽性細胞の出現が認められた。しかし、この*pdgfrb:EGFP*陽性細胞は、*pdgfrb:Gal4FF;UAS:NTR-mCherry*陰性であることがわかった。このことから、成魚皮膚にはペリサイトに分化可能な前駆細胞が存在しており、既存のペリサイトの消失により、ペリサイトに分化することが示唆された。また、*pdgfrb:Gal4FF;UAS:NTR-mCherry*はde novoで分化したペリサイトを標識できないことがわかった。そこで、この問題を克服するため、改良型NTR/MTZシステムを用い選択的ペリサイト除去システムを構築した。具体的には、*pdgfrb*プロモーター制御下でmScarlet-2A-epNTRを発現するゼブラフィッシュ (epNTR, ゼブラフィッシュ最適化NTR: 2A, 自己切断2Aペプチド: mScarlet, 蛍光強度の強い赤

色蛍光タンパク質)を樹立した。同フィッシュを用いて、1と同様にペリサイト除去実験を行ったところ、MTZ処理後2日目には、ほぼ全てのペリサイトが消失したが、MTZ除去後、動脈血管周囲に*pdgfrb:mScarlet-2A-epNTFR*陽性ペリサイトが再出現することが分かった。現在、この新システムを用いて、再度、上記(2)・(3)の実験を行っている。

(5) ゼブラフィッシュを用いた腫瘍血管新生ライブイメージングシステムの構築

病的血管新生におけるペリサイトの役割を明らかにするために、ゼブラフィッシュ成魚における腫瘍血管新生イメージング系の開発を行った。腫瘍血管新生における血管内皮細胞、ペリサイトの動態を解析するため、免疫不全ゼブラフィッシュ(*prkdc*^{-/-}, *i12rqa*^{-/-})を入手し、*Tg(kdr1:EGFP);(pdgfrb:mCherry)*フィッシュと交配した。同免疫不全ゼブラフィッシュ成魚にiRFP670で蛍光標識したMDA-MB-231ヒト乳がん細胞を移植したが、がん細胞の生着が十分でなかった。現在、移植がん細胞の生着率向上を図っている。

3. 考察

本研究では、抹消組織の毛細血管の恒常性維持および血管新生におけるペリサイトの役割とその制御機構の解明を目指し、ゼブラフィッシュをモデル脊椎動物として用いた、蛍光イメージング解析を行った。その結果、正常組織においては、ペリサイトは内皮細胞を休止状態に維持することで毛細血管の恒常性を維持していること、また、血管新生においてペリサイトは過剰な血管の出芽を制限するとともに、血管枝の伸長を制御していることが示唆された。しかしながら、その後の解析から、ペリサイト除去後、数日で動脈血管周囲においてペリサイトが出現し、再び血管を被覆していることを発見しており、本実験では一部のペリサイトの機能しか阻害できておらず、血管恒常性維持および血管新生におけるペリサイトの機能を過小評価している可能性が考えられる。よって、現在行っている改良型ペリサイト除去システムを用いた解析により、毛細血管の恒常性維持および血管新生におけるペリサイトの機能が明確になると期待している。

本研究において、成魚皮膚のペリサイトを除去後、動脈周囲でペリサイトが再度出現することを発見した。この知見は、成魚皮膚にはペリサイトに分化可能な前駆細胞が存在しており、既存のペリサイトの消失により、ペリサイトに分化することが示唆された。今後、成魚皮膚においてペリサイトに分化可能な前駆細胞を同定するとともに、既存のペリサイトの消失により、これら細胞がペリサイトに分化する機構を明らかにする。また、血管新生において、ペリサイトは数を増加させ、既存血管および新生血管を被覆するが、この際に前駆細胞からのペリサイトの分化がペリサイト数の増加に寄与しているか検討する。これまでに、血管新生誘導時、既存のペリサイトが分裂することを確認しているが、ペリサイト数の増加に分裂に加えペリサイトの分化も関与しているのか、関与している場合、それぞれのポピュレーションは異なった機能を持っているのかなど検討を進める。

4. 参考文献

1. Armulik, A., Genové, G. & Betsholtz, C. Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Developmental Cell* 21, 193-215 (2011).
2. Kajiya, K., Kim, Y.K., Kinemura, Y., Kishimoto, J. & Chung, J.H. Structural alterations of the cutaneous vasculature in aged and in photoaged human skin in vivo. *Journal of dermatological science* 61, 206-208 (2011).
3. Eelen, G., Treps, L., Li, X. & Carmeliet, P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. *Circulation Research* 127, 310-329 (2020).
4. Fukuhara, S. et al. Looking back and moving forward: recent advances in understanding of cardiovascular development by imaging of zebrafish. *Dev Growth Differ* 57, 333-340 (2015).
5. Fukuhara, S. et al. Visualizing the cell-cycle progression of endothelial cells in zebrafish. *Dev Biol* 393, 10-23 (2014).
6. Kashiwada, T. et al. beta-catenin-dependent transcription is central to Bmp-mediated formation of venous vessels. *Development* 142, 497-509 (2015).
7. Wakayama, Y., Fukuhara, S., Ando, K., Matsuda, M. & Mochizuki, N. Cdc42 Mediates Bmp-Induced Sprouting Angiogenesis through Fmnl3-Driven Assembly of Endothelial Filopodia in Zebrafish. *Developmental cell* 32, 109-122 (2015).
8. Rho, S.S. et al. Rap1b Promotes Notch-Signal-Mediated Hematopoietic Stem Cell Development by Enhancing Integrin-Mediated Cell Adhesion. *Dev Cell* 49, 681-696.e686 (2019).
9. Ando, K. et al. Clarification of mural cell coverage of vascular endothelial cells by live imaging of zebrafish. *Development* 143, 1328-1339 (2016).
10. Noishiki, C. et al. Live imaging of angiogenesis during cutaneous wound healing in adult zebrafish. *Angiogenesis* (2019).