

血管新生の新しい解析系の開発としくみの理解

熊本大学医学部附属病院・地域医療システム学寄附講座
熊本大学・国際先端医学研究機構
西山 功一

1. 目的

血管新生は、あらゆる組織構築や維持に必須の血管増生反応である。その恒常性の破綻は、様々な病態の発症・進展に関与する。血管新生を自在に操ることで、種々の病態の治療だけでなく人工組織構築など近未来の再生医療にも大きく貢献しうる。その実現には、分子から多細胞現象へと多階層を跨ぐ血管新生メカニズムの包括的な理解とそれを可能とする解析系が必要となる。本研究では、構成的実験手法を用いて、より生体内を近似した血管新生現象を微小流体デバイス上に再現しながら解析する新しい実験系を構築する。さらに、数理生物学的解析を組み合わせることで、血管新生において血管細胞が自己組織化的に血管のかたちを作るしくみを体系的に明らかにし、血管新生を自在に操る基盤を作ることを目指した。

2. 方法

1) 血管新生モデルの構築：(1) 組織培養- マウス胸部大動脈片を細胞内マトリクス内で培養し血管新生現象を再現する。(2) 微小流体デバイス上の血管新生- マウス各種組織から、血管の構成細胞であるCD31⁺内皮細胞、NG2⁺壁細胞、およびその他の細胞群を酵素処理、磁気ビーズ法により単離・増幅する。同細胞を用いて、微小流体デバイス上の細胞外マトリクス内で血管新生現象を再現させる。

2) 血管新生モデルにおける血管細胞動態の可視化と定量的評価：上述のモデルにおいて、血管細胞による多細胞動態を、様々な方法を用いて細胞レベルで4次元的に可視化する。得られる4次元情報から細胞動態と形態変化を定量的に評価し、統計解析により両者間の関係性を検討する。

3) 数理生物学的解析による多細胞システムの理解：定性的・定量的な細胞動態データから多細胞動態を束ねている中枢の原理を抽出し、樹状形態をつくる血管細胞の多細胞動態を再現し予測できる数理モデルを構築する。シミュレーション予測と実験的検証を通して、多細胞動態を支配するメカニズムを理解する。

4) 生体内血管新生との対比：上で得られた多細胞動態を制御するメカニズムが、個体内の血管新生をどれだけ反映しているかどうか、ゼブラフィッシュ胚の血管新生において検討する。以上を統合し、血管細胞が自己組織化的に血管のかたちを作るしくみを体系的に明らかにする。

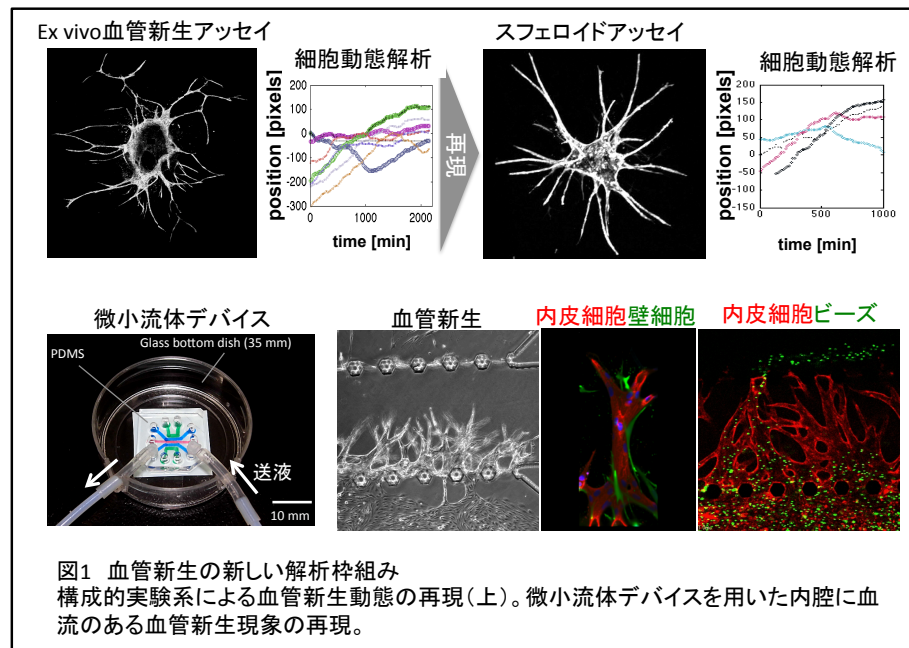
3. 結果

1) 血管新生の新しい解析枠組みの構築

(1) 組織培養と血管新生動態の可視化・定量化：マウス大動脈片を、タイプ1コラーゲンに包埋し血管新生促進因子VEGF存在下に培養することで、血管内皮細胞と壁細胞が行う血管新生現象を再現できた。次に、内皮細胞核の選択的可視化および多細胞体の中で少数の細胞の細胞質を可視化することで、血管新生時の内皮細胞運動を取得した。さらに、得られた4次元データから、細胞動態や形態変化を特徴付け

る指標を設定し、血管新生動態を定量化した。

(2) 構成的実験手法による微小流体デバイスを用いた血管新生モデル: マウス大動脈組織から血管の構成細胞であるCD31⁺内皮細胞、NG2⁺壁細胞、および中膜・外膜由来CD31⁻NG2⁻細胞を酵素処理、磁気ビーズ法により単離した。同細胞を用いてスフェロイドアッセイを行うことで、血管新生現象を再現できた(図1上)。また、単離した細胞やヒト培養細胞を用いて、微小流体デバイス上で血管新生現象を再現する実験系が確立できた(図1下)。ここで再構築された新生血管様構造は、血管内皮細胞が壁細胞で覆われ管腔を有する、生体内を近似した組織構造を示した。さらに、その管腔はデバイス流路と交通しているため、デバイスを介して血管内腔に送液が可能であり、血管新生における血流刺激(ずり応力・内腔圧)の効果を解析可能とした。以上より、血管新生を分子から多細胞動態に至るまで包括的かつ体系的に解析するための枠組みを構築した。



2) 血管伸長を行う血管細胞動態制御メカニズム

マウス大動脈片を用いた組織培養モデルにおいて、内皮細胞の血管新生運動は、細胞同士がその相対的位置関係を常に入れ替えながら移動するなど極めて動的かつ複雑な動態を示した。その運動動態のしくみを理解するため、血管が伸長する時の内皮細胞動態を、エージェント・ベースドモデルとそれに対応する連続モデルで数理モデル化した。興味深いことに、一つ一つの細胞の動くスピードと方向性が確率的に変化するという非常に単純な細胞自律的なしくみだけで、血管の伸長の程度とその時の内皮細胞動態がほぼ再現できた。

一方で、上記モデルでは、先端細胞の動態が完全には再現されないことも分かった。そこで、先端細胞と後続の茎細胞との距離が離れると先端細胞の運動が遅くなる、という新たな規則を追加しモデルを改善したところ、先端細胞動態をより良く再現できた。最終的に、組み込み過程の実験的検証を行った。ゼブラフィッシュ胚の血管新生の際に、レーザー焼灼手法を使って人工的に先端細胞と後続の茎細胞との距離を広げる操作をすると、先端細胞の前方運動が生じなくなった。つまり、数理モデルで予測したしくみが生体内で実際に生じていることが示された。これらの結果から、チップ細胞の運動は、細胞自律的な挙動に加えて、後続の茎細胞との相互作用により厳密に制御されている新たなしくみが関わっていることが解明された。

以上より、血管の伸長を担う複雑な内皮細胞運動を制御するしくみとして、細胞自律的な過程と、隣接した細胞から適宜影響を受けて協調的に動く(細胞非自律的)過程がうまく共存することで、全体の動きが巧みに統制されていることが分かった(図2: 参考文献1)。

4. 考察

血管新生は、その中心となる血管内皮細胞が、もう一つの重要な構成細胞である壁細胞と協働して細胞自律的にかたちをつくる多細胞現象である。そこには、最小の機能単位である細胞が、分子情報を基に応答し、細胞間相互作用を介して多細胞応答として統合されるしくみが存在する。また、血管は血液が流れる内腔構造を持っているため、血流からの刺激も血管新生を制御する一つの大きな要素である。さらに、個体内の血管新生では、血管が存在する微小環境からも影響を受け、それが組織特異的な血管形成に寄与している事が想定される。血管新生を十分に理解していくためには、分子から多細胞レベルで生じているこの複雑な過程を、解析に必要な要素に単純化して検討していく新たな実験系が有効である。本研究においては、これまで研究者代表者が構築した血管新生の細胞

動態解析をベースに（参考文献2）、工学系の技術を応用することで、血管新生動態における血流の影響を検討できる新たな解析系を構築した。血管新生動態における血流刺激の役割はあまり理解されていないため、本方法論を導入することで血管新生の理解が大きく進むことが期待される。

研究代表者は、血管新生の時に観られる内皮細胞動態は、これまで想定されてきた以上に動的で複雑なものであることを示してきた（参考文献2）。本研究において、生物学と数理モデルを融合させた先端的な解析手法導入することで、複雑な血管新生動態の背後にあるしくみを実証しえた。この成果は、血管の形態形成のみならず様々な形態形成の場における多細胞運動のしくみや、さらに、生物の成り立ちの根本的しくみを理解するために基盤となる情報を提供していると考えられる。一方で、次なる疑問も浮かび上がってきた。その例として、個々の細胞の自律的運動が、細胞間相互作用を通してどのように方向性運動に変換されているのか、そして、それに対して血流はどのように影響しているかなどが挙げられる。本研究で構築した、生物学、統計学、数理生物学そして工学を融合させた複合的な解析系を用いて、今後未解決な課題に取り組む予定である。

5. 参考文献

1. Sugihara K[#], Nishiyama K^{#,###,**}, Fukuhara S^{*}, Uemura A^{*}, Arima S, Kobayashi R, Köhn-Luque A, Mochizuki N, Suda T, Ogawa H and Kurihara H^{*}. [#]These authors contributed equally to this work. ^{###}Corresponding author. Autonomy and non-autonomy of angiogenic cell movements revealed by experiment-driven mathematical modeling. *Cell Rep* 13(9):1814- 1827 (2015)
2. Arima S[#], Nishiyama K^{#,###,**}, Ko T, Arima Y, Hakozaiki Y, Sugihara K, Koseki H, Uchijima Y, Kurihara Y and Kurihara H^{*}. [#]These authors contributed equally to this work. ^{###}Corresponding author. Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement. *Development* 138(21):4763-4776 (2011).

