

内腔圧スイッチングによる血管新生制御機構

熊本大学

国際先端医学研究機構

西山研究室

西山 功一

1. はじめに

血管新生は、生体組織の構築や維持に必須の血管増生反応であり、虚血性心疾患や腫瘍をはじめ様々な病態に関与する。したがって、血管新生のしくみを十分に理解し、さらに、それを自在に制御できれば、種々の病態の理解や治療に大きく貢献できる。血管新生は、血管内皮細胞とペリサイトが様々な分子支配の下に自発的に血管の形態を形成し、それが血流などの血管外環境から修飾を受け成立している。我々は、血管新生における血管細胞の自発的形態形成過程を可視化・定量化し、さらに数理生物学的手法を組み合わせた解析枠組を開発することで、ほぼ未解明であった血管新生の細胞メカニズムをこれまで明らかにしてきた (Arima S, Nishiyama K et al. Development 2011; Sugihara K, Nishiyama K et al., Cell Rep 2015)。その中で、血管新生の際の血管内皮細胞運動は極めて動的でありかつ複雑であるという、血管新生を理解するための新たな概念を提唱した。

血管新生においては、血管枝が伸長しながら血管内腔も同時に形成される。その血管内腔は、血流がすでに存在する近位側の血管から連続的に形成されるため、新生されている過程の血管枝も血流により何らかの影響を受けていることが想定された。しかし、血流によって生じるずり応力や内腔圧といった物理的な力が血管新生にどのように影響しているのか不明であった。また、それを検討しうる解析系もほとんどなかった。最近、微小流体デバイス上に、送液可能な血管網を培養細胞を用いて血管新生のプロセスにより構築させる研究が徐々に報告され (Kim S et al., Lab Chip, 2013)、また、我々も横川 (京大工)、三浦 (九大医) らと協働して、同様の方法でデバイス上に血管化された組織を再構成的に構築し、同血管網に培地を灌流することに成功した (Nashimoto Y et al., Integr Biol 2017)。

したがって、本研究では同様の技術を用いて微小流体デバイス上で生体内を近似し灌流可能な新生血管を再現し、血流負荷の影響を解析しうる実験系を新たに構築すること、さらに、上述の細胞動態解析系と生体内での実験を統合することで、血管新生におけるメカノバイオロジー機構を明らかにし、血管新生を自在に操るための視点の提供と基盤をつくることを目指した。

2. 方法

本課題において、特に、血流によって生じる血管内腔圧に焦点を当て、以下の解析を行った。

- 1) 内腔圧負荷による血管新生動態の変化と作用メカニズムの *ex vivo* 血管新生モデルでの解析
 - ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を用いて微小流体デバイス上で血管新生を再現し、その動態を、細胞・形態レベルで4次元的に可視化・定量化した。
 - 水圧差を制御し様々なレベルで可変的に血管内腔に静水圧をかけることで血管内腔圧負荷を模す実験システムを開発し、内腔圧負荷の有無による細胞動態と形態 (特に枝と管腔の成長) の変化を定量的にモニターした。
 - 静水圧刺激から細胞動態変化へと変換されるメカノセンシング・トランスダクション機構の重要な因子と想定される細胞骨格タンパク (アクチン) の動態および YAP/TAZ タンパクの局在変化を、特に、静水圧負荷急性期に焦点を絞り組織学的に検討した。
- 2) 血管新生動態における内腔圧作用メカニズムの数理モデルを用いた解析
 - これまで構築したモデルをベースに、血管新生動態における内腔圧作用のメカニズムを解析し得る数理モデルを、セルラ・ポッツなどの枠組みで新たに構築した。
- 3) *ex vivo* および *in vivo* 血管新生における内腔圧回避メカニズムの組織学的解析
 - 微小流体デバイス上で HUVECs とヒト胎盤由来ペリサイトを共培養することで、ペリサイトが被覆した新生血管を誘導し、静水圧負荷による血管新生への作用の変化をペリサイトの有無で定量的に比較した。

- マウス網膜血管新生において、抗 PDGF β 受容体抗体を全身投与することでペリサイトの新生血管への被覆を阻害し、新生血管枝の伸長の程度と血管内腔形成の様式の差をペリサイトの被覆の有無で組織学的に比較した。

3. 結果

- 1) 内腔圧負荷による血管新生動態の変化と作用メカニズムの ex vivo 血管新生モデルでの解析
 - 培地の水圧差により新生血管内腔に自在に静水圧を負荷することができる簡易装置を開発した。実際に、差圧計を使って回路内の静水圧を計測したところ、ほぼ理論値通りに血管内腔に静水圧が負荷されていることが示された。
 - 微小流体デバイス上に再現された血管新生において、静水圧負荷により管腔形成が促進され、その後血管の伸長が停止するとともに先端細胞の極性が消失、最終的には血管構造の退縮に至る一連のプロセスを辿ることにより血管新生が抑制されることがわかった。また、内腔圧負荷を解除することで、一度伸長が止まった新生血管枝の先端細胞が再度極性化し、血管枝が再伸長した。すなわち、静水圧負荷による血管伸長停止は、アーチファクトでなく、静水圧上昇による新生血管の生理的な反応であることが示唆された。
 - 粒子画像流速計測法 (PIV) により静水圧負荷直後の血管形態変化を解析した結果、静水圧負荷に伴い血管円周方向と長軸方向同時に伸展張力が生じている可能性が示唆された。さらに、静水圧負荷による血管の拡張に伴い、伸長する新生血管に特徴的にみられる F-アクチンの血管長軸方向に沿った集積が消失していた。静水圧負荷早期の新生血管における YAP/TAZ の局在変化は認めなかった。
- 2) 血管新生動態における内腔圧作用メカニズムの数値モデルを用いた解析
 - Walter de Back (ドレスデン工科大学)、Alvaro Köhn-Luque (オスロ大学) らと共同で、Morpheus のプラットフォームを使い、血管新生における血管枝の伸長時の血管内皮細胞動態をシミュレートし得るモデルをセルラ・ポッツモデルの枠組みで構築した。
- 3) ex vivo および in vivo 血管新生における内腔圧回避メカニズムの組織学的解析
 - 微小流体デバイスを用いた実験系において、ペリサイトが被覆する状態で静水圧負荷をかけると、特に静水圧負荷による血管の退縮効果が抑制され、ペリサイトは内腔圧による血管新生抑制作用を回避する一つの責任細胞であることを同定した。
 - マウス網膜血管新生において、ペリサイトの被覆していない新生血管における内腔形成パターンを、管腔のマーカーとなる ICAM2 とペリサイトマーカーである NG2 により免疫組織学的に検討したが、その形成パターンはペリサイトが被覆した正常の新生血管とほぼ同様であった。すなわち、ペリサイトは内腔形成自体には大きな影響を与えていないことがわかった。

4. 考察 まとめ

以上の結果から、血管内腔圧は血管新生の新たな制御因子であることを同定した。その作用は多面的で、管腔形成といった側面では促進的に、また、血管枝の成長や安定といった面では抑制的に働いていることがわかった。さらに、血管枝の成長抑制メカニズムとして、血管内腔圧に伴う血管拡張が引き金となって血管壁に伸展張力を生じ、その張力により血管伸長に必要な血管長軸方向の F-アクチンの形成が阻害されることで血管が伸長できないと想定された。伸展張力がどのように感知・伝達されて、血管新生に特徴的な F-アクチンの形成阻害に至るのかというメカノセンシング・トランスダクション機構の詳細は、今後解決すべき重要な課題として残った。また、ペリサイトが血管内腔圧に対する内皮細胞の反応を調節する重要な役割を担っていることを発見した。個体内で生じる血管新生においては、常に内腔圧に晒されながら血管枝は成長する。これは、血管内腔圧が新生血管を抑制する結果と一見矛盾するように思われる。しかし、今回我々が見出したペリサイトの機能を考慮すると、ペリサイトが新生血管に生じる内腔圧負荷に対して抵抗的に働くことで、個体内の血管枝の成長の on/off を巧妙に調節しながら血管が形成されていると理解できる。今後、内皮細胞による血管内腔圧メカノセンシング・トランスダクション機構の解明とともに、ペリサイトが血管内腔圧による血管新生抑制作用を回避する分子メカニズムも併せて検討していく予定である。

血管新生は、虚血性疾患に限らず癌の進展、糖尿病性網膜症などの炎症性疾患など様々な病態に関与する。また、再生医療に向けた人工組織・器官の構築には、血管配置は欠かせない。血管新生を標的とした現行治療には限界があり、血管新生メカニズムを先例のない角度から包括的に解明する本研究は、次世代の画期的治療法開発に向けた視点や基盤を与え、臨床の現場へ大きく貢献する。さらに、本研究においては、生命現象において物理的力がどのように生じ、その力がどのように感知・伝達され生体反応として応答しているかを理解するための一つの視点を提供し、科学界への貢献も大きいと考えられる。

5. 参考文献

- 1) Arima S*, Nishiyama K*, Ko T, Arima Y, Hakozaki Y, Sugihara K, Koseki H, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H. *These authors contributed equally to this work. Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement. *Development* 2011;138(21):4763-76.
- 2) Sugihara K*, Nishiyama K***, Fukuhara S, Uemura A, Arima S, Kobayashi R, Köhn-Luque A, Mochizuki N, Suda T, Ogawa H, Kurihara H. *These authors contributed equally to this work. Autonomy and non-autonomy of angiogenic cell movements revealed by experiment-driven mathematical modeling. *Cell Rep* 2015;13(9):1814-27.
- 3) **Kim S**, Lee H, Chung M, Jeon NL. Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on chip. *Lab Chip* **2013**;13(8):1489-500.
- 4) **Nashimoto** Y, Hayashi T, Kunita I, Nakamasu A, Torisawa YS, Nakayama M, Takigawa-Imamura H, Kotera H, Nishiyama K, Miura T, Yokokawa R. Integrating perfusable vascular networks with a three-dimensional tissue in a microfluidic device. *Integr Biol*, 2017;9(6):506-518.