

生理的・病的血管新生の生体イメージング

日本医科大学 先端医学研究所 病態解析学部門

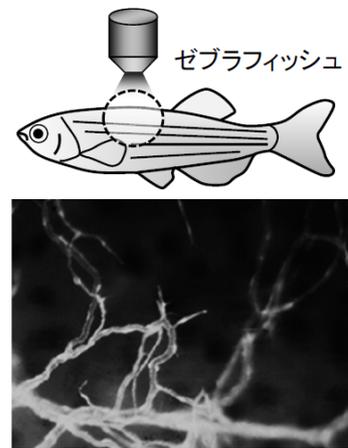
福原 茂朋

1. はじめに

血管新生は、既存の血管から血管枝が出芽し新たな血管網を構築する現象であり、生体にとって有益な“生理的な血管新生”と、逆に疾患の発症・進展に関わる“病的な血管新生”の二つに分類される。生理的な血管新生は、個体の発生や成長、創傷治癒、子宮内膜の発育や黄体形成、閉塞性動脈硬化症などの虚血性疾患において誘導され、生体恒常性維持に寄与している。一方、固形腫瘍や糖尿病網膜症などの眼の疾患、慢性関節リウマチなどの炎症性疾患では、病的な血管新生が惹起され、これら疾患の病態を悪化させる。このように血管新生は多岐に渡る生理機能や病態と関連しており、一言で血管新生といっても、その分子機序は多様である。よって、生体の恒常性維持機構やその破綻に起因する疾患の発症機序の理解には、血管新生の分子機序の多様性と普遍性の解明が重要である。しかし、技術的な問題から、これまで生体における血管新生の分子機序を、“細胞・分子レベル”で解析することが困難であったため、その理解は進んでいないのが現状である。

我々はこれまで、生命・医学研究に有用なゼブラフィッシュをモデル脊椎動物として用い、蛍光イメージング技術を駆使することで、生きた個体で細胞機能や分子活性を可視化するシステムを構築し、血管形成機構について研究を進めてきた(Dev. Biol. 2014; Development 2015; Dev. Cell 2015; Development 2016; Dev. Cell 2017他)(図1)。また最近、これまで困難であった成魚を長時間ライブイメージングする技術の開発にも成功している(未発表)。本申請研究では、これまでに我々が独自に確立した生体イメージング技術を踏襲して、生理的および病的な血管新生のプロセスを細胞生物学的および形態学的な視点で解析し、血管新生の分子メカニズムの多様性と共通性を解明することを目的とする。それにより、虚血性疾患に対する効果的な血管再生療法の開発、さらには病的な血管新生が関わる疾患の治療法の開発に向けた新しい分子基盤の構築を目指す。

図1 蛍光生体イメージングによる血管新生のライブイメージング



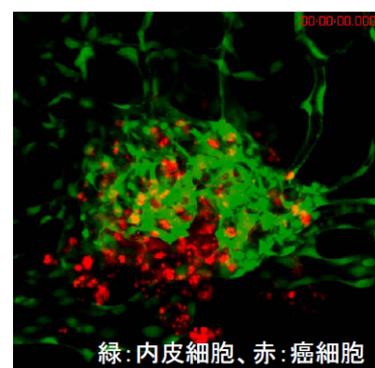
2. 方法

遺伝子改変ゼブラフィッシュ: 生体内の血管新生をライブで観察するため、血管内皮細胞および壁細胞(ペリサイト・血管平滑筋細胞)特異的プロモーター制御下で蛍光タンパク質を発現するゼブラフィッシュを樹立した。また、血管新生における内皮細胞動態を詳細に観察するため、内皮細胞で膜移行型蛍光タンパク質やアクチン細胞骨格を可視化する蛍光タンパク質を発現するゼブラフィッシュを作製した。

腫瘍血管新生の解析: Vascular endothelial growth factor (VEGF)を安定発現するヒト乳癌細胞MDA-MB-231を樹立した。細胞蛍光標識試薬PKH26でラベルした上記細胞を、内皮細胞で蛍光タンパク質を発現するゼブラフィッシュ幼魚に移植し、共焦点蛍光顕微鏡下で腫瘍血管新生を観察した。

創傷治癒における血管新生の解析: 内皮細胞および壁細胞がことなつた蛍光タンパク質で標識された成魚の皮膚に傷害を加え、我々が独自に開発した成魚の長時間ライブイメージング技術により、創傷治癒に伴う血管新生を観察した。具体的には、エアレーションした約400 ppmフェノキシエタノール含有飼育水を、挿管チューブを用いて成魚の口腔内に注入し麻酔をかけ、専用の観察用ディッシュに成魚を固定した。体幹部の皮膚にマイクロピンセットあるいはマイクロニードルで傷害を加え、血管新生により損傷血管がどのように再生されるか共焦点蛍光顕微鏡下で観察した。

図2 腫瘍血管新生のライブイメージング



緑: 内皮細胞、赤: 癌細胞

3. 結果

(1) 腫瘍血管新生の観察

VEGFを安定発現するヒト乳癌細胞MDA-MB-231をPKH26ラベルしたのち、内皮細胞でGFPを発現するゼブラフィッシュ幼魚の体幹部に移植し、腫瘍血管新生のプロセスを経時的に観察した。その結果、癌細胞の移植によって周囲の血管からの出芽が誘導され

た。また、出芽した血管が腫瘍内に侵入し、腫瘍血管を形成する様子が観察された(図2)。

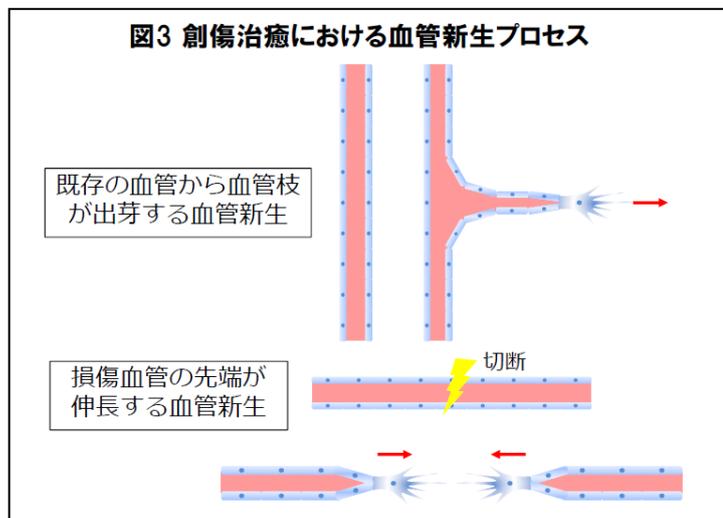
(2) 創傷治癒における血管新生の観察

創傷治癒における血管新生の制御機構を理解するため、まず、正常皮膚組織の血管を観察した。その結果、正常皮膚の毛細血管には、内皮細胞とペリサイトが2:1の比率で存在しており、内皮細胞2個に対して、ペリサイトが1個被覆していることが分かった。また、同一毛細血管を数ヶ月に渡って観察したところ、内皮細胞およびペリサイトはほとんど移動せず、分裂も認められなかった。このことから、正常皮膚の血管の内皮細胞およびペリサイトは休止状態にあり、それにより安定な血管構造を維持していることが示唆された。

創傷により血管新生が誘導されるか知るため、成魚の皮膚に傷害を加え、創傷治癒過程の血管をライブイメージングにより観察した。その結果、創傷によって内皮細胞は迅速に活性化し、血管新生を誘導することが分かった。また、創傷治癒過程では、非損傷血管からの出芽による血管新生に加え、損傷した血管断端の伸長による血管新生が活発に誘導されることが示された(図3)。また、筋肉層の血管網が損傷部位に移動する様子が観察された。この現象は、以前報告された創部にかかる張力依存的な血管形成に相当するものと考えられる(Nat. Med. 2009)。

次に、損傷血管が血管新生により修復される機構をより詳細に解析するため、成魚皮膚の毛細血管1本に500 μm程度の長さの傷害を加え、その後の修復過程の内皮細胞とペリサイトの動態を観察した。傷害後、3日程度で損傷血管の修復が見られ、傷害前と同程度の数の内皮細胞とペリサイトが修復血管を構築していた。しかし、その後も修復血管における内皮細胞およびペリサイトの数は増加を続け、一週間程度で傷害前の約2倍まで増加した。

その結果、修復血管は蛇行し血管の過形成が誘導された。その状態が2週間程度まで持続し、その後、徐々に修復血管を構成する内皮細胞およびペリサイトの数が減少し、3~4ヶ月後には傷害前と同定まで数が減少した。その結果として、一次的に蛇行した血管は直線状へと変化し、血管の正常化が誘導された。また、傷害血管の周囲の非損傷血管でも、同様に内皮細胞およびペリサイトの数が増加し、一次的に血管の過形成が見られたが、その後、3~4ヶ月かけて内皮細胞およびペリサイトの数は減少し、血管が正常化することがわかった。以上の結果から、創傷治癒過程の血管新生では、血管の過形成とその後の正常化のプロセスを介して、機能的な血管が構築されることが示唆された。



(3) 内腔圧による血管新生の制御機構

創傷治癒過程の血管新生における内皮細胞の動態をライブイメージングにより解析したところ、血流に対して下流側に位置する血管の内皮細胞が活発に遊走、増殖することで血管枝を伸長し、損傷血管を修復したのに対し、血流に対して上流側に位置する血管はほとんど伸長しないことを発見した。この現象が、創傷治癒における血管新生に特異的な現象であるのか知るために、幼魚の節間血管をレーザー光により焼灼し、その後の修復過程をライブイメージングにより観察した。その結果、創傷治癒における血管新生のときと同様に、血流に対して下流側の血管枝が伸長し損傷を修復したのに対し、上流側の血管枝はほとんど伸長しなかった。このことから、損傷血管の下流側からの伸長は、血管新生において保存された現象であることが示唆された。

次に、損傷血管の伸長が血流に対して下流側から起こり、上流側から起こらないメカニズムについて解析を行った。まず、下流側では血液が供給されないため虚血状態が高く、そのため血管伸長が活発に誘導されるのではないかと考え、この仮説について検討した。しかし、損傷血管の下流側と上流側で虚血状態に違いは認められず、この仮説は否定された。

損傷血管の上流側では心臓のポンプ機能によって内腔圧が高く、下流側では内腔圧が低いことが想定される。そこで、血圧に起因する内腔圧が血管新生における血管伸長を制御しているか検討するため、まず、マイクロ流体デバイスを用いて *in vitro* で血管新生を誘導し、この仮説の検証を行った(熊本大学 西山功一博士との共同研究)。その結果、伸長する血管内腔に2 mmHg程度の圧力を負荷したところ、内腔圧を負荷していない群に比べて血管伸長が顕著に抑制された。このことから、内腔圧が血管伸長を抑制する可能性が示唆された。次に、生体内においても、内腔圧が血管伸長を抑えているのか検討した。具体的には、成魚皮膚の毛細血管に傷害を加え、上流損傷血管のさらに上流部位に傷をつけることで上流損傷血管の内腔圧を除去し、その後の血管伸長を観察した。その結果、内腔圧を除去した上流損傷血管は、下流損傷血管と同程度まで伸長するようになった。これらの結果から、上流損傷血管の伸長は、内腔圧により抑制されていることが示唆された。

以上の結果から、創傷により血管が損傷を受けると、血管新生が誘導されるが、その際、血流に対して下流側の損傷血管が活発に伸長することで損傷を修復するのにに対し、上流損傷血管では内腔圧が高く、血管の伸長が抑えられていることが示唆された。これにより、内腔圧による血管新生の新たな制御機構の存在を示した。

4. 考察

今回、血管新生の制御機構における多様性と普遍性を理解するため、生理的な血管新生として創傷治癒における血管新生を、また病的な血管新生として腫瘍血管新生を蛍光イメージングにより観察した。腫瘍血管新生については、癌細胞周囲に存在する血管から新たな血管枝が出芽・伸長し、腫瘍血管を形成することが分かった。今後、腫瘍血管新生における内皮細胞の動態を詳細に解析するとともに、腫瘍血管におけるペリサイトの動員についても解析を進めていく。また、創傷治癒における血管新生では、既存の血管からの出芽による血管新生に加えて、損傷血管の伸長による血管新生が活発に誘導されることが分かった。また、損傷血管の修復は、血管の過形成と正常化のプロセスを介して起こることが示された。さらに、損傷血管の修復過程のライブイメージング解析から、内腔圧が血管新生における血管伸長を負に制御していることを発見し、内腔圧による血管新生の新たな制御機構の存在を示した。

本研究によって、皮膚の創傷治癒では、損傷血管は修復後も成長を続け、一時的に血管の過形成を引き起こし、その後、正常化することが分かった。最近、マウスの耳に傷害を加えた際の創傷治癒過程においても、蛇行した血管が形成されることが報告された (*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017)。血管の蛇行部位から内皮細胞の出芽が頻繁に観察されたことから、同論文では、血管の過形成は血管新生における血管の出芽に関与する可能性を示唆している。しかし、我々の解析では、蛇行した血管から必ずしも出芽が起こるわけではなく、そのまま正常化する血管も多数見られたことから、今後、血管新生における血管の過形成の意義についてはさらなる検討が必要である。また、血管の過形成が誘導される際に、内皮細胞だけでなくペリサイトも増加し、過形成した蛇行血管を被覆することを発見した。通常、血管新生が誘導されると、VEGFなどの血管新生因子が血管壁からペリサイトを乖離させ、血管新生を誘導すると考えられている。そのため、今回発見したペリサイトが過形成した血管を被覆する現象は、これまで考えられてきた血管新生プロセスとは矛盾するものであり、今後この現象についてさらに解析を進めていく。

本研究により、損傷血管が修復される際に、血流に対して上流に位置する損傷血管は、内腔圧によってその伸長が抑制されていることが示された。今後、内腔圧が血管新生における血管伸長を抑制する分子メカニズムについて解析を進める。また、内腔圧による血管新生の障害が、生理的および病的な血管新生においてどのような生物学的な意義を有するのか明らかにしていくことで、虚血性疾患に対する効果的な血管再生療法の開発や病的な血管新生がかかわる疾患の治療法の開発に繋げていく。

5. 参考文献

1. Fukuhara S. (Co-corresponding author), Zhang J., Yuge S., Ando K., Wakayama Y., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A., Mochizuki N. Visualizing the cell-cycle progression of endothelial cells in zebrafish. *Dev. Biol.* 393: 10-23 (2014).
2. Kashiwada T., Fukuhara S. (Co-corresponding author), Terai K., Tanaka T., Wakayama Y., Ando K., Nakajima H., Fukui H., Yuge S., Saito Y., Gemma A., Mochizuki N. β -Catenin-dependent transcription is central to Bmp-mediated formation of venous vessels. *Development* 142: 497-509 (2015).
3. Wakayama Y., Fukuhara S. (Corresponding author), Ando K., Matsuda M., Mochizuki N. Cdc42 mediates Bmp-induced sprouting angiogenesis through Fmn13-driven assembly of endothelial filopodia in zebrafish. *Dev. Cell* 32: 109-122 (2015).
4. Ando K., Fukuhara S. (Co-corresponding author), Izumi N., Nakajima H., Fukui H., Kelsh R.N., Mochizuki N. Clarification of mural cell coverage of vascular endothelial cells by live imaging of zebrafish. *Development* 143:1328-1339 (2016).
5. Nakajima H., Yamamoto K., Agarwala S., Terai K., Fukui H., Fukuhara S., Ando K., Miyazaki T., Yokota Y., Schmelzer E., Belting H.-G., Affolter M., Lecaudey V., Mochizuki N. Flow-dependent endothelial YAP regulation that contributes to vessel maintenance. *Dev. Cell* 40 (6): 523-536 (2017).
6. Kilarski W.W., Samolov B., Petersson L., Kvanta A., Gerwins P. Biomechanical regulation of blood vessel growth during tissue vascularization. *Nat. Med.* 15: 657-664 (2009).
7. Chong D.C., Yu Z., Brighton H.E., Bear J.E., Bautch V.L. Tortuous Microvessels Contribute to Wound Healing via Sprouting Angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37: 1903-1912 (2017)