

## 124. 血管の構造形成を制御する新規血球サブセットの同定

木戸屋 浩康

大阪大学 微生物病研究所 情報伝達分野

Key words : 血管形成, 好中球, 発生, 生体イメージング

### 緒言

血管は生体の隅々まで張り巡らされており、生命を維持するための基礎となる最大の組織である。そのため、血管構造を理解して形成機構を解明する「血管研究」は組織再生や疾病治療の面から注目されている。これまでの血管研究により、VEGF（血管内皮細胞増殖因子）ファミリーをはじめとする多数の血管新生誘導因子が発見され、血管形成を開始させるメカニズムが詳細に解明されている<sup>1)</sup>。これらの成果から、血管形成を制御することがある程度は可能となっており、医薬品などの開発へと応用され実用化が進められている。しかしながら、現在の血管制御療法は血管の「数」の増減だけに注目しており、処置後の血管の「質」の低さから導かれる、早期血管退縮や血管透過性亢進などの副作用が重大な問題となっている。そのため近年の血管研究のトレンドは血管の「質」を改善する方向へと視点が移ってきており、形成後の血管の成熟化や安定化、およびモデリングに関する研究に注目が集まっている<sup>2)</sup>。

我々もこれまでに、血管の「質」の制御という概念に基づいて血管成熟化へ関与する因子の探索を行い、血管径のサイズと安定化を制御する apelin-APJ 系を同定した<sup>3)</sup>。それまでに血管成熟化の分子機構はほとんど明らかになっておらず、apelin は最初に同定された血管成熟化因子であるといえる。さらに、血管再生や、腫瘍血管に対する治療効果に対して有効性を示すことを明らかにしてきた<sup>4,5)</sup>。しかしながら、血管系は動脈・静脈・毛細血管といった様々な管の立体的な配置によって形成されている複雑な組織であり、真の血管形成制御を誘導する上では、血管をより高次的な「血管組織」として捉える必要がある。そこで本研究では、血管系がどのような過程で階層性を構築し、秩序ある走行性を獲得するかを、細胞および分子レベルにて解析を行う。このように対象を血管の「数」から「質」へ、さらには「構造」へと対象を切り変えた新しい血管研究は、既存の血管新生制御法とは全く異なる概念の血管治療法の開発に繋がるものとして期待できる。

血管組織の構造編成のメカニズム解明の糸口として我々が注目しているのは、血管形成を制御する血球系細胞群である。我々は、マウス胎児の皮膚発生モデルの組織学的な解析を進め、その結果、好中球様の特殊な細胞群が形成過程の血管周囲に蓄積することを発見した。腫瘍血管新生における好中球の関与については報告があるが、発生過程での血管形成における好中球系細胞の役割は、これまでに全く報告されていない。本研究では、動脈・静脈・毛細血管から構成される高次的な「血管組織」が、どのようなメカニズムによって制御されているかを、好中球様細胞と血管の相互作用に注目して解明する。まず、血管形成に関与する好中球様のサブセットがどのような特徴を持っているかを細胞表面マーカーの解析から同定し、血管関連好中球として定義付けする。また、この細胞群がどのようなシグナル系によって血管周囲にリクルートされてくるのか、さらにはどのような分子機構によって血管構造の編成を制御しているのかを検討する。加えて、多光子顕微鏡を用いた *in vivo* イメージングを駆使して、実際に生体内で好中球がどのように「血管組織」の形成に関与しているかを詳細に検討を進める。これまで未知であった血管構造編成の制御機構を明らかにすることは、新概念に基づいた血管制御法の開発に繋がることとして医療応用が期待できる。

### 方法および結果

これまでの解析により、胎生 14.5 日目の胎児皮膚において血管周囲へ好中球様の細胞群がリクルートすることが確認できていた (図 1A)。そこで、この好中球様細胞の血管形成への影響を検討するため、好中球に特異的な殺細胞機

能がある中和抗体（クローン名 RB6-8C5）の投与によって好中球を除去し、血管形成への影響を検討した。妊娠 10 日目および 13 日目の雌マウスに 0.2 mg の RB6-8C5 抗体を腹腔内投与したところ、胎児皮膚から好中球が減少することが確認できた（図 1B）。そこで、胎生 15.5 日目の胎児皮膚を回収し、血管を染色できる CD31 抗体を用いたホルマウント免疫染色法を行い、共焦点顕微鏡にて写真を撮影することで、立体的な血管構造を解析した。その結果、血管の走行性に大きな異常が認められ、特に通常では秩序だって併走するはずの動脈と静脈が、著しく解離していた（図 1C）。このことから、血管周囲の好中球は正常な血管構造を編成するために重要な役割を果たすことが示唆された。

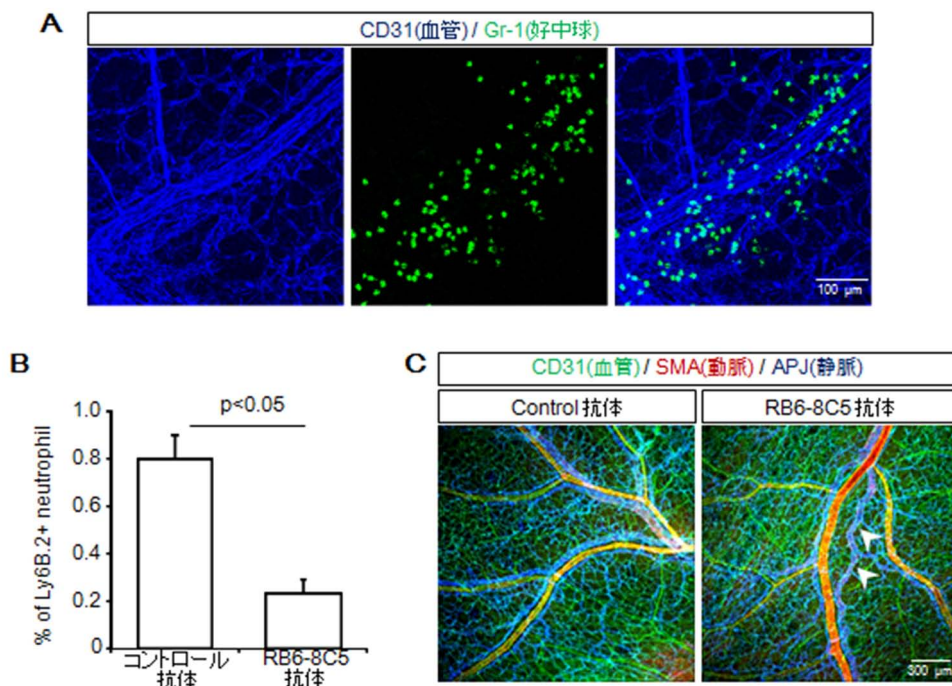


図 1. 好中球様細胞が血管の構造形成に関与する

(A) 胎生 14.5 日目の胎児皮膚を免疫染色した。血管（青色）を CD31 抗体にて、好中球（緑）を Gr-1 抗体にて染色している。血管の周囲に好中球系細胞が動員されている。(B) RB6-8C5 抗体を妊娠マウスに投与することによって、胎児皮膚における好中球の減少が確認できた。(C) RB6-8C5 抗体の投与にて好中球を減少させると、胎児皮膚の静脈血管（水色）の走行性に大きな乱れが確認された（矢頭）。胎生 14.5 日目の胎児皮膚の血管（緑色）を CD31 抗体にて、動脈（黄色）を SMA にて、静脈（水色）を APJ 抗体にて免疫染色している。

血管形成に関与する好中球様細胞の存在が示されたため、続いて、この好中球の詳細な解析を進めることにした。ミエロイド系の細胞に対する各種抗体にて胎児皮膚を免疫染色したところ、血管周辺に蓄積しているのは Ly6B.2 を発現している好中球である事が明らかとなった（図 2A）。そこで、この好中球画分の細胞表面マーカーによる詳細な定義付けを行うため、胎生 14.5 日目の胎児皮膚から細胞を回収してフローサイトメトリー解析を行った。CD45 抗原を発現している血球細胞の中から、Ly6B.2 陽性と陰性の細胞群について比較すると、Ly6B.2 陽性細胞は F4/80 を弱く発現している特殊な細胞である事が明らかとなった。さらに、各種血球系マーカーにて解析すると、CD11b 陽性、Gr-1 陽性、Ly6C 陽性、Ly6G 陰性の細胞群として同定された（図 2B）。このような細胞はマクロファージ系の細胞群とも考えられるため、Ly6B.2 陽性の細胞をフローサイトメーターにて単離回収し、サイトスピンを行ってメイ・ギムザ染色したところ、好中球の特徴である分葉核が確認された（図 2C）。以上の結果から、Ly6B.2 陽性・F4/80 弱陽性・Ly6C 陽性・Ly6G 陰性の血管関連好中球を、新たな細胞群として定義付けすることができた<sup>6)</sup>。

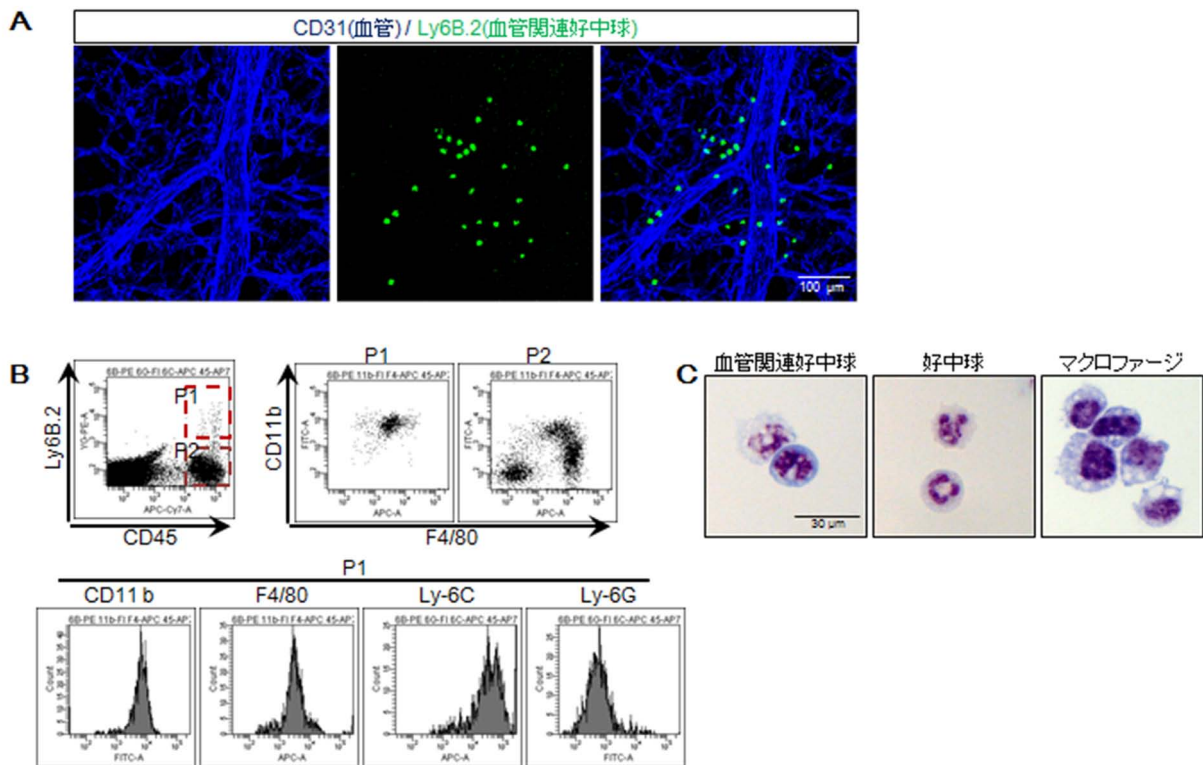


図2. 血管関連好中球の同定と解析

(A) 胎生 14.5 日目の胎児皮膚の血管（青色）を CD31 抗体にて、血管関連好中球（緑）を Ly6B.2 抗体にて免疫染色した。血管の周囲の好中球系細胞は Ly6B.2 が陽性である。(B) 胎生 14.5 日目の胎児皮膚における Ly6B.2 陽性細胞に対して、フローサイトメトリーによる細胞表面マーカーの解析を行った。CD45 陽性の血球細胞の中で、Ly6B.2 陽性 (P1) と陰性 (P2) の細胞群について比較すると、Ly6B.2 陽性細胞は F4/8 が弱陽性であった。また、CD11 陽性、Gr-1 陽性、Ly6C 陽性、Ly6G 陰性であった。(C) Ly6B.2 陽性の細胞を単離しメイ・ギムザ染色した。比較として示した好中球と類似した分葉核が確認され、マクロファージとは形態が異なっていた。

血管形成過程における血管構造の動的な変化は、旧来の組織切片による解析では詳細に捉えることが困難である。血管の構造編成と好中球との関連性をより明確にするため、多光子顕微鏡を用いた生体イメージング系の確立を目指すことにした。血管を可視化できるマウス (Neovessel-tdTomato マウス) は既に樹立できているため (図 3A)、血管関連好中球を可視化できるマウスの作製に着手した。遺伝子発現解析による検討にて、血管関連好中球は BVN1 遺伝子を特異的に発現していることが確認できていたため、このプロモーター領域下で GFP を発現するマウスを作製した。転写開始点から 4,000 bp 上流までのプロモーター領域をクローニングし、トランスジェニックマウスを作製した (図 3B)。

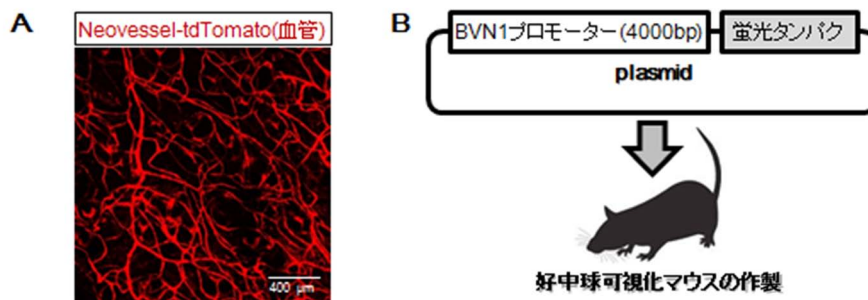


図3. 血管と好中球の生体イメージング系の構築

(A) 血管を可視化できるマウス (Neovessel-tdTomato マウス) の耳の血管を多光子顕微鏡で撮影した。血管は赤色の蛍光を発している。(B) 血管関連好中球に特異的に発現しているのは BVN1 のプロモーター領域 (4,000 bp) の制御下で GFP を発現するマウスを作製した。

## 考 察

本研究成果から、胎児の発生過程において血管形成に関与する新規の血管関連好中球が同定された。今後は、血管関連好中球の遺伝子発現プロファイリングを進めることで、より詳細な定義づけを進めるとともに、どのような分子機構にて血管形成に関与しているか、また、どのようなシグナルによって血管周囲にリクルートされるのかを明らかにしていきたい。また、作製中のイメージングマウスを用いた解析は、血管の構造編成がどのように制御されているのかを時間・空間的に明らかにすることが可能であり、これまで予想もされなかった現象の発見に繋がると思われる。血管関連好中球は、発生過程のみならず、腫瘍形成や各種病態にも関与している可能性を示唆するデータも得られており、新たな概念に基づく創薬標的としても期待できる。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、大阪大学微生物病研究所情報伝達分野の高倉伸幸および村松史隆、林弓美子である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003 Jun;9 (6) :669-76. Review.
- 2) Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011 May 19;473 (7347) :298-307. doi: 10.1038/nature10144. Review.
- 3) Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, Fujii R, Takakura N. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J.* 2008 Feb 6;27 (3) :522-34. doi: 10.1038/sj.emboj.7601982. Epub 2008 Jan 17.
- 4) Kidoya H, Naito H, Takakura N. Apelin induces enlarged and nonleaky blood vessels for functional recovery from ischemia. *Blood.* 2010 Apr 15;115 (15) :3166-74. doi: 10.1182/blood-2009-07-232306. Epub 2010 Feb 25.
- 5) Kidoya H, Kunii N, Naito H, Muramatsu F, Okamoto Y, Nakayama T, Takakura N. The apelin/APJ system induces maturation of the tumor vasculature and improves the efficiency of immune therapy. *Oncogene.* 2012 Jul 5;31 (27) :3254-64. doi: 10.1038/onc.2011.489. Epub 2011 Oct 31.
- 6) Kidoya H, Naito H, Muramatsu F, Yamakawa D, Jia W, Ikawa M, Sonobe T, Tsuchimochi H, Shirai M, Adams RH, Fukamizu A, Takakura N. APJ Regulates Parallel Alignment of Arteries and Veins in the Skin. *Dev Cell.* 2015 May 4;33 (3) :247-59. doi: 10.1016/j.devcel.2015.02.024. Epub 2015 Apr 23.