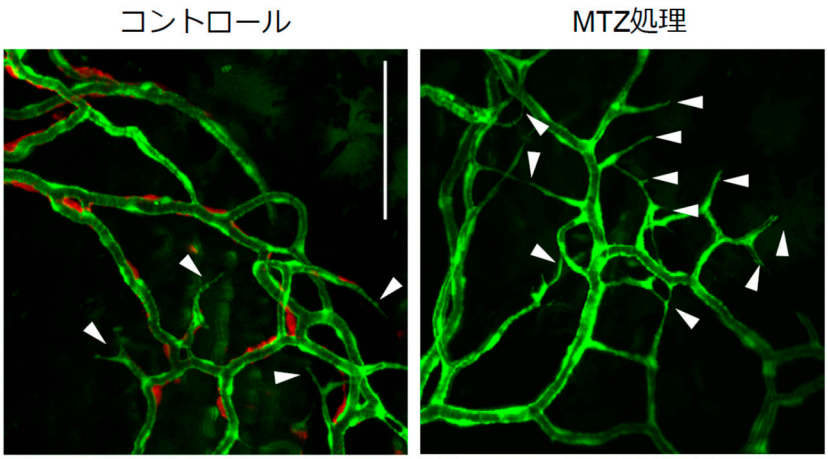
48　血管新生と血管構造の維持におけるペリサイトの役割	福原　茂朋

【目的】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が被覆している。ペリサイトは、血液脳関門の形成・維持に重要であり、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。しかし、末梢組織の毛細血管を被覆するペリサイトの機能に関しては、ほとんど研究が進んでいない。一方、組織が虚血状態に陥ると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。これまで血管新生では、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。また、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、ゼブラフィッシュ成魚の長時間ライブイメージング法を独自に確立し、成魚皮膚の創傷治癒過程の血管新生における内皮細胞・ペリサイトの動態を数ヶ月に渡って詳細に観察した。その結果、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。これらの知見は、「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」という従来から信じられてきた血管新生におけるペリサイトの機能とは明らかに矛盾する。そこで我々は、「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、本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機能とその制御機構の解明を目的とした。

【方法】ニトロ還元酵素（Nitroreductase : NTR）／メトロニダゾール（Metronidazole : MTZ）システム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ゼブラフィッシュを樹立し、ペリサイト存在下及び非存在下における、創傷治癒に伴う血管新生を蛍光ライブイメージングにより解析した。

【結果】ペリサイト存在下及び非存在下で創傷により血管新生を誘導したところ、ペリサイト存在下のときに比べ、ペリサイト非存在下では、血管枝の出芽数が優位に多かった。また、ペリサイト存在下では、損傷血管は一直線状に伸長し、損傷前と同様に走行する血管を再生したのに対し、ペリサイトを除去した損傷血管は蛇行して伸長し、損傷前と異なる血管ネットワークを形成した。以上の結果から、ペリサイトは血管新生における過剰な出芽を制限するとともに、血管の伸長方向を制御していることが示された。

ペリサイト除去により血管新生における血管枝の出芽が増加する



48. 血管新生と血管構造の維持におけるペリサイトの役割

福原　茂朋

日本医科大学 先端医学研究所 分子細胞構造学分野

Key words：血管新生，血管恒常性，ペリサイト，蛍光イメージング，ゼブラフィッシュ

緒　言

血管は全身の細胞に酸素や栄養を供給する生命維持に必須のライフラインであり、その異常は多岐に渡る疾患と関連する。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が被覆している［1］。ペリサイトは、血液脳関門の形成・維持に重要であり、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。しかし、末梢組織の毛細血管を被覆するペリサイトの機能に関しては、ほとんど研究が進んでいない。一方、組織が虚血状態に陥ると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。これまで血管新生では、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［2］。また、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［2］。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、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、血管形成の制御機構を研究し、その一端を解明した［3，4］。また、生体内のペリサイトの動態を高解像度でイメージング可能なゼブラフィッシュを世界ではじめて樹立し、ペリサイトが血管を被覆する機序を示した［5，6］。

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の長時間ライブイメージング法を独自に確立し、成魚皮膚の創傷治癒過程の血管新生における内皮細胞・ペリサイトの動態を数ヶ月に渡って詳細に観察した［7］。その結果、損傷後 2 日目から損傷血管の伸長と非損傷血管からの出芽が誘導された。さらに、損傷後 4 日目には、血管の出芽・分岐・吻合が活発に起こり、血管内皮細胞の増殖により多くの血管が蛇行し、損傷後 7 日目には、無秩序な高密度の血管網が形成された。興味深いことに、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。その後、数ヶ月に渡って血管内皮細胞、ペリサイトが徐々に消失し、血管が正常化することが示された。これら知見は、「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」という従来から信じられてきた血管新生におけるペリサイトの機能とは明らかに矛盾する。そこで我々は、「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、本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機能とその制御機構の解明を目的とした。

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

生理的及び病的な血管新生におけるペリサイトの真の機能を明らかにするため、ニトロ還元酵素（Nitroreductase：NTR）／メトロニダゾール（Metronidazole：MTZ）システム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。NTR は MTZ をアポトーシス誘導物質へと変換する酵素で

ある。ペリサイトを含む壁細胞でアクティブな *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)* フィッシュを樹立し、血管内皮細胞を可視化する *Tg (kdrl:EGFP)* フィッシュと交配した（図 1）。同フィッシュ成魚の皮膚の観察により、*kdrl:EGFP* 陽性の内皮細胞を被覆するペリサイトにおける NTR-mCherry の発現が認められた。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の樹立に成功した。

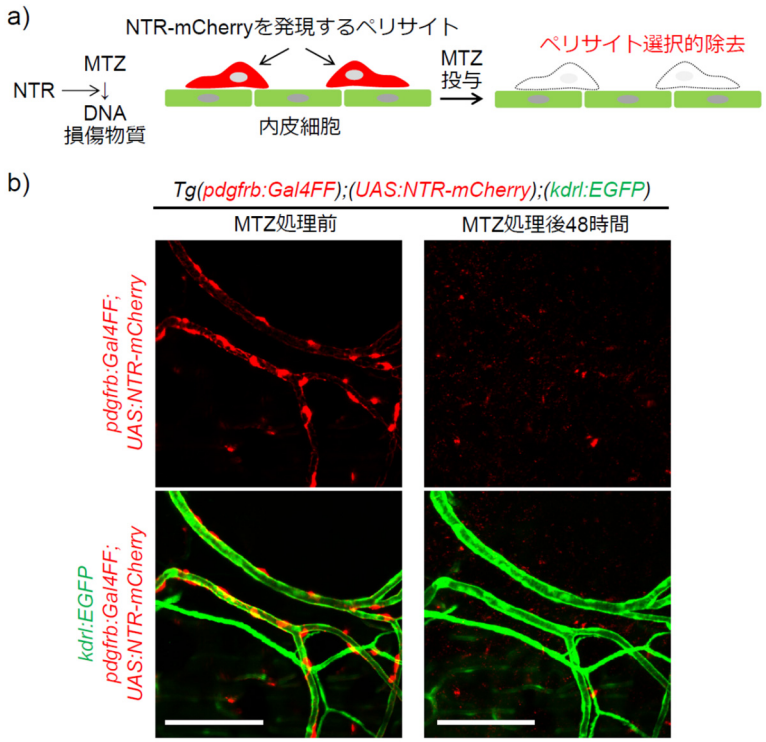


図1. ペリサイトをコンディショナルに除去可能なゼブラフィッシュの樹立

a) ペリサイトで NTR-mCherry を発現するゼブラフィッシュを MTZ で処理すると、MTZ が DNA 損傷物質に変換され、ペリサイトがアポトーシスにより除去される。

b) *TgBAC(pdgfrb:Gal4FF);(UAS:NTR-mCherry);(kdrl:EGFP)*ゼブラフィッシュ成魚を MTZ で 48 時間処理することによりペリサイトを除去した。
上：ペリサイト（赤）、下：ペリサイト（赤）及び血管内皮細胞（緑）（スケールバー：100 μm）。

2. ペリサイト非存在下において創傷により血管新生を誘導した際の内皮細胞動態の解析

1 で開発したシステムを用いて、MTZ 処理により成魚のペリサイトを除去したのち、皮膚に損傷を加え、血管新生を誘導した。その結果、コントロールフィッシュと同様に、損傷血管の伸長と非損傷血管からの出芽が起こり、損傷後 1～2 週間目には、密度の高い血管網が構築された。その後、血管の退縮・リモデリングが徐々に起こり、1～2 ヵ月後には秩序だった血管網が形成された。血管新生誘導時の内皮細胞動態を詳細に解析したところ、コントロールに比べ、ペリサイトを除去した群では血管枝の出芽数が優位に多いことが分かった（図 2）。さらに、コントロールでは、損傷血管は一直線状に伸長し、損傷前と同様に走行する血管を再生したのに対し、ペリサイトを除去した損傷血管は蛇行して伸長し、損傷前と異なる血管ネットワークを形成した。以上の結果から、ペリサイトは血管新生における過剰な出芽を制限するとともに、血管の伸長方向を制御していることが示された。

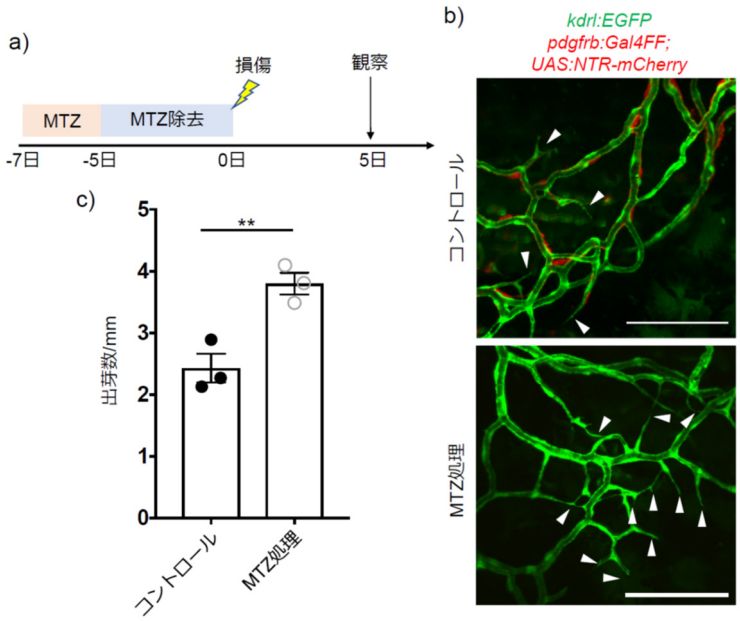


図2. ペリサイト非存在下における創傷治癒過程の血管新生の解析

a) *TgBAC(pdgfrb:Gal4FF);(UAS:NTR-mCherry);(kdrl:EGFP)*ゼブラフィッシュ成魚を MTZ で 2 日間処理することでペリサイトを除去し、その 3 日後に皮膚に創傷を加え血管新生を誘導した。損傷後 5 日目の血管を観察した。

b) コントロールフィッシュ（上）及びペリサイトを除去したフィッシュ（下）において創傷による血管新生により形成された血管の観察。赤：ペリサイト、緑：血管内皮細胞（スケールバー：100 μm）。

c) ペリサイト存在下（コントロール、n=3）及び非存在下（MTZ 処理、n=3）で血管新生を誘導した際に観察された血管枝の出芽数。**$p<0.01$（t-test）。

3. 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

Tg（pdgfrb:Gal4FF）；（*UAS:NTR-mCherry*）フィッシュを用いてペリサイトを除去したのち、ペリサイトの再出現が認められなかったことから、同フィッシュでは再出現するペリサイトを標識できていない可能性を考えた。これを検証するため、*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、*pdgfrb:Gal4FF*、*UAS:NTR-mCherry* 陰性細胞の出現が認められた。よって、1 の系では一時的にペリサイトの除去はできるが、その後に再出現するペリサイトを検出できないことが分かった。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 Tg 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-epNTR* 陽性ペリサイトが再出現することが分かった。現在、このシステムを用いて、再度、血管新生におけるペリサイト除去の効果を検討している。

4. 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

ゼブラフィッシュを用いて、腫瘍血管新生における内皮細胞、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*$^{-/-}$、*il2rga*$^{-/-}$）を入手し、*Tg（kdrl:EGFP）*；*（pdgfrb:mCherry）*フィッシュと交配した。同フィッシュに iRFP670 で蛍光標識した MDA-MB-231 ヒト乳腺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、腫瘍血管新生を解析するため、移植がん細胞の生着率向上を図っている。

考　察

今回、血管新生におけるペリサイトの機能を解析するため、NTR/MTZ システム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系を確立し、ペリサイト非存在下における創傷時血管新生を解析した。その結果、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された。しかし、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たことから、本実験では血管新生過程の一部のペリサイトの機能しか阻害できておらず、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、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。また、ペリサイト除去により正常皮膚血管がどのように影響を受けるか解析することで、正常血管におけるペリサイトの機能を明らかにしていく。

今回、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、ペリサイトが *de novo* で再生する機構が存在すること示唆しており、そのメカニズムについても今後解析を行っていく。

現在、構築している腫瘍血管新生のライブイメージング系を利用して、腫瘍血管新生におけるペリサイトの動態を詳細に解析し、生理的および病的な血管新生におけるペリサイトの真の機能を明らかにしていく。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、日本医科大学先端医学研究所病態解析学部門分子細胞構造学分野の石井智裕助教、弓削進弥助教、安藤康史講師である。

文　献

1) Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. Dev Cell. 2011 Aug 16;21(2):193-215. doi: 10.1016/j.devcel.2011.07.001. PMID: 21839917

2) Eelen G, Treps L, Li X, Carmeliet P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. Circ Res. 2020 Jul 3;127(2):310-329. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316851. Epub 2020 Jul 2. PMID: 32833569

3) Fukuhara S, 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. 2014 Sep 1;393(1):10-23. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.06.015. Epub 2014 Jun 26. PMID: 24975012

4) 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. Dev Cell. 2015 Jan 12;32(1):109-22. doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.024. PMID: 25584797

5) Ando K, Fukuhara S, Izumi N, Nakajima H, Fukui H, Kelsh RN, Mochizuki N. Clarification of mural cell coverage of vascular endothelial cells by live imaging of zebrafish. Development. 2016 Apr 15;143(8):1328-39. doi: 10.1242/dev.132654. Epub 2016 Mar 7. PMID: 26952986

6) Ando K, Wang W, Peng D, Chiba A, Lagendijk AK, Barske L, Crump JG, Stainier DYR, Lendahl U, Koltowska K, Hogan BM, Fukuhara S, Mochizuki N, Betsholtz C. eri-arterial specification of vascular mural cells from naive mesenchyme requires Notch signaling. Development. 2019 Jan 25;146(2):dev165589. doi: 10.1242/dev.165589. PMID: 30642834

7) Noishiki C, Yuge S, Ando K, Wakayama Y, Mochizuki N, Ogawa R, Fukuhara S. Live imaging of angiogenesis during cutaneous wound healing in adult zebrafish. Angiogenesis. 2019 May;22(2):341-354. doi: 10.1007/s10456-018-09660-y. Epub 2019 Jan 4. PMID: 30607697