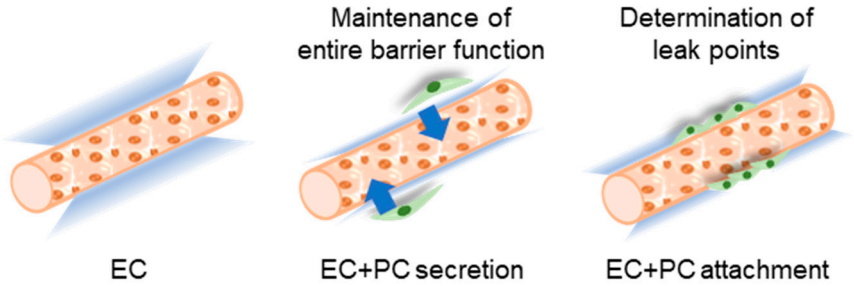
202　壁細胞が制御する血管恒常性解析モデルの確立	中島　忠章

【目的】毛細血管は酸素と栄養素の送達の役割を持ち、血管内部から内容物を漏出させることにより栄養素を各組織に運搬している。しかし、その漏出の量と場所がどのように制御されているか、という毛細血管機能の根幹については解明されていない。毛細血管を含む微小血管は、内腔に裏打ちされた内皮層と、それを囲むように配置された壁細胞よりなり、この壁細胞が血管透過性を制御していると考えられている。また血管透過性は血管微小環境（VME）に応じて変化する。糖尿病などの各種生活習慣由来の疾患においては、VME における生活習慣由来因子の変化によって、血管透過性が亢進することでその病状が悪性化し、その制御に壁細胞が関与していると考えられている。特に糖尿病性網膜症においては、壁細胞が網膜の毛細血管から剥離することで被覆率が減少し、血管の透過性が亢進することで発症するモデルが提唱されている。本研究においては、各組織由来の壁細胞が血管透過性に与える影響を *in vitro* で見える化するデバイスを開発し、そのデバイスを用いて、生活習慣由来因子の代表例として高血糖を模倣した VME が、血管透過性に与える影響を直接観察できる系を確立することを目的とした。

【方法】ポリジメチルシロキサン製のデバイス内にニードルを挿入してコラーゲンをゲル化させることで内腔を作製し、その内腔内にヒト血管内皮細胞単独または内皮細胞と同時に末梢・脳・胎盤由来壁細胞を播種することによって、内皮細胞のみで形成されたヒト微小血管モデルと、末梢・脳・胎盤由来の壁細胞と共培養したヒト微小血管モデルを作製した。この微小血管モデルを培養後、蛍光標識したデキストランを内腔より処理し、コラーゲンゲル側への拡散性を検出することで、壁細胞が血管透過性に与える影響を評価した。また、培養時に D-glucose 濃度を高めて高血糖 VME を模倣し、血管透過性に与える影響を解析した。

【結果】壁細胞は由来組織に関わらず内腔からの透過量を抑制した。壁細胞由来の血管透過性を抑制する分泌因子として知られているアンジオポイエチン 1 の遺伝子を、壁細胞にてノックダウンしたところ、壁細胞による透過量の抑制がキャンセルされたため、壁細胞は主に分泌によって血管透過量を抑制したことが示唆された。また、内皮細胞層に結合するタイプの壁細胞においてのみ、内腔からの漏出場所が局在化したため、壁細胞は内皮細胞への接着を介して漏出場所の制御を行っていると考えられる。高血糖 VME は、内皮細胞単独の微小血管モデルの透過性を変化させなかったが、壁細胞と共培養した微小血管モデルにおいて透過性を亢進させたことより、壁細胞が高血糖 VME を感受して、透過性を亢進させたと考えられる。本研究により確立された壁細胞共培養型ヒト微小血管モデルとその評価法を用いていることで、実際に生体の VME において常に変化している様々な生活習慣由来の弱い影響力を持つ因子が、微小血管の透過性に与える影響の解析に応用できる。

壁細胞の分泌と接着を介して制御される血管透過性



202. 壁細胞が制御する血管恒常性解析モデルの確立

中島　忠章

*東京大学 生産技術研究所 機械生体系部門 医用バイオ工学研究室

Key words：壁細胞，微小血管，血管透過性，高血糖，画像解析

緒　言

一般的に、血管は動脈より送られた血液成分を細動脈側の毛細血管より漏出し、組織に酸素と栄養を届け、細静脈側の毛細血管より老廃物を含んだ組織液を回収して循環していると考えられている。一方近年マウスを用いた研究より、毛細血管の役割は、主に血液成分の漏出による酸素と栄養素の送達であり、それは細静脈側の毛細血管からのみ発生することが報告された［1］。この細静脈側の毛細血管での漏出は一様に起こるものではなく、漏れる場所と漏れない場所が明確に決まっている。しかし、どこで血液成分が漏出するかを決める機構は未解明である。つまり現状では、毛細血管がどのようにして必要な場所に酸素と栄養を送達しているか、という循環器系の最も基礎的といえる現象の理由が不明なままといえる。血管バリアは内皮細胞によって構成されており、壁細胞は内皮細胞を取り巻く周皮細胞である。壁細胞は血管の部位ごとに形態を変化させ、分泌因子と、内皮細胞に直接接着することの両方を介して、血管の透過性を抑制していると考えられている［2，3］。また、脳内においては血流量維持にも必須であり［4］、壁細胞の数の減少や機能の低下は、様々な疾患を引き起こすと考えられている。この壁細胞は運動性の高い間葉系の細胞であるため、壁細胞が移動または凝集することにより、血管の透過性を制御し、血液成分が透過する場所を決めている可能性がある。

各種生活習慣由来因子が循環器系に与える影響については、マウスまたは血管内皮細胞の培養系を用いた研究が行われている。しかし、マウスを用いた研究では、実際の細胞動態が直接観察できず、内皮細胞の培養系においては、生活習慣由来の因子の影響が非常に弱いため、安定した結果が得られていない。例えば高グルコース環境の内皮細胞への影響は、急性炎症反応のみの解析に留まっている。各種生活習慣病の循環器系に与える疾患のいくつかは、壁細胞への影響が原因であると考えられており［5］、特に糖尿病性網膜症においては、壁細胞が網膜の毛細血管から剥離することで被覆率が減少し、血管の透過性が亢進することで発症すると考えられている［6］。これらから、生活習慣由来因子の影響が、内皮細胞と壁細胞どちらに影響しているのか、またそれらの相互作用を解析することが重要であり、そのために壁細胞と内皮細胞の共培養系が必須であると考えられる。

我々はヒト血管内皮細胞を用いて、管腔状の構造を有した三次元（3D）ヒト毛細血管モデルを構築した［7］。この系によって、薬剤が血管透過性に与える影響を直接観察可能である。また、マウス壁細胞とヒト内皮細胞の共培養系も確立し、壁細胞が血管新生を安定化させることを報告している［8］。そこで本研究では、各種組織由来の壁細胞と内皮細胞を用いた、3D ヒト毛細血管モデルを作製し、生活習慣由来因子の代表例として高血糖を模倣した血管微小環境（vascular microenvironment：VME）が血管透過性と細胞動態に与える影響を直接観察できる系を確立することを目的とした。

方　法

1. 細胞培養とノックダウン

ヒト臍帯静脈内皮細胞（Human umbilical vein endothelial cells：HUVEC）を Endothelial Cell Growth Medium-2 (EGM2) 培地で、ヒト胎盤由来壁細胞 (Human Pericytes from Placenta : hPLPC) とヒト脳由来血管壁細胞 (Human Brain Vascular Pericytes：hBPC）はそれぞれ専用の培地で培養した。Green fluorescent protein（GFP）を発現させ

*現在の所属：横浜市立大学 理学部 理学系

たマウス末梢壁細胞株（Mouse peripheral pericytes：mPPC）は10%FBS含有のD-MEMで培養した。これらの細胞はヒト微小血管モデル作製前に35 μm cell strainerに通すことで、細胞塊を除去した。

mPPCにおけるアンジオポイエチン1（*Angpt1*）をノックダウンするために、マウス*Angpt1*に対する10 nM siRNAまたはON-TARGETplus non-targeting siRNAをLipofectamine RNAiMAXと共にmPPCに処理し、その細胞をヒト微小血管モデルの作製に用いた。

2. 3Dヒト微小血管モデルの作製

酸抽出コラーゲン溶液であるコラーゲンI-A、10×HANKSバッファー、中性化バッファー（0.05 N NaOH、262 mM $NaHCO_3$、20 mM HEPES）を体積比8：1：1の割合で混合し、コラーゲン溶液を調製した。このコラーゲン溶液をポリジメチルシロキサン（PDMS）製デバイスのチャンバー内に添加し、鍼灸針（直径：20 μm）を挿入し、37℃で90分間ゲル化した。ゲル化後、鍼灸針を除去することで内腔を作製した。10^7 cells/mLに調整した3%デキストラン含有EGM-2を用いたHUVEC、hPLPC、hBPC、mPPCそれぞれの懸濁液を調製し、HUVEC単独、またはHUVECとhPLPCまたはhBPCを10：1の割合で、またはHUVECとmPPCを5：1の割合で調製した懸濁液を内腔にそれぞれ導入し、細胞を接着させた。

コラーゲンゲルに壁細胞を内包させるために、control siRNAまたは*Angpt1*に対するsiRNAを処理したmPPCをゲル化の際に10^4 cells/40 μLとなるように調製して混ぜ、PDMS製チャンバーに添加した。その後、同様の方法で内腔を作製し、HUVEC懸濁液を導入した。

これら作製したヒト微小血管モデルに、EGM2または24.5 mMのL-glucoseまたはD-glucoseを追加したEGM2を1 mL添加して培養した。培地交換は毎日行い、培養2、4日目に、4 kDaのFITC-dextranを200 μg/mLとなるようにEGM2に混合したものを、左側のリザーバーより滴下して内腔側から処理した。滴下後、1分後に拡散した蛍光デキストラン由来のコラーゲンゲル内の蛍光強度を測定した。

結果および考察

1. 各種組織由来壁細胞による血管透過性の制御

PDMSデバイス内にニードルを挿入してコラーゲンをゲル化させることで内腔を作製し、その内腔内にHUVEC単独またはHUVECと同時にmPPC、hBPCまたはhPLPCを播種することによって、内皮細胞のみで形成されたヒト微小血管モデルと、末梢・脳・胎盤由来の壁細胞と内皮細胞で形成されたヒト微小血管モデルを作製した（図1a）（代表的な例として末梢壁細胞共培養モデルのみ結果として表す）。培養4日目において蛍光デキストランを内腔より処理した際、内皮細胞のみで形成された血管モデルと比べて、どのタイプの壁細胞と共培養した血管モデルにおいても漏出量が抑制されていた（図1b）。一方、末梢と脳由来壁細胞での共培養でのみ、培養2日目において漏出位置と内腔内の蛍光強度に波形が生じた。内腔からの漏出量と、漏出した蛍光強度のx軸方向のプロファイルの標準偏差を指標とした局在指数を定量的に解析したところ（図1c）、どのタイプの壁細胞との共培養でも、培養4日目において漏出量は有意に抑制されたが、末梢と脳由来壁細胞での共培養でのみ、培養2日目において漏出の局在化指数が有意に増加した（図 1d、e）。この漏出の局在化と内腔内蛍光強度の波形は、末梢と脳由来壁細胞での共培養でのみ相関していた（図 1f）。微小血管モデル内における各種壁細胞の局在を調べたところ、末梢と脳由来の壁細胞は内皮層に対して接着していたが、胎盤由来壁細胞は内皮層に接着しておらずコラーゲンゲルの中に存在した。これらの結果より、壁細胞は、その由来に因らずに微小血管の透過性を抑制する働きを持ち、内皮層への接着を介して微小血管の透過場所を制御することが示唆された。

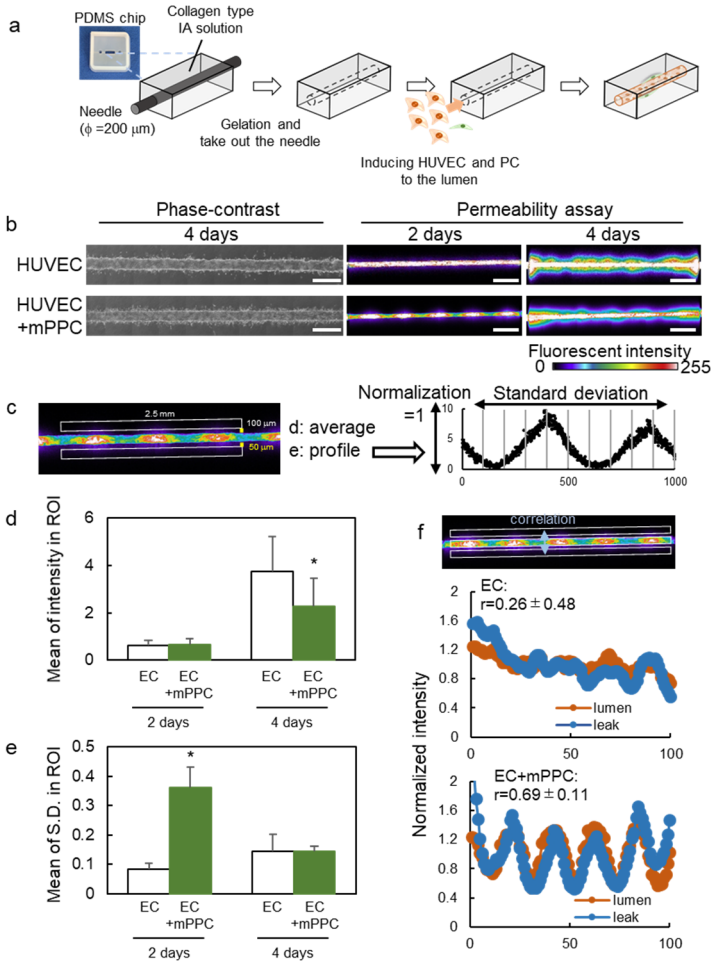


図 1. 壁細胞が制御する血管透過性の量と局在

a) PDMS デバイスとニードルを用いたヒト微小血管モデルの作製方法。

b) HUVEC 単独培養または HUVEC と mPPC を共培養したヒト微小血管モデルにおける位相差画像と、透過性試験の際の蛍光デキストラン画像。スケールバー：500 μm。

c) 画像解析のための ROI 設定領域と、漏出局在化指標としての、x 軸方向の蛍光強度プロファイルの標準偏差計算方法。

d、e) HUVEC 単独培養または HUVEC と mPPC を共培養したヒト微小血管モデルにおける、ROI の蛍光強度平均値と、e) x 軸方向の蛍光強度プロファイルの標準偏差の平均値。スチューデント *t* 検定、**p*≤0.05。

f) 漏出と内腔内における、x 軸方向の蛍光強度プロファイルの相関。r：相関係数。

2. 壁細胞由来の分泌因子が制御する血管透過量

内皮層に結合していない壁細胞でも血管透過性を抑制可能であったため、壁細胞由来の分泌因子が血管透過量を抑制していると考えた。そこで、壁細胞において血管透過性を抑制する分泌因子として知られている *Angpt1* 遺伝子を末梢由来壁細胞においてノックダウンした後、壁細胞を足場のコラーゲンゲルに内包させて微小血管モデルを作製した。培養 4 日目において、壁細胞は主に内皮層の周囲のコラーゲンゲル内に存在し、蛍光標識したデキストランを内腔より処理した際、*Angpt1* のノックダウンによって内腔からの透過量が増大した（図 2a）。透過量を定量的に解析したところ、*Angpt1* のノックダウンによってその透過量は有意に増大しており、壁細胞による血管透過性抑制効果がキャンセルされていた（図 2a）。この結果より、壁細胞は主に分泌因子のアンジオポイエチン 1 を介して血管透過量を抑制していると考えられる。

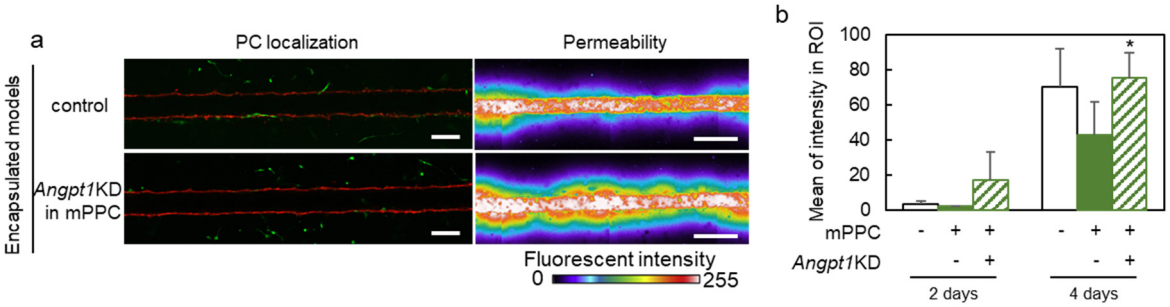


図 2. 壁細胞由来の *Angpt1* ノックダウンが血管透過量に与える影響

a) 足場となるコラーゲンゲル内に siRNA を導入した mPPC を内包したヒト微小血管モデル培養 4 日目における、血管壁（赤）と mPPC（緑）の局在と、透過性試験の際の蛍光デキストラン画像。スケールバー：500 μm。

b) HUVEC 単独培養、HUVEC と mPPC を共培養、または *Angpt1* をノックダウンした mPPC（*Angpt1*KD）を共培養したヒト微小血管モデルにおける、ROI の蛍光強度平均値。スチューデント *t* 検定、* : *Angpt1* をノックダウンしていない mPPC と比較して $p<0.05$。

3. 高血糖を模倣した VME における壁細胞を介した血管透過性の制御

通常の培地に含まれる D-glucose 量は 5.5 mM であり、高血糖環境を模倣するために D-glucose 量を 30 mM とした際の血管透過性に与える影響を、内皮細胞単独または内皮細胞と末梢由来壁細胞との共培養微小血管モデルにおいて解析した。D-glucose 添加による浸透圧の影響を揃えるために、対照群として同量の L-glucose を添加した。培養 4 日目において蛍光デキストランを内腔より処理したところ、内皮細胞単独モデルにおいては D-glucose 添加によって血管透過量に変化はなかったが、末梢由来壁細胞との共培養モデルにおいては D-glucose 添加によって透過量が有意に増大した（図 3a、b）。この結果より、高血糖 VME は壁細胞存在下でのみ感受され、血管透過量を増加させることがわかった。

当 3D ヒト微小血管モデルは各種組織由来の壁細胞の影響を評価可能なデバイスであり、この血管透過性評価系を用いることで、壁細胞が分泌を介して血管透過量を抑制し、内皮への接着を介して透過する場所を制御していることが解明された。また、生活習慣由来因子のように、VME における弱い影響を与える因子の影響を解析することが可能となり、高血糖 VME が壁細胞存在下で初めて感受され、血管透過量を増加させることが示唆された。

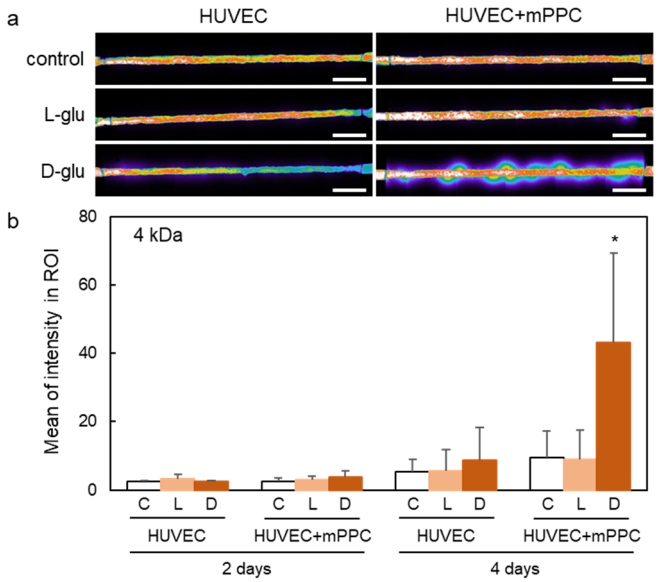


図 3. 高血糖 VME における、壁細胞共培養が血管透過性に与える影響

a) L-glucose または D-glucose を添加した HUVEC 単独培養または HUVEC と mPPC を共培養したヒト微小血管モデルにおける、透過性試験の際の蛍光デキストラン画像。スケールバー：500 μ m。

b) L-glucose または D-glucose を添加した HUVEC 単独培養または HUVEC と mPPC を共培養したヒト微小血管モデルにおける、ROI の蛍光強度平均値。Peritz 検定、* : L-glucose 群と比較して $p<0.05$。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学生産技術研究所機械生体系部門の松永行子准教授である。

文　献

1) Honkura N, Richards M, Laviña B, Sáinz-Jaspeado M, Betsholtz C, Claesson-Welsh L. Intravital imaging-based analysis tools for vessel identification and assessment of concurrent dynamic vascular events. Nat Commun. 2018 Jul 16;9(1):2746. doi: 10.1038/s41467-018-04929-8. PMID: 30013228

2) van Dijk CG, Nieuweboer FE, Pei JY, Xu YJ, Burgisser P, van Mulligen E, el Azzouzi H, Duncker DJ, Verhaar MC, Cheng C. The complex mural cell: pericyte function in health and disease. Int J Cardiol. 2015;190:75-89. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.03.258. Epub 2015 Mar 20. PMID: 25918055

3) Attwell D, Mishra A, Hall CN, O'Farrell FM, Dalkara T. What is a pericyte? J Cereb Blood Flow Metab. 2016 Feb;36(2):451-5. doi: 10.1177/0271678X15610340. Epub 2015 Oct 14. PMID: 26661200

4) Nikolakopoulou AM, Montagne A, Kisler K, Dai Z, Wang Y, Huuskonen MT, Sagare AP, Lazic D, Sweeney MD, Kong P, Wang M, Owens NC, Lawson EJ, Xie X, Zhao Z, Zlokovic BV. Pericyte loss leads to circulatory failure and pleiotrophin depletion causing neuron loss. Nat Neurosci. 2019 Jul;22(7):1089-1098. doi: 10.1038/s41593-019-0434-z. Epub 2019 Jun 24. PMID: 31235908

5) Hamilton NB, Attwell D, Hall CN. Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. Front Neuroenergetics. 2010 May 21;2:5. doi: 10.3389/fnene.2010.00005. eCollection 2010. PMID: 20725515

6) Ferland-McCollough D, Slater S, Richard J, Reni C, Mangialardi G. Pericytes, an overlooked player in vascular pathobiology. Pharmacol Ther. 2017 Mar;171:30-42. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.11.008. Epub 2016 Dec 1. PMID: 27916653

7) Pauty J, Usuba R, Cheng IG, Hespel L, Takahashi H, Kato K, Kobayashi M, Nakajima H, Lee E, Yger F, Soncin F, Matsunaga YT. A Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent Sprouting Angiogenesis Assay Based on an In Vitro Human Blood Vessel Model for the Study of Anti-Angiogenic Drugs. EBioMedicine. 2018 Jan;27:225-236. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.12.014. Epub 2017 Dec 20. PMID: 29289530

8) Lee E , Takahashi H , Pauty J , Kobayashi M , Kato K , Kabara M , Kawabe JI , Matsunaga YT. A 3D in vitro pericyte-supported microvessel model: visualisation and quantitative characterisation of multistep angiogenesis J. Mater. Chem. B, 2018 Feb 21;6(7):1085-1094. doi: 10.1039/c7tb03239k. Epub 2018 Feb 5. PMID: 32254296