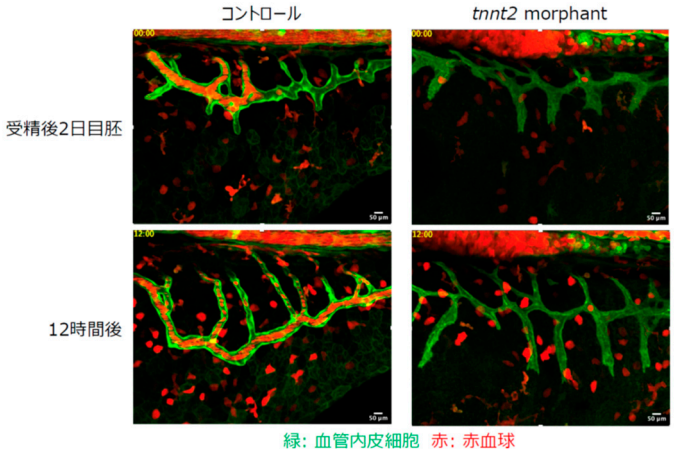
41　血管新生における内腔圧の機能とその破綻による疾患	福原　茂朋

【目的】血管新生とは、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、生体恒常性の維持に寄与する一方、がんや糖尿病網膜症などの様々な疾患の病態と密接に関連している。生体組織が損傷を受けると、血管新生が誘導され、損傷組織を修復する。しかし、糖尿病性潰瘍など創傷治癒の遅延が関連する疾患では、血管新生の誘導が正常に起こらず組織修復が遅延する。また、がんなど病的な血管新生が誘導される疾患では、無秩序で未熟な異常血管が形成され、これら疾患の病態を悪化させる。我々はこれまで、ゼブラフィッシュ成魚の皮膚創傷治癒における血管新生の蛍光生体イメージングから、「創傷の際の血管新生では、血流に対して下流側の損傷血管は上流側の損傷血管に向かって一方向性に伸長し血管を再生するのに対し、上流側の損傷血管は血流に起因する内腔圧によりほとんど伸長しない」という、ライブイメージングでしか知りえない現象を発見した。その機構として、血流に起因する内腔圧は、上流側の損傷血管を拡張し、内皮細胞に伸展刺激を負荷することで、細胞遊走の原動力となるアクチン重合を抑制し、血管伸長を阻害していること、さらに伸展刺激のメカノセンサーとして BAR（Bin/Amphiphysin/Rvs）ドメイン含有タンパク質 TOCA1 が関与することを明らかにした。即ち、下流側の損傷血管では、TOCA1 が内皮細胞の先導端膜に結合し、アクチン重合依存的に膜突起を形成することで、内皮細胞遊走と血管伸長を促進しているのに対し、内腔圧が負荷された上流側の損傷血管では、伸展刺激により内皮細胞の膜張力が上昇し、それにより TOCA1 が先導端膜に結合できず、内皮細胞遊走・血管伸長が阻害されることを示した。これにより内腔圧による血管新生の新たな制御機構が明らかになった。本研究では、血流に起因する内腔圧が血管伸長を制限する機構の生理的な意義や病的血管新生との関連性について検討するとともに、創傷時血管新生において、下流側の損傷血管が、上流側の損傷血管に向かって一方向性に伸長する機構について解析を行った。

【方法】血管内皮細胞や赤血球が蛍光タンパク質で標識されたゼブラフィッシュを用いて、腸・肝臓・膵臓の臓器血管の起源となる subintestinal vein（SIV）の形成プロセスを蛍光ライブイメージングにより解析した。その際、SIV リモデリングにおける血流の役割を解析するため、トリカインや BDM などの薬剤処理や *tnnt2* のノックダウンにより血流を停止させた。創傷治癒過程の血管新生におけるペリサイトの役割を明らかにするため、ニトロ還元酵素／メトロニダゾール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】本研究により、血流に起因する内腔圧は、血管枝の退縮を誘導することで、SIV 形成時の血管リモデリングを惹起し、機能的な SIV 形成に寄与していることが示された。また、創傷時血管新生において、血流に対して下流側の損傷血管は、一方向性に伸長し上流損傷血管と吻合することで損傷血管を修復すること、また、この下流損傷血管の一方向性の伸長にはペリサイトが関与することを明らかにした。

血流に起因する内腔圧は腸血管（SIV）のリモデリングを誘導する



緑：血管内皮細胞　赤：赤血球

41. 血管新生における内腔圧の機能とその破綻による疾患

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，内腔圧，創傷治癒，がん，ペリサイト

緒　言

血管新生とは、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、発生期に活発に誘導され、われわれの体を張り巡らす血管ネットワークを形成する一方、成体では特殊な組織でのみ誘導され、ほとんどの正常組織では、安定な血管構造が維持されている。しかし、生体組織が損傷を受けると、それを修復するために血管新生が誘導され、機能的な血管ネットワークが形成される。しかし、糖尿病性潰瘍など創傷治癒の遅延が関連する疾患では、血管新生の誘導が正常に起こらず組織修復が遅延する。また、がんや糖尿病網膜症など病的な血管新生が誘導される疾患では、無秩序で未熟な異常血管が形成され、これら疾患の病態を悪化させる。しかし、血管新生が正常および異常な血管を構築する機序ついては未だ不明な点が多く残されている。そのため、血管新生の制御機構の解明は、生体恒常性が維持される仕組みや疾患の病態の理解を深化させるばかりでなく、病的血管新生がかかわる疾患、創傷治癒の遅延が関連する疾患の治療法開発、虚血性疾患に対する効果的な血管再生療法の開発につながることが期待される。

我々はこれまで、ゼブラフィッシュを用いた蛍光イメージング技術を駆使して、生体内の細胞を解析する“*in vivo* 細胞生物学研究”を確立し、胎生期における血管新生の分子機序を明らかにしてきた。さらに、成体において虚血によって誘導される血管新生を解析するため、成魚の長時間ライブイメージング法を独自に確立し、創傷治癒における血管新生の新たな制御機構を発見した。これまで血管新生において伸長する血管枝は、低酸素組織が産生する血管新生因子に向かって一様に伸長すると信じられてきた［5〜7］。しかし、われわれは、ゼブラフィッシュ成魚の皮膚創傷治癒における血管新生を観察し、「創傷の際の血管新生では、血流に対して下流側の損傷血管は上流側の損傷血管に向かって一方向性に伸長し血管を再生するのに対し、上流側の損傷血管は血流に起因する内腔圧によりほとんど伸長しない」という、ライブイメージングでしか知りえない現象を発見した。その機構として、血流に起因する内腔圧は、上流側の損傷血管を拡張し、内皮細胞に伸展刺激を負荷することで、細胞遊走の原動力となるアクチン重合を抑制し、血管伸長を阻害していること、さらに伸展刺激のメカノセンサーとして BAR（Bin/Amphiphysin/Rvs）ドメイン含有タンパク質 TOCA1 が関与することを明らかにした。即ち、下流側の損傷血管では、TOCA1 が内皮細胞の先導端膜に結合し、アクチン重合依存的に膜突起を形成することで、内皮細胞遊走と血管伸長を促進しているのに対し、内腔圧が負荷された上流側の損傷血管では、伸展刺激により内皮細胞の膜張力が上昇し、それにより TOCA1 が先導端膜に結合できず、内皮細胞遊走・血管伸長が阻害されることを示した。これにより内腔圧による血管新生の新たな制御機構が明らかになった。しかし、血流に起因する内腔圧が血管伸長を制限する機構の生理的な意義や病的血管新生との関連性については不明であった。また、血流に対して下流側の損傷血管が、上流側の損傷血管に向かって一方向性に伸長するメカニズムについても明らかにされていなかった。

本研究では、上記疑問について研究を遂行し、発生期における腸血管の形成に血流に起因する内腔圧が関与することを明らかにした。また、血流に対して下流側の損傷血管が、上流側の損傷血管に向かって一方向性に伸長する機序について解析を行い、ペリサイトが下流損傷血管の伸長方向を制御している可能性を見出した。

方法および結果

1. 発生期の腸血管の形成における内腔圧の役割

ゼブラフィッシュの腸・肝臓・膵臓の臓器血管は、胎生期に形成される subintestinal vein（SIV）に由来する。血管内皮細胞が GFP で標識された *Tg (fli1a:EGFP)* ゼブラフィッシュを用いて、SIV の形成過程を蛍光ライブイメージングにより解析した。その結果、SIV の基となる血管が、総主静脈の腹側に頭尾軸に沿って配向するように形成され、その後、同血管から背側・腹側の両方に血管が出芽し、血管枝を伸長させつつ卵黄表層へ拡大していくことが示された。しかし、血流が開始した途端、SIV の腹側に伸びる血管枝が退縮する様子が観察された（図 1）。さらに、腸管の成長・拡大が起きると同時に、SIV が腹側へと移動することが示された。われわれは、血流開始とともに誘導される血管枝の退縮が、血流に起因する内腔圧であると考え、トリカインや BDM などの薬剤処理により血流を停止させたところ、SIV から伸びる血管枝の退縮が阻害され、SIV のリモデリング不全が認められた。また、*tnnt2* のモルフォリノオリゴによる心筋阻害によっても同様に SIV のリモデリング不全が認められた（図 1）。さらに、赤血球が DsRed で標識されたゼブラフィッシュ胚や蛍光色素の血管内投与により血流を詳細に解析したところ、SIV から伸びる血管枝に血液が流れ込み、管腔が拡張すると同時に、血管枝の退縮が誘導されることが分かった。以上の結果から、血流に起因する内腔圧は、血管枝の退縮を誘導することで、SIV 形成時の血管リモデリングを惹起し、機能的な SIV 形成に寄与していることが示された（未発表）。

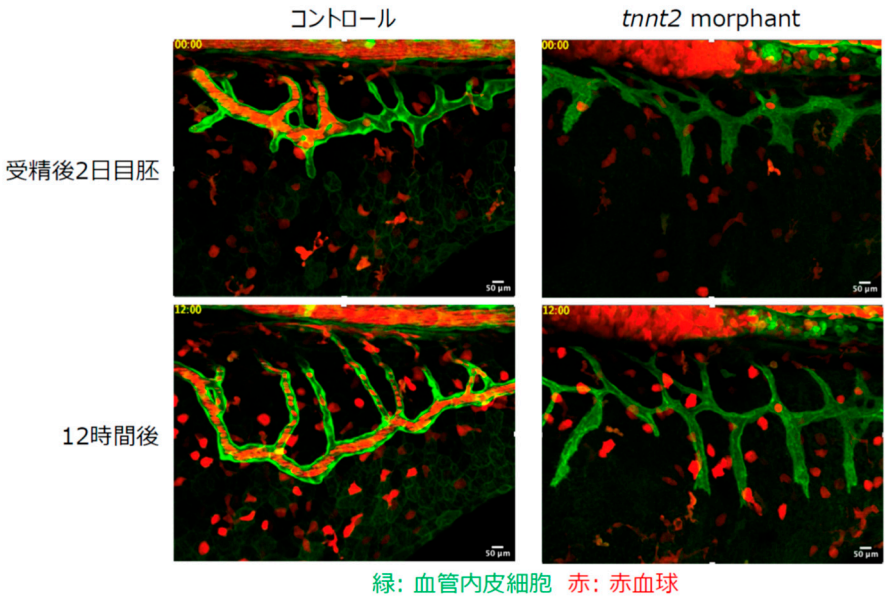


図 1. SIV リモデリングにおける血流の役割

コントロール（左）および *tnnt2*（右）モルフォリノをインジェクションした受精後 2 日目のゼブラフィッシュ胚における SIV 形成過程をライブイメージングにより解析。緑：血管内皮細胞、赤：赤血球を GFP。上：受精後 2 日目胚、下：12 時間後。コントロールでは、SIV から伸長する血管枝が血流の上昇とともに退縮するのに対し、血流のない *tnnt2* モルフォリノでは、血管枝の退縮が阻害された。スケールバー：50 μm。

2. 創傷時血管新生において血流に対して下流側の損傷血管が一方向性に伸長するメカニズム

創傷時血管新生において、血流に対して下流側の損傷血管が上流側の損傷血管に向かって一方向性に伸長する機構について解析を行った。血管内皮細胞が GFP で標識された *Tg (kdrl:EGFP)* ゼブラフィッシュ成魚の皮膚毛細血管を損傷し、その後の再生プロセスを解析した。このとき、上流側の損傷血管を完全に消失しても、下流損傷血管は上流損傷

血管が存在した領域に向け一方向性に伸長した。このことから、血流に対して下流側の損傷血管は、上流損傷血管とは関係なく自律的に一方向性に伸長していることが示された。そこで、次に、毛細血管を被覆するペリサイトの関与について検討した。血管内皮細胞とペリサイトを蛍光標識した *Tg（kdrl:EGFP)；(pdgfrb-mCherry)* ゼブラフィッシュ成魚の創傷時血管新生を解析したところ、下流損傷血管が伸長する際に、血管壁にペリサイトが被覆していることが分かった（図 2A)。そこで、血管伸長におけるペリサイトの役割を解析するため、ニトロ還元酵素（NTR）／メトロニダゾール（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ゼブラフィッシュを樹立した［*TgBAC (pdgfrb:Gal4FF)；(UAS:NTR-mCherry)；(kdrl:EGFP)*］。MTZ 処理によりペリサイトを除去した状態で、皮膚毛細血管に損傷を加え、その後の再生プロセスを観察したところ、ペリサイト存在下では、下流損傷血管は一方向性に伸長したのに対し、ペリサイト非存在下では湾曲して伸長し、異所性の血管網が形成された（図 2B)。以上の結果から、血流に対して下流側の損傷血管は、ペリサイトの被覆により一方向性に伸長することが示された。

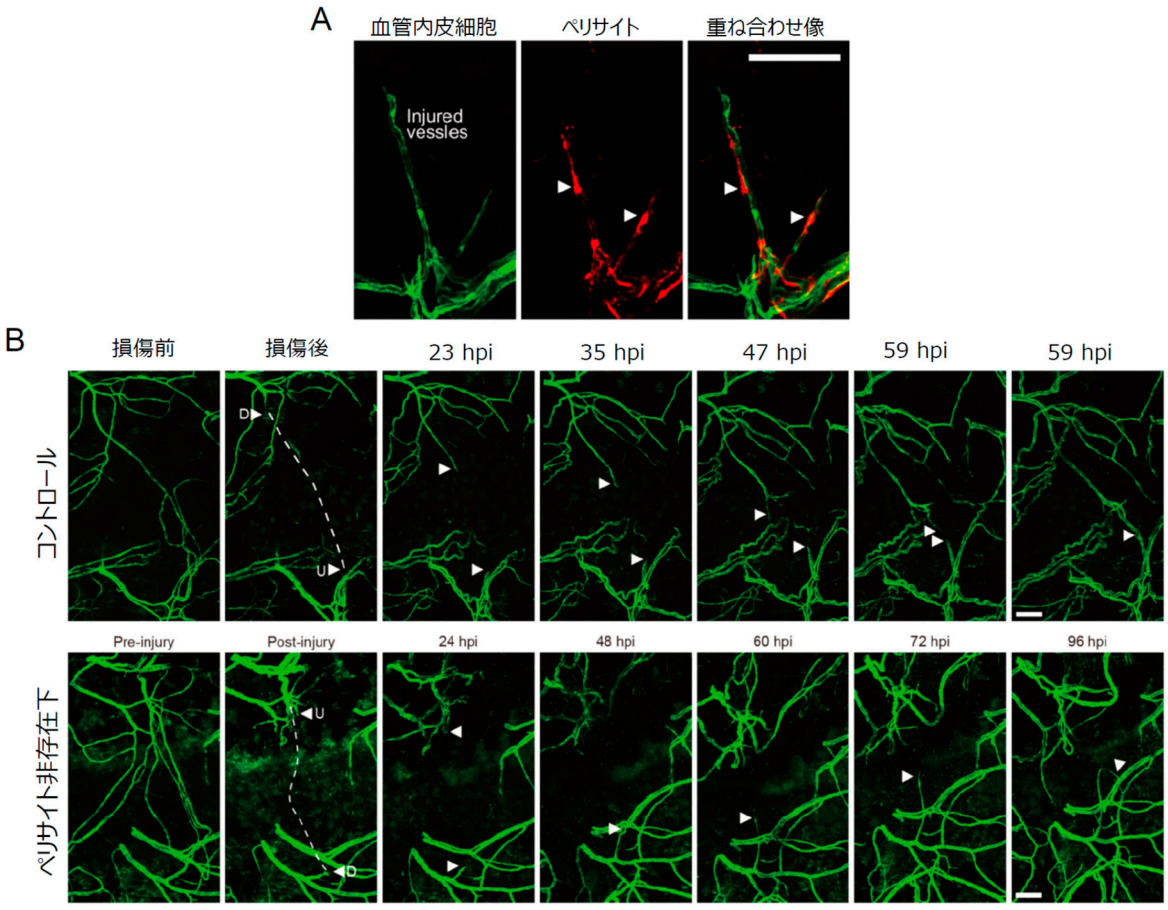


図 2. 損傷血管の一方向性伸長におけるペリサイトの役割

A) 成魚皮膚の創傷時血管新生において伸長する下流側の損傷血管。緑：血管内皮細胞、赤：ペリサイト。ペリサイトは、伸長する下流側の損傷血管壁を被覆している。スケールバー：100 μm。

B) ペリサイト存在下（上、コントロール）・非存在下（下）における創傷時血管新生のライブイメージング解析。NTR/MTZ システムを用いてペリサイトを除去後、皮膚に損傷を加え、血管新生を誘導。緑：血管内皮細胞。Hp：hours post-fertilization。コントロールでは、下流損傷血管は一方向性に伸長し上流損傷血管と吻合したのに対し、ペリサイト非存在下では、湾曲して伸長し、異所性の血管網を形成した。スケールバー：100 μm。

考　察

本研究によって、血流に起因する内腔圧が、創傷治癒過程の血管新生を制御するばかりでなく、発生期の腸血管の形成にも関与することが明らかになった。これまで血管新生の制御メカニズムを理解するため、VEGF などの血管新生因子が精力的に研究されてきたが、今後は血流に起因する内腔圧やシェアストレスなど力学的刺激を考慮した解析が重要であると考えられる。

がんでは病的血管新生により無秩序で未熟な腫瘍血管が形成されることが知られているが、この腫瘍血管の形成に、内腔圧の低下が関係する可能性が考えられる。腫瘍血管の透過性は高く、血漿成分が血管外に漏出するため、腫瘍血管に負荷される内腔圧は低く、血漿成分の漏出により、間質圧が高いことが知られている。このような状況下では、腫瘍血管の内皮細胞に負荷される伸展刺激は低いと予想される。従って、伸展刺激が低下した腫瘍血管の内皮細胞は活発に出芽・伸長することで、無秩序で未熟な異常血管を形成している可能性がある。今後、本仮説を検証することができれば、内腔圧を操作することで腫瘍血管を正常化する新たながん治療法の開発につながる可能性がある。

今回、血流に対して下流側の損傷血管が一方向に伸長するメカニズムとして、ペリサイトの重要性を明らかにした。ペリサイトは、血管枝を被覆することで、その伸長方向を制御し、機能的な血管の構築に寄与していると考えられる。今後、ペリサイトが血管新生における血管伸長を制御するメカニズムについて明らかにする必要がある

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の石井智裕助教、羽田優花研究員、弓削進弥助教である。

文　献

1） Nishimura Y, Ishii T, Ando K, Yuge S, Nakajima H, Zhou W, et al. Blood Flow Regulates Glomerular Capillary Formation in Zebrafish Pronephros. Kidney360. 2022;3(4):700-13. Epub 2022/06/21. doi: 10.34067/kid.0005962021. PubMed PMID: 35721616; PubMed Central PMCID: PMCPMC9136892.

2） Rho SS, Kobayashi I, Oguri-Nakamura E, Ando K, Fujiwara M, Kamimura N, et al. Rap1b Promotes Notch-Signal-Mediated Hematopoietic Stem Cell Development by Enhancing Integrin-Mediated Cell Adhesion. Dev Cell. 2019;49(5):681-96.e6. Epub 2019/04/23. doi: 10.1016/j.devcel.2019.03.023. PubMed PMID: 31006651.

3） Ando K, Fukuhara S, Izumi N, Nakajima H, Fukui H, Kelsh RN, et al. Clarification of mural cell coverage of vascular endothelial cells by live imaging of zebrafish. Development. 2016;143(8):1328-39. doi: 10.1242/dev.132654. PubMed PMID: 26952986; PubMed Central PMCID: PMCPMC4852519.

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. Developmental cell. 2015;32(1):109-22.

5） Yuge S, Nishiyama K, Arima Y, Hanada Y, Oguri-Nakamura E, Hanada S, et al. Mechanical loading of intraluminal pressure mediates wound angiogenesis by regulating the TOCA family of F-BAR proteins. Nature Communications. 2022;13(1):2594. doi: 10.1038/s41467-022-30197-8.

6） Noishiki C, Yuge S, Ando K, Wakayama Y, Mochizuki N, Ogawa R, et al. Live imaging of angiogenesis during cutaneous wound healing in adult zebrafish. Angiogenesis. 2019. Epub 2019/01/05. doi: 10.1007/s10456-018-09660-y. PubMed PMID: 30607697.

7） Yuge S, Ishii T, Noishiki C, Fukuhara S. Novel regulatory mechanisms underlying angiogenesis during wound healing revealed by fluorescence-based live-imaging in zebrafish. The Journal of Biochemistry. 2023. doi: 10.1093/jb/mvad024.