

令和元年6月12日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15565

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュ成魚で確立したライブイメージング法による創傷時血管新生機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of mechanisms of wound-induced angiogenesis by our established live-imaging in the adult zebrafish

研究代表者

弓削 進弥 (Yuge, Shinya)

日本医科大学・先端医学研究所・助教

研究者番号：50723532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、独自に確立した、ゼブラフィッシュ成魚の蛍光生体ライブイメージング法により、成魚皮膚の血管網と血管を被覆するペリサイトの配置、創傷時の血管新生の全過程、創傷時血管新生における内腔圧の新規機能を明らかにした。に関しては、創傷時血管新生では、損傷血管は血流に対して下流側が伸長しやすく上流側が伸長しにくいこと、また、血流に起因する内腔圧が上流血管の伸長を抑えていることを示した。さらに、内腔圧は血管を拡張させ内皮細胞に伸展刺激を負荷することで、先端端へのアクチン重合促進因子複合体の動員、アクチン重合、前後軸極性形成を阻害し、血管伸長を抑えていることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立した、『生きた』成体の血管新生を長時間・長期間解析できる(ライブイメージング)実験系は、創傷時の血管新生に限らず、皮膚に移植した腫瘍に誘導される血管新生、さらには2光子顕微鏡や透明魚を用いて皮膚より深い部分の血管や組織の動態などを生きた成体で研究することに応用させられる。

本研究で発見した「内腔圧が血管の伸長を抑制する」現象とその制御機構は、血管新生にこれまで知られていなかった新しい知見を提唱する。その生理的意義は、創傷時の血管新生が活発になりすぎることを抑制することではないかと予想している。近年、創傷治癒で活発すぎる血管新生が肥厚性瘢痕やケロイドの原因になる可能性が示唆されている。

研究成果の概要(英文)：Using our originally established adult zebrafish live-imaging system, we revealed the followings for the first time in living adult zebrafish: 1) vasculature and pericytes covering in the skin surface, 2) whole processes of wound-induced angiogenesis and 3) a phenomenon that elongation of an injured blood vessel is less active at the side upstream than at the side downstream to blood flow direction during wound healing. In the discovery 3), we demonstrated that intraluminal pressure derived from blood flow inhibits elongation of the upstream injured vessel. We further unraveled a novel mechanism of angiogenesis that intraluminal pressure expands the leading part of an elongating blood vessel, stretches endothelial cells (ECs), resulting in the inhibition of recruitment of actin polymerization related molecules, the decrease in actin polymerization and the loss of front-rear polarity in the leading ECs. This mechanism causes migration of the ECs in elongating vessel.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管新生 イメージング ゼブラフィッシュ 成体 創傷治癒 内腔圧 内皮細胞 ペリサイト

## 1. 研究開始当初の背景

血管は、全ての器官・組織に必須の器官であり、既存の血管から血管枝が出芽・伸長して新たな血管網を構築する『血管新生』を経て、各部位に適切に配置される。

血管新生の制御は、成体と胎生期で異なるが、成体では胎生期に比べ未解明な点が多い。胎生期の血管新生は、遺伝子にプログラムされた機構により、どの個体でも同様に起こる。この研究の発展には、ゼブラフィッシュなどのモデル動物の胚・胎児で用いられる、蛍光タンパク質で血管を可視化した個体を生きたまま解析する『蛍光ライブイメージング法』が貢献してきた。いっぽう成体の血管新生は、正常な組織では起こらず、創傷や癌などで虚血に陥った組織で誘導され、個体や部位、虚血度合いなどに依りて異なる。しかし、成体を生きたまま長時間固定して解析するのは困難であった。したがって、成体の虚血組織では、血管が出芽・伸長する過程の詳細やそれらを制御する機構は未だに不明である。

申請者は、魚の麻酔固定と呼吸維持を工夫し、独自にゼブラフィッシュ成魚の蛍光ライブイメージング法を確立した(図1)。同手法により、世界で初めて、生きた魚の皮膚の血管を長時間・長期間継続的に解析し、魚の皮膚の血管網と血管を被覆するペリサイトの配置を明らかにし、創傷時の血管新生では、まず残存した損傷血管の伸長が活発に起こり、続いて側枝の出芽・伸長さらには筋肉層から創傷部への血管網の移動が起こることを示した。さらに、損傷血管は、血流に対して上流側は伸長しにくく下流側が伸長しやすいことを発見した。これは、共同研究者の熊本大の西山功一博士グループによる、微小流体デバイスで3次元で再現した血管新生で、内腔圧を負荷した新生血管の伸長が抑制されるという発見と関連すると予想された。

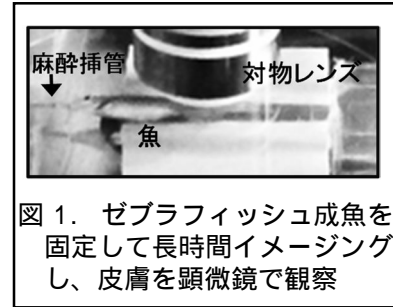


図1. ゼブラフィッシュ成魚を固定して長時間イメージングし、皮膚を顕微鏡で観察

申請者は、研究室主宰者の福原茂朋教授の下、研究協力者の野一色千景大学院生とともに、上述の手法と結果を元に、まず創傷時の血管新生の全過程を明らかにすることを考えた。創傷部位では血管修復とともに周辺組織の修復も起こるため、両者の相互作用にも関心を持った。さらに、創傷時の最初の血管新生過程で顕著に見られる、残存損傷血管の伸長と、それが上流側と下流側で異なり、その要因として損傷血管の先端にかかる内腔圧の違いによる可能性があることに非常に興味を持ち、この制御機構の解明を西山博士グループと共同で研究することにした。

## 2. 研究の目的

本研究は、申請者が独自に確立したゼブラフィッシュ成魚の蛍光ライブイメージング法を用いて、生きた成体を長時間・長期間継続的に解析して、複雑な創傷時血管新生の全ての現象を特定し、それらの制御機構の解明を試みる。そのために以下の3つの事項を解明していく。

- (1) 創傷治癒全過程における血管新生の制御機構を解明する。
- (2) 創傷治癒過程の血管新生と組織修復の相互作用を解明する。
- (3) 「損傷血管は下流側が活発に伸長し上流側が伸長しにくい」要因と制御機構を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) トランスジェニックゼブラフィッシュの樹立

ゼブラフィッシュを用いた動物実験は、日本医科大学動物実験委員会での承認を受け、同機関の指針・規則を順守して行なった。遺伝子組換え魚の作製は、遺伝研の川上浩一博士らが開発したToI2システムを用いて行なった。主に用いたのは、血管、動脈系血管、リンパ管様脈管、赤血球(血流を見るため)、壁細胞(ペリサイト)、F-アクチン、細胞間接着分子、ゴルジ、Arp2/3分子を可視化した遺伝子組み換え魚である。

### (2) ゼブラフィッシュ成魚・稚魚の蛍光ライブイメージング

成魚は、自作した灌流システムに2-フェノキシエタノール麻酔液と低融点ゲルで固定し、麻酔入り飼育水を口に挿管し呼吸を維持させながら、共焦点レーザー顕微鏡で観察した(図1)。稚魚のイメージングは、一般的に確立されている手法(トリカイン麻酔と低融点ゲルによる固定と同顕微鏡による観察)で行なった。

### (3) 成魚皮膚の創傷、稚魚血管の損傷

成魚皮膚の創傷は、手術用微細針、注射針、極細ピンセットを用いて、顕微鏡下で標的部位を傷つける方法で行なった。稚魚血管の損傷は、東京大学定量生命科学研究所 TOBIC のオリンパス多光子顕微鏡 FVMPE-RS もしくは東京大学医科学研究所顕微鏡コアラボのニコン多光子顕微鏡 A1RMP を使わせていただいて、720 nm レーザーで標的部位を消失させる方法で行なった。

### (4) 皮膚の虚血領域の同定

皮膚を創傷させた成魚に、虚血細胞と結合するピモニダゾールを腹腔内投与し、24-72 時間後に成魚を固定し、皮膚表面の標的部周辺を組織片として切り出し、鱗の脱灰を行なった

後、抗ピモニダゾール抗体を用いて組織片の虚血領域をホールマウント免疫組織化学染色で同定した。

- (5) 創傷組織での血管新生促進因子の影響の解明  
皮膚を創傷させた成魚を、血管内皮増殖因子 Vegf シグナルの阻害剤を含んだ飼育水で飼育し、創傷時血管新生の変化を調べた。
- (6) 微小流体デバイスでの血管新生の解析  
共同研究者の西山博士グループに行なっていただいた。同デバイスで、内皮細胞 HUVECs を培養し、3次元で血管新生を再現し、新生血管の伸長、形態、発現分子を解析した。新生血管への内腔圧の負荷は、装置の溶液の水位を上げて静水圧をかけることを行ない、発現分子の解析は、免疫組織化学染色、あるいは蛍光タンパク質を融合させた標的分子をレンチウイルス（後述）で感染させて発現させることで解析した。
- (7) レンチウイルス  
蛍光タンパク質を融合させた標的分子を含んだレンチウイルスを作製し、それを HUVECs に感染させた。
- (8) 細胞の2軸伸展刺激負荷の実験  
ストレックス社（大阪）の2軸伸展装置を用いて、伸展チェンバーで培養した HUVECs の一部を剥がし（スクラッチアッセイ）その部位に遊走する細胞を、遊走方向とそれに対して垂直の方向の2軸に伸展させた。その時の細胞の形態を観察し、レンチウイルスで感染させて可視化した細胞内分子の動態を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ゼブラフィッシュ成魚の皮膚表面の血管網を同定

ゼブラフィッシュ成魚の皮膚表面では、真皮に血管網が存在し、鱗1つの下に細動脈1本、細静脈1-2本が存在し、それらが隣の鱗の下の同血管と毛細血管でつながっていることを明らかにした（図2）。また、赤血球が流れない、細動脈と並走する脈管と細動脈周辺及び鱗上に存在する脈管を同定し、それらはリンパ管と関連するのではないかと予想した。さらに、これらの血管にはペリサイトが被覆しており、内皮細胞：ペリサイト = 1:0.6の割合であった。

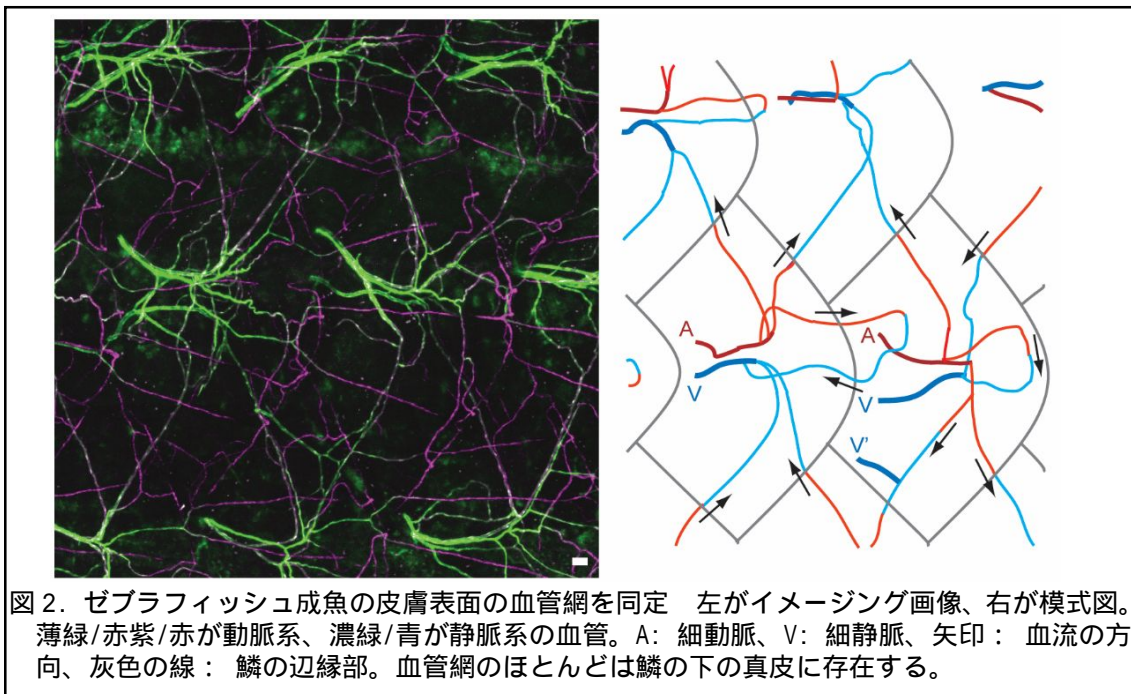


図2. ゼブラフィッシュ成魚の皮膚表面の血管網を同定 左がイメージング画像、右が模式図。薄緑/赤紫/赤が動脈系、濃緑/青が静脈系の血管。A: 細動脈、V: 細静脈、矢印: 血流の方向、灰色の線: 鱗の辺縁部。血管網のほとんどは鱗の下の真皮に存在する。

##### (2) 創傷時の血管新生過程を解明

ゼブラフィッシュ成魚の皮膚血管網、それを構成する内皮細胞および被覆するペリサイトは、定常状態では、2ヵ月以上に渡って、数も位置もほとんど変えないことを確認した。ところが、創傷を施すと、1日以内に、損傷後の周囲の残存血管の伸長が起こり、その後側枝の出芽も起こり、3-4日後に、主要な血管同士は吻合した。その後数日間は、吻合血管の蛇行が起こるとともに側枝の出芽により血管網が増加したが、創傷後15-20日後から60日後にかけて、血管の蛇行の減少と不要な血管の退縮が徐々に起こり、修復した血管網は安定した。

損傷血管の再生では、血流に対して下流側が活発に伸長し、上流側は伸長しにくい傾向が見られた。同現象は、稚魚で損傷した節間血管でも見られたため、血管新生に普遍的なもの



だと考えられた。そこで、皮膚損傷血管の上流のさらに上流を損傷させ、上流側で血流によって生じる内腔圧を消失させたところ、上流側も下流側と同等に伸長した。さらに微小流体デバイス上での新生血管に内腔圧を負荷したところ、血管の伸長は抑制された。これらの結果から、内腔圧が血管新生を抑制する機構という、血管新生においてこれまで知られていなかった新しい知見を得られた。

(3) 創傷時血管新生でのペリサイトの再被覆の過程を解明

ゼブラフィッシュ成魚の皮膚で、新たな血管が出芽・伸長して6-12時間後には新生血管にペリサイトが被覆することを示した(図3)。これは、これまで考えられてきた「血管壁からのペリサイトの剥離が血管の出芽を促す」という概念と矛盾しており、ペリサイトの血管新生での役割を再考する必要性を提示していた。ペリサイトの再被覆は、既存の血管のペリサイトの遊走と分裂、さらには新たなペリサイトの出現の3つのパターンによって起こることを示した。特にペリサイトの出現はどうやって起こるか？興味深い課題を新たに提示した。

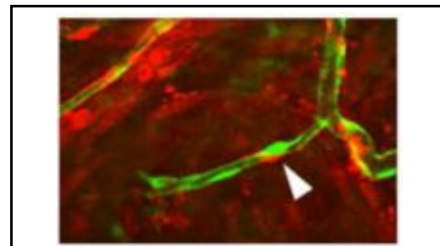


図3. ゼブラフィッシュ成魚の創傷皮膚で新たな血管(緑)が出芽・伸長(左方向)する際のペリサイト(赤、矢頭)の再被覆を証明

(4) 創傷組織の損傷血管再生への影響を解明

創傷組織の虚血を解析したところ、創傷領域は虚血になっていたが、その虚血の程度は、損傷血管の下流側上流側周辺組織で違いは観られなかった。いっぽう創傷皮膚で、Vegf シグナルを阻害すると、血管新生は抑制され、その阻害を解除すると、再び血管新生が生じた。これらの結果より、創傷組織では虚血によるVegf産生が血管新生を促進する可能性があることを示すとともに、損傷血管の上流側と下流側の伸長の違いは虚血の程度によらないことを明らかにした。

(5) 内腔圧が血管新生を抑制する制御機構を解明

上述(2)で新しく提唱した「内腔圧が血管新生を抑制する現象」の制御機構を、成魚の皮膚血管と稚魚の節間血管、および微小流体デバイスでの新生血管を解析して解明した。

最初に血管の先端の形態を解析したところ、損傷血管では上流側は膨張し、下流側は突出する傾向が、微小流体デバイスでは通常血管は突出し、内腔圧を負荷した血管は膨張する傾向が見られた。したがって、損傷血管の上流側および内腔圧を負荷したデバイス血管の先端では、内腔圧による膨張が起き、その時内皮細胞は膨張により遊走方向と円周方向の両方に伸展される可能性が示唆された。

次に損傷血管とデバイス血管の内皮細胞の極性を、細胞内のゴルジを可視化して解析したところ、損傷血管の下流側とデバイスでの通常血管では内皮細胞の多くが損傷部位に向けて前後極性を維持していたのに対し、上流側と内腔圧を負荷したデバイス血管では内皮細胞の前後極性がランダムになっていた。続いて、内皮細胞が遊走する先端端でのラメリポディア・フィロポディアの形成に重要なアクチンを可視化して解析したところ、損傷血管の上流側とデバイスでの内腔圧負荷血管の先端ではアクチンが減少していた。これら血管の先端で膨張による内皮細胞の伸展によるアクチン重合の阻害を想定し、2軸伸展装置で培養し一方向に遊走しているHUVECsで2軸伸展刺激を負荷したところ、先端細胞でのラメリポディア形成が阻害された。さらに、ラメリポディア・フィロポディア形成のためのアクチン重合に重要なArp2/3複合体の局在も、損傷血管の上流側とデバイスの内腔圧負荷血管の先端で減少していた。また、再生途上の損傷血管およびデバイスの通常血管でArp2/3を阻害

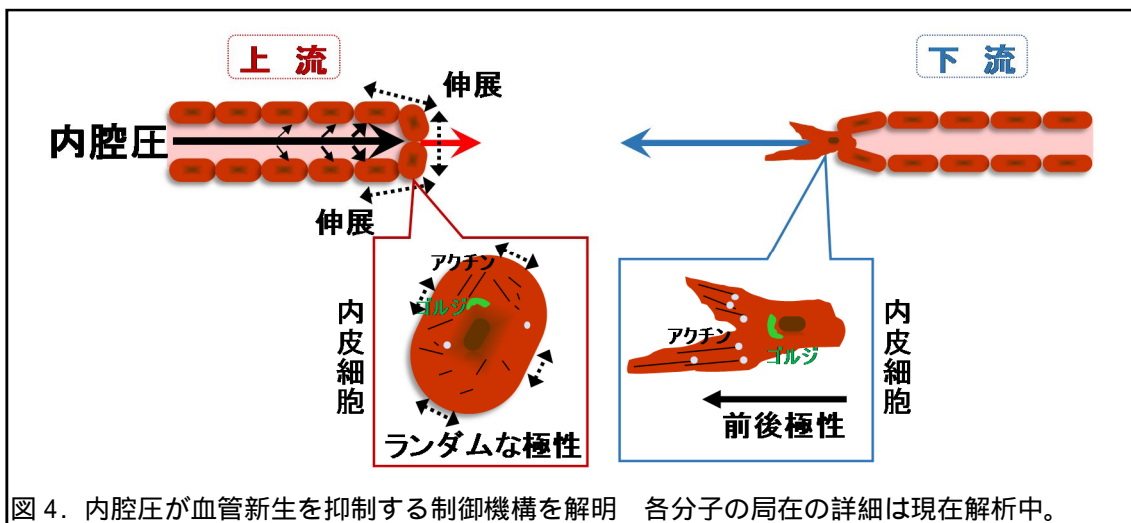


図4. 内腔圧が血管新生を抑制する制御機構を解明 各分子の局在の詳細は現在解析中。

すると、アクチンが減少し、血管の伸長が抑制された。

以上より、損傷血管の上流側にかかる内腔圧およびデバイス血管に負荷した内腔圧が血管の伸長を抑制する際には、「内腔圧が血管の先端を膨張させ、先端の内皮細胞を伸展させる、血管の先端での Arp2/3 複合体が減少する、血管の先端でアクチン重合が阻害され、その結果先端が形成されにくくなる、内皮細胞が前後極性を失い、損傷方向への遊走が起こりにくくなる」という新しい制御機構が存在することを解明した(図4)。

#### (6) 本研究成果の意義と今後の展望

本研究は、成体の創傷治癒時に起こる血管新生を、生きた成魚で長時間・長期間解析できる実験系を確立したため、手法の面からも今後の創傷治癒研究の発展に寄与できると考えられる。本実験系は、血管以外の組織や免疫細胞なども可視化すれば同様なライブイメージング解析にも生かすことができ、2光子顕微鏡や透明/アルビノゼブラフィッシュを用いれば、成魚の皮膚の深い部分や内臓をライブイメージング解析することにも応用できる。

本研究で発見した、損傷血管が伸長再生する際にペリサイトが再被覆する現象は、ペリサイトの剥離が血管新生を促進する概念と相反するものであり、今後ペリサイトの血管新生での役割を再考する必要性を提示した。

さらに本研究で発見した「内腔圧が血管の伸長を抑制する」という新しい現象、および本研究で *in vivo* と *in vitro* の両方から明らかにしたその制御機構は、どんな生理的意義があるか? 今後の課題である。発生期の血管新生には血流による内腔圧が必要だと思われる場合も提唱されているため、内腔圧の血管新生の抑制機構がどの年齢のどの部位での血管新生で重要なのか? という問いが出てくる。さらに、たとえば癌では、生じる新生血管は未熟で漏出しやすいため内腔圧がかかりにくく、そのため血管の伸長が容易に起こるのかもしれない。また、近年創傷治癒の際に血管新生をある程度抑制すると肥厚性瘢痕やケロイドが生じにくくなる可能性も提唱されているが、もし本当にそうであるならば、内腔圧が創傷部位での過剰な血管新生を抑制する意義があるのかもしれない。

本研究を今後さらに広げて追究していきたい。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

【査読有】 †Yuge, S., †Noishiki, C., Ando, K., Wakayama, Y., Mochizuki, N., Ogawa, R., and Fukuhara, S. Live imaging of angiogenesis during cutaneous wound healing in adult zebrafish. *Angiogenesis* 22(2):341-354, 2019.

doi: 10.1007/s10456-018-09660-y.

† Equal contribution

〔学会発表〕(計 16 件)

: 発表者

講演 福原 茂朋、弓削 進弥 「血管新生におけるメカニカルストレスの新たな役割」 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会、新潟(コンベンションセンター)、2019年3月27日

講演 福原 茂朋、弓削 進弥 「創傷治癒に伴う血管新生のライブイメージングから明らかになった血管新生における内腔圧の新たな役割」 日本薬学会第139年会、千葉(幕張メッセ)、2019年3月21日

ポスター 野一色 千景、弓削 進弥、小川 令、福原 茂朋 「Live imaging of angiogenesis during cutaneous wound healing in adult zebrafish」 平成30年度日本医科大学先端医学研究所公開セミナー 発表#P14 川崎(日本医科大学先端医学研究所) 2018年12月19日

ポスター 弓削 進弥 「血管新生は内腔圧により機械的伸展刺激を介して制御される」 平成30年度日本医科大学先端医学研究所公開セミナー 川崎(日本医科大学先端医学研究所) 2018年12月19日

口演 弓削 進弥、有馬 勇一郎、花田 三四郎、若山 勇紀、望月 直樹、西山 功一、福原 茂朋 「創傷治癒の蛍光ライブイメージングにより明らかになった新たな血管新生の制御機構」 第73回 Blood Vessel Club 東京(東京大学本郷キャンパス医学部3号館) 2018年7月30日

シンポジウム 弓削 進弥、有馬 勇一郎、花田 三四郎、若山 勇紀、望月 直樹、西山 功一、福原 茂朋 「創傷治癒における血管新生のライブイメージングにより明らかになった新たな血管新生の制御機構」 第25回日本血管生物医学学会学術集会(心血管代謝週間〔CVMW〕2017) 発表#S2-4 大阪(大阪国際交流センター) 2017年12月8-10日

口演(選抜) 弓削 進弥、有馬 勇一郎、花田 三四郎、若山 勇紀、横川 隆司、三浦 岳、望月 直樹、西山 功一、福原 茂朋 「ゼブラフィッシュの蛍光ライブイメージングを用いた

内腔圧による血管新生制御機構の解明」第25回日本血管生物医学会学術集会（心血管代謝週間〔CVMW〕2017）大阪（大阪国際交流センター）2017年12月8-10日

若手研究者最優秀演題賞受賞

**ポスター** 野一色 千景、**弓削 進弥**、小川 令、福原 茂朋 「ゼブラフィッシュ成魚の蛍光生体イメージングによる創傷治癒における血管新生過程の解明」平成29年度日本医科大学先端医学研究所公開セミナー 川崎（日本医科大学先端医学研究所）2017年9月27日

**口演** **弓削 進弥** 「ゼブラフィッシュ蛍光ライブイメージングを用いた新しい血管新生制御機構の解明」平成29年度日本医科大学先端医学研究所公開セミナー 川崎（日本医科大学先端医学研究所）2017年9月27日

**口演** **弓削 進弥**、有馬 勇一郎、花田 三四郎、若山 勇紀、横川 隆司、三浦 岳、望月 直樹、西山 功一、福原 茂朋 「ゼブラフィッシュ成魚の蛍光生体イメージングによる創傷皮膚での血管新生機構の解明」第88回日本動物学会大会 富山（富山県民会館）2017年9月21-23日

**ポスター** **弓削 進弥**、有馬 勇一郎、花田 三四郎、若山 勇紀、横川 隆司、三浦 岳、望月 直樹、西山 功一、福原 茂朋 「内腔圧による血管新生の新たな制御機構の解明」Molecular Cardiovascular Metabolic Conference 2017 神戸（神戸ベイシェラトン&タワーズ）2017年9月1-2日

**口演** 野一色 千景、**弓削 進弥**、小川 令、福原 茂朋 「ゼブラフィッシュ成魚の蛍光成体イメージングによる創傷治癒における血管新生過程の解明」第16回谷根千形成懇話会 東京（秋葉原UDXカンファレンス）2017年7月8日

**ポスター** **弓削 進弥**、有馬 勇一郎、若山 勇紀、横川 隆司、三浦 岳、望月 直樹、西山 功一、福原 茂朋 「内腔圧が血管新生を調節するゼブラフィッシュ成魚皮膚のライブイメージングによる発見」第69回日本細胞生物学会大会 仙台（仙台国際センター）2017年6月13-15日

〔図書〕(計 1 件)

**弓削 進弥**、藤原 正和、福原 茂朋 《特集 新しい医療を拓くメカノバイオロジー》「5. 血管新生のメカノバイオロジー」医薬ジャーナル（曾我部正博 編）医薬ジャーナル社、大阪、Vol. 53 (No. 6): pp. 79-82、2017年

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名： 無し

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名： 野一色 千景

ローマ字氏名： (NOISHIKI, Chikage)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。