

令和元年6月3日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19689

研究課題名(和文)血管新生における血管内腔圧の新たな機能の解明

研究課題名(英文)Elucidation of novel function of intravascular pressure in angiogenesis

研究代表者

福原 茂朋(Fukuhara, Shigetomo)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：70332880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：創傷治癒に伴う血管新生において、血流に対して下流側に位置する損傷血管は伸長するのに対し、上流側の損傷血管は伸長しないこと、また、その原因として、心臓のポンプ機能による内腔圧が上流損傷血管の伸長を阻害していることを示した。内腔圧は、上流損傷血管を拡張させ、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Arp2/3複合体の動員を抑えること、また、それにより先端端におけるアクチン重合と前後軸極性の形成が抑制され、内皮細胞の遊走および血管伸長が阻害されることが明らかになった。これにより、内腔圧による血管新生の新たな役割とそのメカニズムを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はこれまでゼブラフィッシュ成魚を用いた皮膚創傷治癒に伴う血管新生のライブイメージングから、「創傷時血管新生では、血流に対して下流側の損傷血管のみ伸長し、上流側の血管は内腔圧が高く伸長しない」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。本研究は、この発見をもとに血管新生における内腔圧の新たな役割とそのメカニズムを明らかにした点で学術的意義がある。また、本研究結果は、内腔圧をターゲットにした新たな血管再生療法の開発など、今後の医療の発展にも寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Fluorescence-based live-imaging of angiogenesis in wounded skin of adult zebrafish showed that elongation of the injured blood vessels was actively induced from the downstream side of blood flow, while the vessels at the upstream side only marginally elongated due to the high intravascular pressure. As the underlying mechanisms, we found that intravascular pressure induced expansion of the injured upstream vessels, which mechanically stretched the endothelial cells (ECs). Furthermore, we showed that intravascular pressure-induced stretching of ECs prevented localization of Arp2/3 actin polymerization complex at leading edge, which resulted in inhibition of actin polymerization and disruption of front-rear polarity of ECs, thereby suppressing elongation of the injured upstream vessels. Thus, this study uncovers an important role of intravascular pressure in regulation of wound angiogenesis.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管新生 イメージング 創傷治癒 内腔圧 アクチン細胞骨格 伸展刺激 細胞極性 ゼブラフィッシュ 蛍光イメ

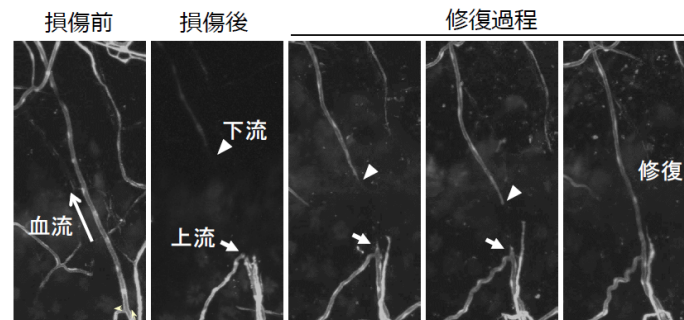
様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

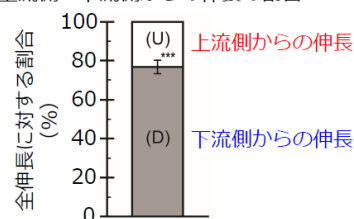
血管新生とは、既存の血管から血管枝が出芽・伸長し新たな血管網を構築する現象であり、生体恒常性維持に関わる生理的な血管新生と、逆に疾患の発症・進展に関わる病的な血管新生の二つに分類される。そのため、生体の恒常性維持機構やその破綻に起因する疾患の発症機序の解明には、血管新生の制御機構の理解が極めて重要である。

我々はこれまでに、ゼブラフィッシュをモデル脊椎動物として用いた蛍光イメージングにより、生体内の細胞機能や分子活性をライブで解析する“*in vivo* 細胞生物学研究”を確立し、血管新生の制御機構について研究を進めてきた。また、成魚を長時間ライブイメージングする技術を独自に確立し、皮膚の創傷治癒に伴う血管新生をライブイメージングにより解析した。その結果、「皮膚の創傷治癒過程において、血管新生により損傷血管が修復する際、血流に対して上流に位置する損傷血管は伸長せず、下流に位置する血管が伸長し血管を再生する」という興味深い現象を発見した(図1)。心臓のポンプ機能によって、血流に対して上流の損傷血管では内腔圧が高いことが予想されるため、本発見は「内腔圧が血管新生における血管枝の伸長を制御する」可能性を示唆している。そこで、マイクロ流体デバイスを用いて血管新生における血管伸長を *in vitro* の3次元環境下で再現する系を確立し、上記仮説の検証を行った。その結果、内腔圧負荷が血管新生における血管伸長を抑制することを確認した。

図1 切断された損傷血管では血流に対して下流の血管が伸長する



損傷血管の修復における、血管の全伸長に対する上流側・下流側からの伸長の割合



2. 研究の目的

上記研究背景を踏まえ、本研究では、まず、創傷治癒過程の血管新生において、内腔圧が血流に対して上流に位置する損傷血管の伸長を抑えていることを確認する。さらに、内腔圧が創傷治癒過程の血管新生における血管伸長を抑えることが確認できれば、その分子メカニズムを明らかにする。それにより、全く新しい内腔圧による血管新生の制御機構を提唱する。

3. 研究の方法

(1) 蛍光イメージング解析に使用したゼブラフィッシュライン

ゼブラフィッシュを用いた動物実験は、日本医科大学の実験動物委員会での承認を受け、当大学の動物実験の指針を順守して実験を遂行した。創傷治癒に伴う血管新生のライブイメージングを行うため、内皮細胞で蛍光蛋白質を発現するゼブラフィッシュを使用した (*Tg(kdr1:GFP)*、*Tg(fli1a:Myr-GFP)* など)。また、内皮細胞のアクチン細胞骨格を可視化するため *Tg(Lifeact-mCherry)* フィッシュを、前後軸極性を解析するためゴルジ体を可視化する *Tg(fli1a:YFP-golgi)* を使用した。

(2) 創傷治癒に伴う血管新生のライブイメージング解析

2-phenoxyethanol 含有飼育水を持続的に成魚の口から鰓にかけて還流させることで麻酔をかけ顕微鏡下にセットした。共焦点走査型レーザー顕微鏡下で皮膚の真皮層に至る傷害を加え、その後の創傷治癒に伴う血管新生をライブで観察した。

節間血管の損傷に伴う血管再生については、受精後3日目の幼魚を使用した。アガロースに固定した幼魚を2光子励起顕微鏡下にセットし、レーザー光照射により節間血管に傷害を加え、損傷血管の修復過程をライブイメージングにより観察した。

(3) マイクロ流体デバイスを用いた血管新生実験

Polydimethylsiloxane を材料として作製したマイクロ流体デバイス内にヒト臍帯静脈血管内皮細胞及び肺繊維芽細胞を播種し、3次元環境下で血管新生における血管伸長を再現した。血管伸長における内腔圧の効果を解析するため、伸長する血管には内腔に2 mmHg程度の圧力を負荷した。培養終了後、細胞を固定し免疫染色法によりアクチン細胞骨格や Arp2/3 複合体の局在を観察した。

4. 研究成果

(1) 創傷治癒過程の血管新生において、損傷血管の伸長が血流に対して上流側と下流側で異なる原因究明
組織損傷により、組織が低酸素状態に陥ると血管新生因子が産生され、血管新生が誘導される。

そのため、血流に対して上流側と下流側の損傷血管の伸長が異なる原因として、低酸素状態が上流側と下流側で異なる可能性を考えた。しかし、低酸素プローブを用いて損傷組織の低酸素状態を測定したところ、上流側と下流側の血管周囲組織の低酸素状態に差は認められなかった。このことから下流損傷血管の選択的な伸長は、低酸素状態の違いによるものでないことが示された。

心臓のポンプ機能により、内腔圧が上流損傷血管では高く、下流損傷血管では低いことが予想される。また、これまでのマイクロ流体デバイスを用いた血管新生実験から、内腔圧負荷が血管新生における血管伸長を抑えることを確認している。そこで、損傷組織においても、血管の内腔圧が下流損傷血管の伸長を抑えているか検討した。具体的には、成魚皮膚血管に損傷を加え、その後、上流損傷血管のさらに上流部位に損傷を加えることで、上流損傷血管に負荷されている圧力を解除した。その結果、内腔圧の除去によって、通常伸長しない上流損傷血管が下流損傷血管と同程度まで伸長するようになった。これら結果から、内腔圧が上流損傷血管の伸長を抑えていることが明らかになった。

(2) 内腔圧が血管新生における血管伸長を抑えるメカニズム

内腔圧が血管新生における血管伸長を抑える機構を明らかにするため、損傷した血管の先端構造を詳細に解析した。血流に対して下流側に位置する損傷血管は、先端に突起構造を形成していたのに対し、内腔圧の負荷された上流の損傷血管は、拡張し先端構造が球状化していることが分かった。また、血流を停止することによって、拡張した上流損傷血管が収縮し、再度、血流を再開させることで、拡張したことから、血流に起因する内腔圧が上流損傷血管を拡張していることが示された。また、マイクロ流体デバイスを用いた *in vitro* 血管新生実験により、伸長する血管に内腔圧を負荷すると血管が拡張し伸長が停止したが、内腔圧を解除すると血管は収縮し、伸長を再開させた。さらに、血管の拡張が血管伸長を抑えているか知るため、内腔圧と間質圧を同時に負荷したところ、内皮細胞に圧力は負荷されているものの、血管は拡張せずに、伸長した。以上の結果から、内腔圧は上流損傷血管を拡張することで内皮細胞に伸展刺激を負荷し、血管伸長を抑えていることが示された。

(3) 内腔圧による内皮細胞への伸展刺激が血管伸長を抑制するメカニズム

内腔圧による内皮細胞への伸展刺激が、血管伸長を抑えるメカニズムについて検討した。これまでに、細胞膜にかかる張力が、アクチン重合を阻害することで、細胞の極性形成と一方向移動を制御することが報告されている (Houk et al. Cell 2012)。具体的には、極性を持って一方向に遊走する細胞では、先端で活発にアクチン重合が起こり、膜が伸展する。この先端における膜の伸展によって、後方の細胞膜に張力がかかり、この張力が後方の細胞膜におけるアクチン重合を阻害し、2次先端の形成を阻害する。それにより、細胞の前後軸極性が維持され、細胞が一方向に移動できると考えられている。そこで、まず、内腔圧負荷が伸長する血管の内皮細胞の前後軸極性に与える効果を検討した。内皮細胞の核とゴルジ体を蛍光でラベルしたゼブラフィッシュを用いて、損傷節間血管の内皮細胞の前後軸極性を解析した。血流に対して下流側の損傷血管を形成する内皮細胞では、ゴルジ体が核の前方に位置していたことから、これら内皮細胞は前後軸極性を形成して遊走していることが分かった。一方、血流に対して上流側に位置する損傷血管の内皮細胞では、ゴルジ体がランダムに位置しており、前後軸極性を消失していることが示された。さらに、マイクロ流体デバイスを用いた *in vitro* 血管新生実験を行ったところ、伸長する血管の内皮細胞は前後軸極性を形成していたのに対し、内腔圧負荷により内皮細胞の極性が消失することが分かった。以上の結果から、内腔圧による内皮細胞への伸展刺激が、上流損傷血管の内皮細胞の前後軸極性を消失させていることが示された。

次に、内皮細胞に負荷された伸展刺激及びそれに伴う細胞膜張力の上昇が、内皮細胞におけるアクチン重合を阻害するか知るため、*in vitro* 創傷治癒実験を実施した。ストレッチチャンバーにアクチン可視化プローブ (Lifeact-mCherry) を発現する内皮細胞をコンフルエントの条件で播種し、細胞シートに傷をつけることで内皮細胞の一方向移動を誘導した。その後、内皮細胞に10%程度の伸展刺激を負荷し、その際のアクチン細胞骨格の変化を検討した。伸展刺激負荷前の細胞は、先端でアクチン重合を誘導し、ラメリポディアを形成しながら遊走していたのに対し、伸展刺激負荷によって、アクチン重合が阻害され、先端におけるラメリポディアの形成が顕著に減少した。このことから、極性を持って一方向に移動する内皮細胞に伸展刺激を負荷すると、先端におけるアクチン重合、ラメリポディア形成が阻害されることが分かった。

さらに、ゼブラフィッシュにおける損傷節間血管の内皮細胞のアクチン細胞骨格を解析した。血流に対して下流側の損傷血管の先端では、活発にアクチン重合が起こり、血管伸長方向に突起を形成していることが分かった。一方、上流損傷血管の先端は拡張しており、アクチン繊維が顕著に減少していた。また、マイクロ流体デバイスを用いた *in vitro* 血管新生実験を行ったところ、伸長する血管の内皮細胞の先端では、アクチン重合が活発に起こり、血管伸長方向に突起を形成していたのに対し、内腔圧負荷によりそれが顕著に抑制された。以上の結果から、内腔圧による内皮細胞への伸展刺激が、先端におけるアクチン重合と突起形成を阻害することで、内皮細胞の前後軸極性を消失し、それにより損傷上流血管の伸長を抑えていることが示唆された。

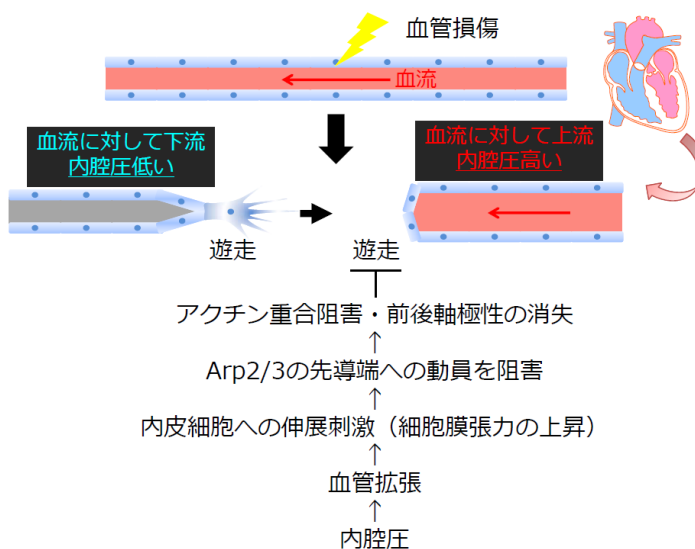
(4) 内腔圧による内皮細胞への伸展刺激が先端端におけるアクチン重合を抑制するメカニズム

内腔圧による内皮細胞への伸展刺激が先端端におけるアクチン重合を抑制するメカニズムを理解するため、アクチン重合促進因子の一つ Arp2/3 複合体に着目した。Arp2/3 は網目状のアクチン重合を促進することで、細胞膜を伸長させる。マイクロ流体デバイスを用いた *in vitro* 血管新生実験により、伸長する血管の内皮細胞の先端端には Arp2/3 複合体がドット状で局在しているおり、内腔圧負荷によりその局在が消失することが分かった。また、Arp2/3 阻害剤処理により血管伸長が抑えられた。また同様に、Arp2/3 阻害剤処理により、血流に対して下流側の損傷節間血管の伸長が顕著に抑えられた。以上の結果から、創傷時血管新生において、血流に対して下流側の内皮細胞は、先端端に Arp2/3 複合体を動員することで、アクチン重合と突起形成を促進し、前方に移動していること、また、上流損傷血管では内腔圧負荷による内皮細胞への伸展刺激が Arp2/3 複合体の先端端への動員を抑制することで、アクチン重合と突起形成を阻害し、血管伸長を抑えていることが示唆された。また、血管新生による節間血管形成における Arp2/3 阻害剤の効果を検討したところ、Arp2/3 阻害剤は節間血管形成時の血管伸長を阻害したことから、発生期血管新生にも関与すると考えられる。

(5) 内腔圧が創傷治癒における血管新生を制御するメカニズム

以上の結果から、創傷などにより血管が損傷を受けると血管新生が誘導され、損傷血管が修復するが、この際、血流に対して下流側に位置する損傷血管が伸長することで血管を修復するのに対し、上流側に位置する損傷血管は伸長しないことが分かった。また、その原因として、上流損傷血管では心臓のポンプ機能によって内腔圧が高く、この内腔圧が上流血管の伸長を抑えていることを発見した。さらに、内腔圧が血管伸長を抑えるメカニズムとして、内腔圧は上流損傷血管を拡張させることで内皮細胞に伸展刺激を負荷すること、また、この内皮細胞

図2 内腔圧による血管新生の制御機構



への伸展刺激が、Arp2/3 複合体の先端端への動員を阻害することで、アクチン重合と前後軸極性の形成を抑え、内皮細胞の遊走と血管伸長を抑制していることが明らかになった。これにより、内腔圧による血管新生の新たな役割とそのメカニズムを明らかにした。今後、内皮細胞の細胞膜張力の上昇が Arp2/3 複合体の先端端への動員を抑制する分子メカニズムについて検討を行う。また、内腔圧による血管新生の制御が、生理的・病的な血管新生においてどのような役割を持つのか解析を進める。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Rho S., Kobayashi I., Oguri-Nakamura E., Ando K., Fujiwara M., Kamimura N., Hirata H., Iida A., Iwai Y., Mochizuki N., Fukuhara S. (Corresponding author). Rap1b promotes Notch signal-mediated hematopoietic stem cell development by enhancing integrin-mediated cell adhesion. *Dev Cell* Published Online April 18, 2019. doi: 10.1016/j.devcel.2019.03.023 査読有
- ② *Noishiki C., *Yuge S., Ando K., Wakayama Y., Mochizuki N., Ogawa R., Fukuhara S. (Corresponding author). Live imaging of angiogenesis during cutaneous wound healing in adult zebrafish. *Angiogenesis* 22(2): 341-354 (2019) Jan 4. doi: 10.1007/s10456-018-09660-y. *Equal contribution. 査読有
- ③ Ando K., Wang W., Peng D. Chiba A., Barske L., Crump J.G., Stainier D.Y.R., Lendahl U., Lagendijk A., Koltowska K., Hogan B.M., Fukuhara S., Mochizuki N., Betsholtz C. Peri-arterial specification of vascular mural cells from naïve mesenchyme requires Notch signaling. *Development* 2019 Jan 25;146(2). doi: 10.1242/dev.165589. 査読有
- ④ Rho S., Ando K., Fukuhara S. (Corresponding author). Dynamic regulation of vascular permeability by vascular endothelial cadherin-mediated endothelial cell-cell junctions. *J. Nippon*

- Med. Sch.** 84 (4): 148-159 (2017). doi: 10.1272/jnms.84.148. 査読有
- ⑤ Takara K., Eino D., Ando K., Yasuda D., Naito H., Tsukada Y., Iba T., Wakabayashi T., Muramatsu F., Kidoya H., Fukuhara S., Mochizuki N., Ishii S., Kishima H., Takakura N. Lysophosphatidic acid receptor 4 activation augments drug delivery in tumors by tightening endothelial cell-cell contact. **Cell Reports** 20 (9): 2072-2086 (2017). doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.080. 査読有
- ⑥ Miura K., Nojiri T., Akitake Y., Ando K., Fukuhara S., Zenitani M., Kimura T., Hino J., Miyazato M., Hosoda H., Kangawa K. CCM2 and PAK4 act downstream of atrial natriuretic peptide signaling to promote cell spreading. **Biochem. J.** 474: 1897-1918 (2017). doi: 10.1042/BCJ20160841. 査読有
- ⑦ Nakajima H., Yamamoto K., Agarwala S., Terai K., Fukui H., Fukuhara S., Ando K., Miyazaki T., Yokota Y., Schmelzer E., Belting H.-G., Affolter M., Lecaudey V., Mochizuki N. Flow-dependent endothelial YAP regulation that contributes to vessel maintenance. **Dev. Cell** 40 (6): 523-536 (2017). doi: 10.1016/j.devcel.2017.02.019. 査読有
- ⑧ Chiba A., Watanabe-Takano H., Terai K., Fukui H., Miyazaki T., Uemura M., Hashimoto H., Hibi M., Fukuhara S., Mochizuki N. Osteocrin, a peptide secreted from the heart and other tissues, contributes to cranial osteogenesis and chondrogenesis in zebrafish. **Development** 144 : 334-344 (2017). doi: 10.1242/dev.143354. 査読有

[学会発表] (計 23 件)

- ① 福原茂朋、弓削進弥、演題名「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、平成 31 年 3 月 27 日
- ② 福原茂朋、弓削進弥、演題名「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)、平成 31 年 3 月 21 日
- ③ 福原茂朋、演題名「創傷治癒における血管新生の蛍光ライブイメージング」生理学研究所研究会 2018 「心臓・血管系の頑健性と精緻な制御を支える分子基盤の統合的解明」(自然科学研究機構岡崎コンファレンス センター)、平成 30 年 11 月 1 日
- ④ 福原茂朋、演題名「蛍光生体イメージングにより明らかになった血管新生における内腔圧の新たな機能」第 40 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (日本薬学会) (東北大学百周年記念会館 川内萩ホール)、平成 30 年 10 月 19 日
- ⑤ 福原茂朋、演題名「血管新生における内皮細胞移動メカニズム」第 91 回日本生化学会大会、シンポジウム「組織構築・修復における細胞リポジショニング：機能的配置を決定する細胞移動メカニズム」(国立京都国際会館)、平成 30 年 9 月 24 日
- ⑥ Shigetomo Fukuhara. “Angiogenesis and hematopoiesis: Lessons from zebrafish.” KAIST seminar. (KAIST, Korea). July 3, 2018
- ⑦ 福原茂朋、若山勇紀、藤原正和、園井理恵、望月直樹、演題名「血管新生における内皮細胞の集団運動を制御する分子メカニズム」第 95 回日本生理学会大会、公募シンポジウム「集団的細胞運動 - その分子細胞生理学と疾患 -」(高松)、平成 30 年 3 月 28 日
- ⑧ 福原茂朋、演題名「これまでの血管研究を振り返って」第 4 回日本血管生物医学会若手研究会、特別講演 (熊本大学薬学部宮本記念館)、平成 30 年 3 月 2 日
- ⑨ Shigetomo Fukuhara. “Intravascular pressure restricts angiogenesis through mechanical stretching of endothelial cells.” 3rd International Symposium on Mechanobiology: AMED-CREST/PRIME Special Session II-Mechanobiology of muscles and blood vessels. (Singapore). December 13, 2017
- ⑩ 福原茂朋、演題名「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」心血管代謝週間 CVMW2017 合同シンポジウム 2 「心血管系の発生分化と再生研究の新たなアプローチ」(大阪国際交流センター)、平成 29 年 12 月 9 日
- ⑪ 福原茂朋、演題名「創傷治癒過程の血管新生における内皮細胞・ペリサイト動態のライブイメージング」ConBio2017「血管周囲細胞群の分子生物学 - 基礎から臨床応用にかけて -」(神戸ポートアイランド)、平成 29 年 12 月 7 日
- ⑫ 福原茂朋、演題名「蛍光イメージングが解き明かす血管構築メカニズム」関西血管生物研究会 2017 (TKP ガーデンシティ大阪梅田)、平成 29 年 10 月 28 日
- ⑬ 福原茂朋、演題名「蛍光生体イメージングによる血管構築メカニズム」第 59 回日本平滑筋学会総会学会企画シンポジウム 2 「先端可視化技術による臓器機能研究の新展開」(福岡大学)、平成 29 年 8 月 25 日
- ⑭ Shigetomo Fukuhara. “Live imaging of wound angiogenesis uncovers a novel inhibitory role of intravascular pressure in angiogenesis.” 15th Japan-Korea Joint Symposium of Vascular Biology. (Muju, Korea). August 24, 2017

[図書] (計 2 件)

- ① 福原茂朋. 血管透過性のダイナミックかつ巧妙な制御を可能にするシグナル伝達系, 「生

化学」89-3 号近畿支部企画『基礎と臨床をつなぐ血液・血管生物学』, 生化学会, 89(3): 368-376, 2017

- ② 弓削進弥, 藤原正和, 福原茂朋. 血管新生のメカノバイオロジー, 医薬ジャーナル, 6月号特集「新しい医療を拓くメカノバイオロジー」, 医薬ジャーナル社, 53(6): 79-82, 2017

[その他]

ホームページ等

<http://www.nmsbyoutai.com/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：西山 功一

ローマ字氏名：(Nishiyama, Koichi)

所属研究機関名：熊本大学

部局名：国際先端医学研究機構

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：80398221

(2)研究協力者

研究協力者氏名：弓削 進弥

ローマ字氏名：(Yuge, Shinya)

※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。