

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04446

研究課題名(和文) 血流とペリサイトの協奏による血管新生メカノバイオロジー機構

研究課題名(英文) Angiogenic machinery via concerted biomechanical control by blood flow pericyte

研究代表者

西山 功一 (Nishiyama, Koichi)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：80398221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：血管は一度傷ついても、血管新生により修復される。本研究において、血流により生じる血管内の圧力が、血管新生を抑制することを発見した。さらに、血管を構成している血管内皮細胞が、血管の内圧によって生じて血管が引っ張られる力を感知して、血管新生が抑制される分子メカニズムを明らかにした。また、血管内皮細胞を囲む様に存在するペリサイトは、血管の拡張に伴う血管新生の抑制をさらに制御し、血流とペリサイトにより協調的に血管新生を調節するしくみが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、圧力や伸展張力といった物理的な刺激を、我々の体の細胞がどのように感知して、そして、それをどのように化学的な信号に変えて生命現象の達成に使っているかという、生命の根本原理の理解に迫るための一助になると期待される。加えて、今回の発見は、血管内腔圧とそれに伴って生じる血管壁伸展メカニズムやペリサイト機能を標的にした、虚血性疾患、創傷治癒、そしてがんといった血管新生が深く関わる病態への治療的介入につながっていくと期待され、臨臨床的な観点からも、社会に広く貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Once blood vessel is damaged, it is repaired by angiogenesis. In this study, we recovered that angiogenesis is suppressed by intravascular pressure caused by blood flow. In addition, we uncovered the molecular mechanism of how vascular endothelial cells composing angiogenic sprouts sense vascular wall tension generated by intravascular pressure load to suppress angiogenesis. We further uncovered that perivascular pericytes adjust vascular dilation-caused suppression of angiogenesis and angiogenesis is controlled coordinately by blood flow and pericytes.

研究分野：血管生物医学

キーワード：血管新生 血管内皮細胞 ペリサイト 血流 血管内腔圧 血管壁伸展 微小流体デバイス 方向性運動

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 組織が増大すると組織内部は低酸素状態となり、それを解除するために既存の血管網から新たに血管を増生させる。この血管新生において、伸長した血管にはすぐに管腔が形成され血液が流入する(血流)。この血管伸長と管腔形成が繰り返され血管は新生するため、新生血管は血流による機械刺激を受けると考えられる。また、ペリサイトは、新生血管枝の壁に沿って内皮細胞を追跡し血管新生に参加する。しかし、血流とペリサイトの血管新生における作用、および両者の関連性に関しては、十分に明らかにされていなかった。

(2) 血流により、シェアストレス、血管内腔圧、血管壁伸展張力の3つの機械刺激が生じうる。中でも、盲端である新生血管の管腔には心臓のポンプ圧の作用で常に血液が流れこむことから、新生血管は主に内腔圧とそれに伴って生じる壁伸展刺激を受けると想定されるが、生体内で血流を直接操作し各血流刺激特異的な効果を解析することは方法論的に極めて難しい。この方法論の壁を克服すべく、我々は、微小流体デバイス上で血管新生を誘導し、構築した血管網に流量制御下に培地を灌流し、生体外で血流の血管新生への作用を解析するシステムを構築した。さらに、この方法を用いて、血流による内腔圧・壁伸展刺激が、内皮細胞の前後極性と方向性運動を消失させることにより、血管新生を抑制することを見出していた。しかし内皮細胞において、内腔圧・壁伸展刺激がいかにして感知・伝達されるのか、というメカノバイオロジー機構は不明であった。

(3) 一方、ペリサイトの血管壁成熟・安定化作用はよく研究されていた中、我々は、ペリサイトが内皮細胞の方向性運動を促進し血管新生を正に制御する新たな作用を持つ可能性を見出していた。さらに、ペリサイトが適切に新生血管を被覆すると内腔圧・壁伸展刺激による血管新生抑制作用が生じないことが、微小流体デバイスを使った実験結果から明らかになっていた。つまり、ペリサイトが、血流による血管新生抑制的な作用をさらに抑制的に制御し、血管新生を調節しているしくみが想定されていたが、その詳細なメカニズムに関しては不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、以下の項目を明らかにし、『血流とペリサイトの協奏による血管新生メカノバイオロジー機構』という全く新しい血管新生メカニズム概念を提唱すること、さらに、血管新生を標的とした画期的な医療、再生医療の創成に発展させることを目的とした。

内腔圧・壁伸展刺激が内皮細胞で感知・伝達され、内皮細胞運動を抑制し血管新生を調節するメカニズム

ペリサイトが内腔圧・壁伸展刺激による内皮細胞運動の抑制をさらに制御し、血管新生を調節するメカニズム

### 3. 研究の方法

(1) 微小流体デバイス上で、ヒト臍帯静脈内皮細胞をヒト肺繊維芽細胞と共培養し、灌流可能な新生血管を細胞外基質内に3次元的に誘導した。さらに、内皮細胞にペリサイトを混和させ、ペリサイト被覆のある新生血管を同様に誘導した。また、以下の様に血管内外から静水圧を負荷し、内腔圧・壁伸展刺激を再現した(血管外圧<血管内圧 壁伸展, 血管拡張あり、血管外圧=血管内圧 内腔圧, 拡張なし)。

(2) 上記方法(1)の微小流体デバイス解析系において、静水圧負荷により新生血管先端部分の内腔圧・血管壁伸展を受けた血管内皮細胞が、その機械刺激を感知し、細胞の前後極性を失い、それにより方向性運動が障害されることで血管新生が抑制される分子メカニズムを、タイムラプス解析、免疫組織学的解析および薬理的・遺伝的介入による機能阻害解析を用いて検討した。特に、血管内皮細胞が、内腔圧・壁伸展刺激を感知するメカノセンシング分子として、膜タンパク質 BAR に着目した。

(3) 微小流体デバイス上で、血管内皮細胞のみにより血管新生を再現し、タイムラプス解析を行うことで、血管伸長から管腔形成に至る形態形成中の血管内皮細胞の方向性運動の動態を捉え、そのタイムラプス画像から、形態形成と血管内皮細胞の方向性運動の関係性を定量的に解析した。

(4) 微小流体デバイス上で、血管内皮細胞とペリサイトによる血管新生を同様に再現し、上記(3)と同様な方法で、ペリサイトの存在により、形態形成と血管内皮細胞運動の関係性がどのように変化するか検討した。さらに、ペリサイトの作用として、血管基底膜を含めた血管周囲基質環境の変化に着目し、免疫組織学的解析によりその構成成分を、また、マイクロレオロジー解析によりその硬さを解析した。

(5) マウス網膜血管新生において、PDGF 受容体抗体投与により新生血管へのペリサイトの被覆を失くし、ホルマウント免疫染色にて、ペリサイト有無による血管形態、血管伸長度合い、内皮細胞前後極性、血管基底膜成分の変化を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 血流による血管内腔圧負荷がかかると新生血管は拡張し、血管壁を構成する血管内皮細胞には円周方向の細胞膜伸展負荷がかかる。その際に、血管内皮細胞の血管先端側に向かう血管内皮細胞の方向性運動が障害され、血管新生が抑制されるが、本研究でそのメカノセンシング・トランスダクション機構を明らかにした。血管伸長中の新生血管内皮細胞は、血管先端側の細胞先端側に局在する Arp2/3 複合体、WASP を基点としたアクチンの重合反応により、先端側の内皮細胞膜を押し出す形で糸状仮足(フィロポディア)を盛んに伸ばす。また、血管内皮細胞は血管伸長方向に沿って前後軸極性を獲得して、血管先端方向への方向性運動を行なっている。その際に、細胞膜の曲率を認識して結合する膜タンパク質 BAR ファミリーの中の TOCA-1、CIP4 が、新生血管の内皮細胞の先端側に局在することが、Arp2/3 複合体と以降のアクチン重合に至るカスケードにおいて、重要であることがわかった(図1)。一方、内腔圧および血管壁伸展負荷がかかると、血管を構成する血管内皮細胞の細胞膜は、血管円周方向に伸展を受けるため、細胞膜の曲率を認識する TOCA-1、CIP4 は血管内皮細胞膜先端に結合することができなくなり、Arp2/3 複合体の局在と以降のカスケードが阻害され、血管内皮細胞の方向性運動の障害から血管新生の抑制に至る、メカノバイオロジー機構を解明した(図1)。この中で、TOCA-1 と CIP4 は、血管内皮細胞において、血管壁伸展のセンサー分子であることが示された。本研究では、血管内腔圧による新たな血管新生の抑制機構とその分子機構を世界で初めて示すことに成功し、論文文化に至った(*Nat Commun* 13(1):2594, 2022)。

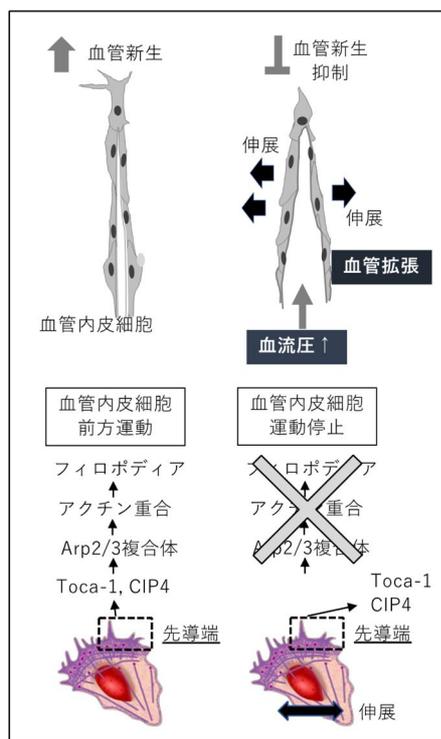


図1：内腔圧・壁伸展刺激により制御される血管新生メカノバイオロジー機構

(2) 血管内腔圧による血管新生抑制作用は、実際に、創傷治癒の血管修復過程といった生体内において機能していることを、共同研究者(日本医大、福原茂朋教授)と明らかにした。ゼブラフィッシュ稚魚ならびに成魚における血管切断モデルにおいて、血管の修復過程を、血管を蛍光標識したゼブラフィッシュでタイムラプス観察したところ、血管切断前に流れていた血流の上流側の血管断端からは、血管は修復されず、下流側の血管からのみ血管が伸長し損傷血管が修復されることがわかった。上流側断端の血管には、血管切断後も引き続き心臓ポンプ圧によって血流が流入し、そこには、血管内腔圧がかかる。薬理的な介入、または物理的な内腔圧の解除により、上流断端の血管からも血管が修復されることが分かり、生体内において、血管内腔圧による血管新生の抑制作用が証明された。また、その際のメカノバイオロジー機構も同様に示された(*Nat Commun* 13(1):2594, 2022)。今回の発見は、血管内腔圧とそれに伴って生じる血管壁伸展メカニズムを標的にした病態への介入の可能性を示唆している。虚血血管新生や創傷時の血管新生においては、血管壁伸展を抑える治療介入が効果的である可能性がある。微小血管内圧を抑えて血管拡張を出来るだけ抑えるアプローチ、または、血管周囲の硬さを上げ、同じ血管内圧でも血管壁を伸展させないようにするアプローチが考えられる。逆に、がんの血管新生の場合、血管内圧・外圧のバランスを内圧優位に仕向け、血管壁を伸展させることで血管伸長を抑制する方法が効果的と考えられる。このように、今後は、血管内圧や壁伸展、またそのメカのバイオロジー分子機構を標的とした血管新生制御と病態治療の開発に研究を展開させていく。

(3) 微小流体デバイスを使った血管内皮細胞による血管新生のタイムラプス観察から、血管新生で管腔が形成されていく際に、血管内皮細胞の血管先端側に向かう方向性運動が抑制されることもわかってきた。タイムラプス画像から、血管内皮細胞の血管先端側への移動スピードと、血管内腔の拡張動態の相関性を定量的に検討したところ、血管の拡張直後に、内皮細胞の移動スピードがスローダウンすることがわかった。また、ペリサイトと血管内皮細胞による血管新生においては、血管内腔の拡張が抑えられるとともに、血管内皮細胞の血管先端方向への移動スピードがスローダウンせず、血管の伸長スピードが促進することがわかった。理論的に、血管の拡張性は、

血管内圧と外圧のバランス、血管自体の粘弾性(硬さ)そして血管周囲の硬さに依存する。ペリサイトにより、血管外基質が硬くなり、血管内腔の拡張が抑えられているメカニズムが考えられたため、血管内皮細胞のみの血管新生の際に、架橋材により細胞外基質の硬さを増して検討したところ、ペリサイトと血管内皮細胞による血管新生同様に、血管の拡張が抑えられ、血管新生も促進した。さらに、あらかじめ細胞外基質内に導入しておいた蛍光ビーズの熱ゆらぎを測定して、細胞外基質の相対的硬さを測定したところ(マイクロレオロジー解析)、ペリサイトと血管内皮細胞により誘導した新生血管において、血管周囲の血管基底膜から細胞外基質までの硬さが、血管内皮細胞のみの血管新生に比べて増していることがわかった。最後に、ペリサイトと血管内皮細胞による新生血管の周囲の細胞外基質がなぜ硬くなるか、微小流体デバイスモデルとマウス網膜血管新生にて検討した結果、ペリサイトと血管内皮細胞による血管新生において、血管基底膜形成が、その主成分である4型コラーゲンの沈着促進により、亢進していることがわかった。現在、4型コラーゲンの沈着促進が、細胞外基質の硬さを上げている主因なのか、そして、血管内腔径や血管伸長へのペリサイトの作用に関与しているか検討を行なっている。本知見により、ペリサイトが血管外周囲基質の硬さを調節することで血管拡張を制御し、続いて血管の伸長を制御する、ペリサイトによる新たな血管新生の生体力学的制御機構を提示することができた。これまでに同様の報告はなく、新たな血管新生メカニズムとして、現在、論文化を進めている。このペリサイトの血管新生制御機構において、血管内腔圧と血管壁伸展刺激の制御を介しているかは次の課題であるが、ペリサイトを標的とした、新たな血管新生の制御ができる可能性を示唆しており、臨床的な観点からも、世に与えるインパクトは大きい。

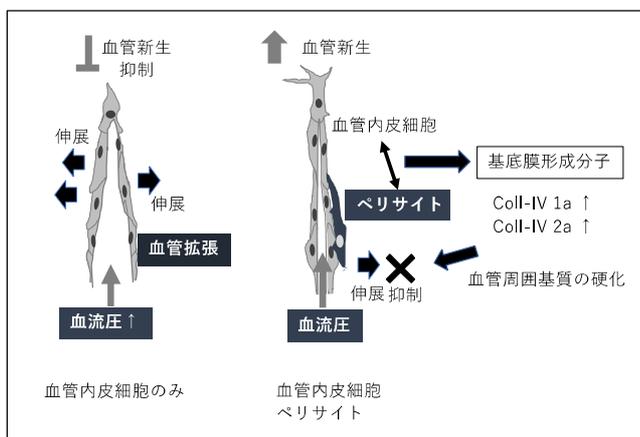


図2: ペリサイトによる血管基底膜制御を介した血管新生促進機構

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yuge Shinya, Nishiyama Koichi, Arima Yuichiro, Hanada Yasuyuki, Oguri-Nakamura Eri, Hanada Sanshiro, Ishii Tomohiro, Wakayama Yuki, Hasegawa Urara, Tsujita Kazuya, Yokokawa Ryuji, Miura Takashi, Itoh Toshiki, Tsujita Kenichi, Mochizuki Naoki, Fukuhara Shigetomo	4. 巻 13
2. 論文標題 Mechanical loading of intraluminal pressure mediates wound angiogenesis by regulating the TOCA family of F-BAR proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 23594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30197-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Masashi Muramatsu, Takeshi Ito, Hokuto Shimoji, Miko Komiya, Yuri Miyamura, Koichi Nishiyama, Takashi Suzuki, Takashi Minami	4. 巻 571
2. 論文標題 NFAT indicates nucleocytoplasmic damped oscillation via its feedback modulator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 201-209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.07.072.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Naofumi, Yamamoto Seiji, Hamashima Takeru, Okuno Noriko, Okita Naruho, Horikawa Shinjiro, Hayashi Masao, Dang Thanh Chung, Nguyen Quang Linh, Nishiyama Koichi, Makino Teruhiko, Ishii Yoko, Tomihara Kei, Shimizu Tadamichi, Shibuya Masabumi, Noguchi Makoto, Sasahara Masakiyo	4. 巻 118
2. 論文標題 Dysregulation of Amphiregulin stimulates the pathogenesis of cystic lymphangioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2019580118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2019580118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Arima Yuichiro et al.	4. 巻 3
2. 論文標題 Murine neonatal ketogenesis preserves mitochondrial energetics by preventing protein hyperacetylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 196 ~ 210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42255-021-00342-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kei Sugihara, Yoshimi Yamaguchi, Shiori Usui, Yuji Nashimoto, Sanshiro Hanada, Etsuko Kiyokawa, Akiyoshi Uemura, Ryuji Yokokawa, Koichi Nishiyama, Takashi Miura	4. 巻 15(10)
2. 論文標題 A new perfusion culture method with a self-organized capillary network	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0240552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0240552	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukushima Yoko, Nishiyama Koichi, Kataoka Hiroshi, Fruttiger Marcus, Fukuhara Shigetomo, Nishida Kohji, Mochizuki Naoki, Kurihara Hiroki, Nishikawa Shin Ichi, Uemura Akiyoshi	4. 巻 39
2. 論文標題 RhoJ integrates attractive and repulsive cues in directional migration of endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e102930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2019102930	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuji Nashimoto, Ryu Okada, Sanshiro Hanada, Yuichiro Arima, Koichi Nishiyama, Takashi Miura, Ryuji Yokokawa	4. 巻 229
2. 論文標題 Vascularized cancer on a chip: The effect of perfusion on growth and drug delivery of tumor spheroid.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 119547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2019.119547.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件(うち招待講演 6件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 花田保之, 植村明嘉, 有馬勇一郎, 加藤勝洋, 辻田賢一, 室原豊明, 西山功一
2. 発表標題 ペリサイトは、生体力学的機序により血圧上昇による血管新生抑制を回避する
3. 学会等名 第131回日本循環器学会九州地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西山 功一
2. 発表標題 血管周囲細胞ペリサイトによる力学機序を介した血管新生促進機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koichi Nishiyama
2. 発表標題 Vascular intraluminal pressure load inhibits directed endothelial cell migration in angiogenesis
3. 学会等名 The 21th international vascular biology meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西山 功一
2. 発表標題 オンチップで解く生命現象の血流依存的メカニズム
3. 学会等名 第93回日本生化学大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hanada Y, Nishiyama K
2. 発表標題 Pericytes enhance directed migration of endothelial cells in angiogenesis by controlling perivascular environment to prevent excessive vessel wall tension
3. 学会等名 第4回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hanada Y, Uemura A, Arima Y, Kato K, Tsujita K, Murohara T, Nishiyama K.
2. 発表標題 Pericyte-mediated biomechanical mechanism to control angiogenesis
3. 学会等名 第28回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koichi Nishiyama
2. 発表標題 Vascular intraluminal pressure load inhibits directed endothelial cell migration and branch elongation in sprouting angiogenesis
3. 学会等名 Gordon Angiogenesis Conference ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichi Nishiyama
2. 発表標題 Vascular intraluminal pressure inhibits angiogenic endothelial cell movement and branch elongation via vascular wall stretch
3. 学会等名 Asia/Australia Vascular Biology Meeting ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichi Nishiyama
2. 発表標題 Vascular intraluminal pressure inhibits angiogenic branch elongation
3. 学会等名 The 20th International Conference on Systems Biology ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichi Nishiyama
2. 発表標題 Blood flow-dependent biomechanical control of angiogenesis.
3. 学会等名 KAIST-KU Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichi Nishiyama
2. 発表標題 Blood flow as a regulator of neovascularization
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuyuki Hanada
2. 発表標題 Pericytes enhance directed migration of endothelial cells in angiogenesis possibly via biomechanical mechanism
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 花田 保之
2. 発表標題 血管新生においてペリサイトが内皮細胞の方向性運動を促進する生体力学的機序
3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

宮崎大学医学部機能制御学講座血管動態生化学  
<http://kumamoto-ircms-nishiyama.jp/en/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	梅本 晃正  (Umemoto Terumasa)  (50620225)	熊本大学・国際先端医学研究機構・特任准教授   (17401)	
研究分担者	植村 明嘉  (Akiyoshi Uemura)  (30373278)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授   (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------