

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06578

研究課題名（和文）力学的相互作用に基づく血管新生における細胞往復運動の動態解析

研究課題名（英文）Quantitative analysis of linear reciprocating cell movement in angiogenesis based on mechanical interactions

研究代表者

田久保 直子（Takubo, Naoko）

東京大学・アイソトープ総合センター・特任講師

研究者番号：60447315

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、血管新生における血管内皮細胞のマクロスコピックな動態特性および動態メカニズムを定量的に明らかにすることを目的とした。細胞外基質精密成形技術を用いて、培養内皮細胞のみから構成されるin vitro血管新生モデルを確立した。作製した血管新生モデルを用いて血管新生における内皮細胞動態観察を行った結果、細胞外基質外の内皮細胞供給源において細胞集団のマクロスコピックな流れが存在することが確認された。このことから、内皮細胞供給源には細胞流が引き起こす不均一な応力場が発生していると考えられる。さらに、血管伸長と細胞外基質外のマクロスコピックな細胞流が関係することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管新生におけるセルミキシングが発見されて以来、特に先端細胞の入れ替わりのミクロスコピックな分子メカニズムが注目されている。一方、本研究は、血管構造全体の細胞動態を定量的に明らかにし、セルミキシングのマクロスコピックな特性を明らかにするという特色がある。この観点から行ったこれまでの成果として、Uターン動態を初めて発見した。さらに、血管伸長とECM外のマクロスコピックな細胞流が関係することが示唆された。

本研究により、血管新生メカニズムに関する理解が深まり、癌治療などの臨床研究へと発展することが期待される。また、内皮細胞動態の知見は、集団細胞動態の基礎的研究の観点から極めて意義が高いものである。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to quantitatively clarify the macroscopic dynamic characteristics and dynamic mechanisms of vascular endothelial cells in angiogenesis. Using extracellular matrix precision molding technology, we established an in vitro angiogenesis model consisting only of endothelial cells. Using the angiogenesis model, we observed endothelial cell dynamics in angiogenesis, and confirmed the existence of a macroscopic flow of collective cells outside the extracellular matrix. This suggests that a non-uniform stress field caused by cell flow. Furthermore, it was confirmed that vascular elongation is related to a macroscopic cell flow outside the extracellular matrix.

研究分野：生物物理学

キーワード：血管新生 細胞動態

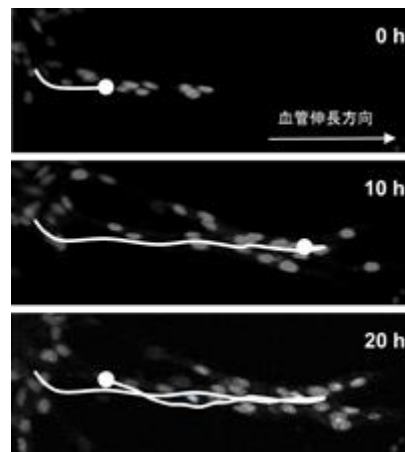
1. 研究開始当初の背景

血管新生とは既存の血管から新たに血管が伸長する現象である。従来、血管新生過程では、血管を構成する主要細胞である血管内皮細胞の中から先頭細胞が一旦選択されると、その表現型が変化することなく、後続細胞を先導して一様に運動しながら血管を形成すると考えられてきた。ところが、近年のイメージング技術の発展により、血管内皮細胞が時空間的に不均一な動態(セルミキシング)を示しながら、全体として血管樹状構造を形成することが明らかとなった。(L. Jakobsson, et al., Nat. Cell Biol. 2010)。

セルミキシング現象が発見されて以来、先端細胞の入れ替わりにおけるシグナル伝達など、特に局所的な細胞追い越し合いの分子メカニズムに注目した研究が報告されているが、新生血管全体の動態を捉えておらず、全体的な理解には及んでいない。また、血管新生におけるセルミキシングを確率的な運動として捉えた数理モデルが提案されているが、血管樹状構造内で複雑な動態を示す無数の細胞集団において1細胞毎の追跡は困難であり、セルミキシングの詳細すなわち本質的に不均一な動態であるのか或いは動態に規則性があるのかは実験的に明らかになっていない。

これを受けて、申請者らは血管新生における内皮細胞動態の詳細を明らかにするために、追い越しや逆戻りといった複雑な運動に対応できる細胞自動トラッキングシステムを新たに開発し、マウス大動脈組織片を用いた *in vitro* 血管新生モデル(大動脈リングアッセイ)での血管新生ライブイメージングを行った。その結果、内皮細胞が血管伸長方向に進行後、方向転換して新生血管部根元まで逆走する興味深い細胞往復運動(Uターン動態)を発見した(図1)。さらに、Uターン動態を示す割合が新生血管の根元から供給される細胞数(供給細胞数)および血管形状に依存することが示唆され、供給細胞が無い孤立した血管構造ではUターン動態が顕著に観察された。

これらのことから、セルミキシングは本質的に不均一ではなく、マクロスコピックな動態規則性を有すると考えられる。しかしながら、これまでに用いた大動脈リングアッセイは多種の血管細胞を含んだ生体に近いモデルであるため、内皮細胞特有の動態規則性を定量的に明らかにするに至っていない。また、Uターン動態のメカニズムは明らかになっていない。



(図1) 大動脈リングアッセイにおけるUターン動態

2. 研究の目的

本研究の目的は、不均一な動態を示す細胞集団が統合された機能体である血管を形成するメカニズムを明らかにすることである。具体的には、内皮細胞のみから構成される血管新生モデルを用いて血管構造全体での1細胞レベルでの細胞動態定量観察を行い、Uターン動態を含むセルミキシングのマクロスコピックな時空間的特性を見出す。また、供給細胞群の力学的相互作用に着目し、細胞動態特性をマクロスコピックな細胞集団の流れ場で表す数理モデルを構築する。さらに、細胞力覚応答の観点からUターン動態メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、培養内皮細胞のみから構成される *in vitro* 2次元血管新生モデルを確立し、内皮細胞動態解析を行う。また、供給細胞群の力学的相互作用や血管形状が個々の動態パターンに及ぼす影響を明らかにし、細胞動態特性をマクロスコピックな細胞集団の流れ場で表す数理モデルを構築する。さらに、細胞骨格や細胞外基質の変形を可視化することで、動態メカニズムを細胞の力覚応答の観点から明らかにする。

(1) 培養内皮細胞を用いた *in vitro* 血管新生モデルの確立

これまでに申請者が用いた大動脈リングアッセイは内皮細胞の他に多種の血管細胞を含んだモデルであるため、内皮細胞特有の動態規則性は定量的に明らかになっていない。そこで、本研究では、培養内皮細胞のみから構成される血管新生モデルを使用し、他の血管細胞からの動態への影響が無い内皮細胞固有の動態を観察する。マウス臍臓由来内皮細胞(MS-1)やヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)などの培養内皮細胞のみから構成され、定量観察しやすい2次元の血管新生モデルを確立する。

(2) 血管新生における内皮細胞固有の動態の観察

共焦点タイムラプス顕微鏡を用いて、作成した2次元血管新生モデルでの内皮細胞ライブイメージングを行う。次に、これまでに申請者らが開発した自動細胞トラッキングシステムを本モデルに応用し、細胞の位置を検出する。血管構造全体の細胞位置の巨視的な変化を追跡し、Uタ

ーン動態を含む内皮細胞固有の動態特性を定量的に明らかにする。

(3) Uターン動態の要因分析

これまでの大動脈リングアッセイでの結果から、Uターン動態の発現は細胞供給数や血管形状に依存することが示唆されている。そこで本研究では、各血管における細胞供給数および血管の太さなどを定量化し、動態パターン発現との関係を明らかにする。また、個々の細胞の速度や供給細胞群の力学的相互作用を定量化し、それらが個々の動態パターンに及ぼす影響を明らかにする。

(4) 数理モデル構築

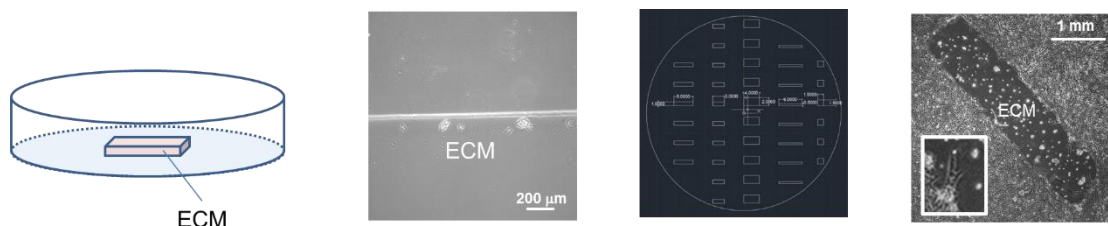
本研究で観測された細胞動態は供給細胞群の力学的相互作用の影響を受けると仮定し、血管内皮細胞群を流れのあるベクトル場としてとらえ、マクロスコピックな細胞動態特性を複雑系流体モデルで表すことを試みる。血管形状や細胞供給数など各パラメータを変化させた数理モデルでの計算結果と実験結果を比較し、細胞動態における本質的なパラメータの見極めなど血管新生における内皮細胞動態について統合的に考察する。

(5) 血管新生における細胞力覚応答の可視化

動態パターン発現が細胞供給数や血管形状に依存するというこれまでの実験結果から、本研究では、個々の細胞動態は、細胞集団や細胞外基質との力学的相互作用に影響を受けると仮定する。そこで、血管新生ライブイメージングにおいてアクチンなどの細胞骨格を可視化し、流れ場に対する細胞の力覚応答を調べる。また、蛍光ビーズを埋め込んだ細胞外基質の変位を観察し、細胞が細胞外基質に及ぼす力を可視化する。特に、血管先端部における方向転換時の細胞骨格の変化などUターン動態の力覚応答に着目し、Uターン動態のメカニズムを明らかにする。

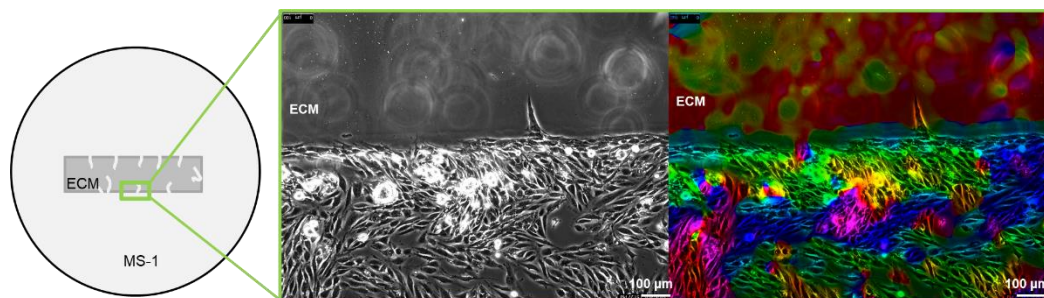
4. 研究成果

本研究では、細胞外基質 (Extracellular Matrix: ECM) 精密成形技術を用いて新生血管および細胞外基質外での内皮細胞動態を定量解析するための培養内皮細胞のみから構成される *in vitro* 血管新生モデルを確立した。具体的には、ジメチルポリシロキサン (PDMS) 微細加工技術を用いて ECM の型を作製し、培養ディッシュ上の 0.3 mm x 3.0 mm x 0.3 mm の直方体 ECM の形成に成功した。直方体 ECM の各辺は細胞レベルでフラットであることを確認した。これにより、ECM 外から内皮細胞が進入し血管構造を形成する過程を定量観察できる。また、血管伸長の ECM の凹凸による影響を除くことができる。本血管新生モデルでは内皮細胞として MS-1 を用いた。細胞培養条件検討および細胞外基質成型条件検討を行い、ECM 内に MS-1 が進入する際に血管様構造が再現良く形成されることを確認した (図 2)。



(図 2) ECM 精密成形を用いた 2次元血管新生モデル

この血管新生モデルを用いて血管新生における内皮細胞動態観察を行った。これまでに開発した自動セルトラッキングシステムを用いて内皮細胞の 1 細胞動態解析を行った結果、本モデルでも Uターン動態を含む不均一な内皮細胞動態が観測された。次に、本モデルにおいて細胞配向の解析を行った結果、ECM 外の内皮細胞供給源において細胞集団のマクロスコピックな流れが存在することが確認された。このことから、内皮細胞供給源には細胞流が引き起こす不均一な応力場が発生していると考えられる。さらに、血管伸長と ECM 外のマクロスコピックな細胞流が関係することが確認された (図 3)。



(図 3) 2次元血管新生モデルにおける血管新生と細胞配向

近年、血管新生におけるセルミキシングが発見され、特に先端細胞の入れ替わりのミクロスコピックな分子メカニズムが非常に注目されている。一方、本研究は、新たに開発したセルトラッキングシステムを用い、血管構造全体の細胞動態を定量的に明らかにし、セルミキシングのマクロスコピックな特性を明らかにするという特色がある。この観点から行ったこれまでの成果として、Uターン動態という新生血管先端から根元まで逆走する興味深い細胞往復運動を初めて発見した。また、本研究は、Uターン動態の発現が細胞供給や血管形状に依存することから、個々の動態パターンと細胞集団の力学的相互作用や血管形状とのマクロスコピックな関係に着目し、細胞の力覚応答という観点から動態メカニズムを明らかにするという特色がある。この観点から行った研究の成果として、血管伸長と ECM 外のマクロスコピックな細胞流が関係することが示唆された。

本研究により、血管新生メカニズムに関する理解が深まり、癌治療などの臨床研究へと発展することが期待される。また、血管内皮細胞動態の知見は、血管新生のみならず集団細胞動態の基礎的研究の観点から極めて意義が高いものである。

今後は、血管伸長と内皮細胞供給源における細胞流の定量観察結果を解析し、論文にまとめる。また、これまでに立ち上げた牽引力顕微鏡 (Traction Force Microscopy: TFM) システムを用いて本血管新生モデルでの ECM 外の細胞流が形成する応力場の計測を行う。さらに、TFM システムを拡張し、Uターン動態などを示す新生血管中の内皮細胞が ECM に及ぼす力も可視化する。これまでの実験では、新生血管の先端や分岐点など血管構造の端部で細胞流の特異点が観察されている。今後は特に血管構造の特異点での細胞流と ECM の力学的相互作用に着目し、血管樹状構造形成メカニズムを明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takubo Naoko, Yura Fumitaka, Naemura Kazuaki, Yoshida Ryo, Tokunaga Terumasa, Tokihiro Tetsuji, Kurihara Hiroki	4. 巻 9
2. 論文標題 Cohesive and anisotropic vascular endothelial cell motility driving angiogenic morphogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-45666-2	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田久保直子
2. 発表標題 血管新生における血管内皮細胞動態解析
3. 学会等名 光塾2020（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田久保直子, 苗村和明, 吉田亮, 徳永旭将, 栗原裕基
2. 発表標題 血管新生における血管内皮細胞の往復運動
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------