

令和元年6月3日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05125

研究課題名(和文) 生体イメージングによる血管新生の多様性と普遍性の解明

研究課題名(英文) Elucidation of diversity and universality in angiogenesis by in vivo imaging

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：成体において組織が虚血状態に陥った際に誘導される血管新生の多様性と普遍性を明らかにするため、ゼブラフィッシュ成魚皮膚の創傷治癒に伴う血管新生における内皮細胞とペリサイトの動態をライブイメージングにより解析した。それにより、創傷治癒過程の血管新生において、内皮細胞・ペリサイトが損傷部位に血管網を構築するプロセスの全貌を明らかにした。特に、血管新生誘導時にペリサイトが内皮細胞とともに増殖し、活性化した内皮細胞を被覆する現象を捉えた。これは、「ペリサイトが血管壁から剥離することで内皮細胞が出芽する」というこれまでの概念と矛盾しており、血管新生におけるペリサイトの新たな役割を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、創傷治癒に伴う血管新生において内皮細胞・ペリサイトが損傷部位に血管網を構築するプロセスの全貌を明らかにした。特に、血管新生におけるペリサイトの役割に関して、これまでの概念と矛盾する現象を捉え、血管新生におけるペリサイトの新たな役割を示した点で学術的な意義がある。また、癌や糖尿病網膜症では、病的な血管新生によってペリサイトの被覆が欠如した無秩序で機能的に未熟な血管が作られ病態を悪化させることから、病的血管新生が関わる疾患の病態解明、さらには治療法開発につながることを期待される。さらに、虚血性疾患などに対する効果的な血管再生療法の開発にも貢献できる。

研究成果の概要(英文)：To investigate how endothelial cells (ECs) and pericytes (PCs) establish blood vessels during ischemia-induced angiogenesis, we developed a live-imaging system to analyze cutaneous angiogenesis in adult zebrafish. Cutaneous injury immediately induced angiogenesis. Tortuous and disorganized vessel networks formed within a few weeks after the injury and subsequently normalized through vessel regression in a few months. Upon injury, severed vessels elongated and anastomosed with each other. Thereafter, repaired vessels and adjacent uninjured vessels became tortuous by increasing the number of ECs. In parallel, PCs divided and migrated to cover the tortuous blood vessels. ECs sprouted from the PC-covered tortuous vessels, suggesting that EC sprouting does not require PC detachment from the vessel wall. Thus, live imaging of cutaneous angiogenesis in adult zebrafish enables us to clarify how ECs and PCs develop new blood vessels during cutaneous angiogenesis.

研究分野：血管生物学

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

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

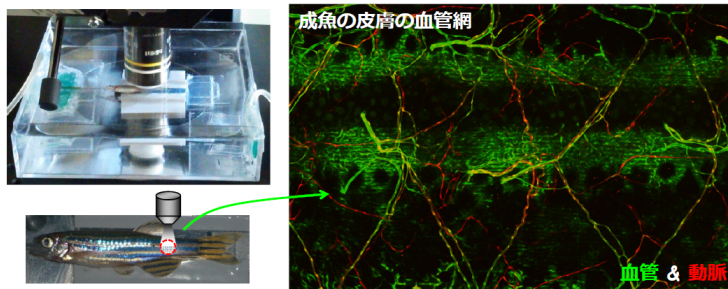
### 1. 研究開始当初の背景

組織が虚血状態に陥ると、それを解消するために血管新生が誘導され、虚血部位に新たな血管網を構築する。血管新生では、血管新生因子が血管壁からペリサイト（周皮細胞）を剥離し、内皮細胞の出芽・遊走・増殖を促進することで新生血管を形成する。その後、ペリサイトが新生血管を被覆することで、最終的に安定した機能的な血管が構築される。内皮細胞を被覆するペリサイトは血管を安定化する働きがあることから、血管新生の誘導には血管壁からのペリサイトの剥離が必要と考えられている。

血管新生は大きく分けて、生体にとって有益な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に分類される。生理的血管新生は、個体の発生や成長、創傷治癒、子宮内膜の発育や黄体形成、閉塞性動脈硬化症などの虚血性疾患において誘導され、生体恒常性維持に寄与している。一方、固形腫瘍や糖尿病網膜症などの眼の疾患、慢性関節リウマチなどの炎症性疾患では、病的血管新生が誘導され、これら疾患の病態を悪化させる。病的な血管新生では、ペリサイトの被覆を欠いた未熟で無秩序な血管が構築されることが知られている。このように血管新生は様々な生理機能や病態と関連しており、一言で血管新生といっても、その分子機序は多様であると考えられる。よって、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理解には、血管新生の分子機序の多様性と普遍性の解明が重要である。しかし、技術的な問題から、これまで生体における血管新生の分子機序を、“細胞・分子レベル”で解析することが困難であったため、その理解は進んでいないのが現状である。

我々はこれまでに、胚が透明なゼブラフィッシュの蛍光生体イメージングにより、生体内の細胞や分子の機能をライブで解析する“*in vivo*細胞生物学研究”を確立し、胎生期における血管形成の分子機序を明らかにした。また、世界に先駆けてペリサイトの動態を生きた個体で観察できるゼブラフィッシュを樹立し、ペリサイトが血管を被覆するメカニズムの一端を明らかにしてきた。さらに、最近これまで困難であった成魚を長時間ライブイメージングする技術を確認し、皮膚の創傷治癒に伴う血管新生を生きた個体で観察できるようにした（図1）。

図1 成魚を長時間ライブイメージングする技術の開発



### 2. 研究の目的

本研究では、成体において組織が虚血状態に陥った際に誘導される血管新生の多様性と普遍性を明らかにするため、創傷治癒に伴う血管新生の制御機構を成魚の長時間ライブイメージング技術を用いて解明する。特に、血管新生において血管ネットワークが構築されるとき、内皮細胞・ペリサイトの動態を細胞生物学的（遊走、増殖、アポトーシスなど）および形態学的（既存血管からの発芽、損傷血管の切断部位の伸長、動脈と静脈の関与など）な視点から解析し、上記疑問を明らかにする。

### 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 (*Tg(kdr1:GFP)*、*Tg(flt1<sup>enh</sup>:mCherry)*、*Tg(fli1a:mCherry)*)、ペリサイト (*Tg(pdgfrb:mCherry)*)、赤血球 (*Tg(gata1:DsRed)*) で蛍光蛋白質を発現するゼブラフィッシュを使用した。

#### (2) 成魚皮膚の創傷治癒に伴う血管新生のライブイメージング解析（図1）

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、その後の創傷治癒過程の血管新生における内皮細胞及びペリサイトの動態をライブで観察した。取得したイメージングデータは、Volocity 3D Imaging analysis software (PerkinElmer) で解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) ゼブラフィッシュ成魚の正常皮膚組織における血管網の観察

ゼブラフィッシュ成魚の皮膚は鱗で覆われているが、その内側の真皮層に血管網が存在した。基本的には、一枚の鱗の下の真皮層に、細動脈1本と細静脈1-2本が筋肉層から侵入していること、また、筋肉層から侵入した細動脈は、毛細血管を介して隣の鱗の細静脈へと繋がりネットワークを構築していることが分かった。また、これら血管以外に赤血球が流れない脈管系が存在することを示した（図1）。

創傷治癒に伴う血管新生の制御機構を理解するため、まず、正常皮膚組織の血管を構成する

内皮細胞とペリサイトを観察した。正常皮膚組織の毛細血管における内皮細胞に対するペリサイトの存在比率は、 $0.61 \pm 0.13$  であり、一つのペリサイトがおおよそ2個の内皮細胞を被覆していた。また、正常皮膚組織の内皮細胞とペリサイトは、数ヶ月に渡って全く場所を変えず、休止状態にあり、それにより安定な血管構造を維持していることが示唆された。

(2) ゼブラフィッシュ成魚の皮膚創傷治癒に伴う血管新生のライブイメージング解析  
組織傷害によって誘導される血管新生を観察するため、ゼブラフィッシュ成魚の皮膚に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10日間に渡ってライブイメージングした。その結果、組織傷害によって内皮細胞は迅速に活性化し、血管新生が誘導されることが分かった。また、創傷時血管新生では、非損傷血管からの血管の出芽に加え、損傷血管の活発な伸長が観察された。そこで、創傷治癒における血管新生をさらに詳細に検討するため、同様に成魚皮膚に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6ヶ月間経時的に観察した。その結果、損傷後2日目(2 dpi)から損傷血管の伸長と非損傷血管からの出芽が誘導された。4 dpiには、血管の出芽・分岐・吻合が活発に起こり、多くの血管で蛇行が認められ、6 dpiには、無秩序な高密度の血管網が形成された。また、全出芽の約76%は、静脈血管から起こり、主に動脈血管に吻合していた。その後、一部の血管が退縮することで正常化し、損傷1~2ヶ月後には損傷前と同様な血管網が構築された。

主要な血管新生因子である血管内皮増殖因子(VEGF)が、創傷時血管新生を制御しているか知るため、VEGF受容体阻害剤(Ki8751)の効果を検討した。傷害を加える前の成魚をKi8751で処理しても、血管構造は全く変化しなかったことから、正常皮膚血管の維持にはVEGFシグナルは必要ないことが分かった。しかし、Ki8751存在下で成魚の皮膚に傷害を加えても、血管新生は全く誘導されなかったが、処理後7日目に阻害剤を除去すると血管新生が起こった。以上の結果から、VEGFシグナルが成魚皮膚の創傷時血管新生を誘導していることが示された。

### (3) 創傷治癒過程の血管新生における内皮細胞とペリサイトの動態解析

創傷時血管新生において、内皮細胞及びペリサイトが新生血管を構築するプロセスを理解するため、真皮層毛細血管を1本切断し、その修復過程を経時的に観察した。2~3 dpiで血管が吻合し、損傷前とほぼ同数の内皮細胞が修復血管を構築していたが、その後も内皮細胞は増殖を続け、7 dpiには損傷前の約1.8倍まで数を増加させ、血管を蛇行させた。その後、数ヶ月に渡って内皮細胞が徐々に消失し、血管が正常化した。また、血管新生の誘導によって、ペリサイトは内皮細胞と同様な時間経過で数を増加させ、蛇行血管の内皮細胞を被覆したが、血管の正常化に伴って数を減少させた(図2)。

「創傷時血管新生において、ペリサイトが内皮細胞とともに数を増加させ、蛇行血管を被覆する」という現象は、「血管新生が誘導されると、血管新生因子がペリサイトを血管壁から剥離し、内皮細胞の出芽・遊走・増殖を促す」というこれまでの概念と矛盾する(図2)。そこで、血管壁からのペリサイトの剥離が内皮細胞の出芽に必要であるか知るために、内皮細胞の出芽部位と近傍のペリサイトの位置関係を解析した。その結果、内皮細胞はペリサイトの位置に無関係に出芽しており、内皮細胞の出芽にペリサイトの剥離が必ずしも必要ないことが示唆された。

(4) 創傷治癒過程の血管新生においてペリサイトが蛇行及び新生血管を被覆する機序の解析  
創傷時血管新生の誘導によって、ペリサイトが数を増加させ、新生血管及び蛇行血管を被覆するメカニズムを知るため、損傷後の血管新生におけるペリサイトの動態を3時間毎に観察した。

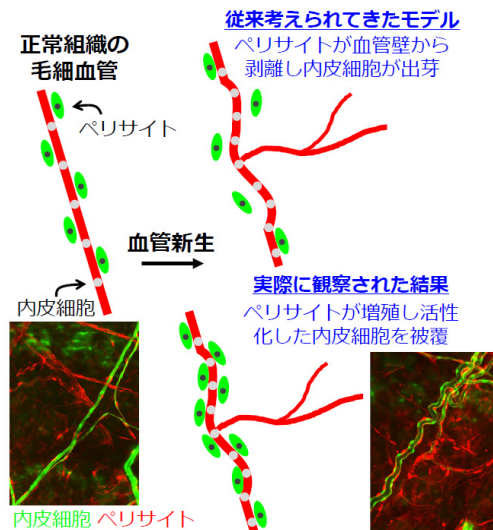
その結果、蛇行血管を被覆するペリサイトが分裂する様子を観察した。また、出芽した血管の幹に存在するペリサイトが、伸長する出芽血管へと移動し、その途中で細胞分裂する様子も捉えた。これら結果から、ペリサイトは細胞分裂によって数を増加させ、さらに遊走することで新生血管及び蛇行血管を被覆することが分かった。

### (5) まとめと考察

以上の結果から、正常皮膚血管の内皮細胞、ペリサイトは休止状態にあり、安定した血管構造を維持するが、創傷によってこれら細胞は迅速に活性化し血管新生を誘導すること、また、損傷後一週間程度で、密度が高く無秩序な血管網が構築されるが、その後、過剰な血管が徐々に退縮し、数ヶ月かけて血管が正常化することが示された。

さらに、血管新生では、ペリサイトが血管壁から剥離することで内皮細胞が出芽すると考えら

図2 創傷時血管新生におけるペリサイトの動態





れてきたが、逆にペリサイトは血管新生の誘導によって増殖し、蛇行血管を被覆することが示された。

癌や糖尿病網膜症では、ペリサイトの被覆が欠如した無秩序で機能的に未熟な血管が作られ病態を悪化させる。そのため、創傷治癒などで起こる生理的血管新生では、ペリサイトが増殖し血管を被覆することで過剰な出芽を抑え、機能的な血管網を構築するが、病的血管新生では何らかの原因でペリサイトの被覆が起こらず、それによって過剰な出芽が起こり、機能的に未熟な血管網が形成されると考えられる。従って、本研究は、病的血管新生に関わる疾患の病態解明、さらには治療法開発に繋がる成果である。

## 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。