

令和 2 年 11 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19510

研究課題名（和文）非血管細胞から血管構造をつくる

研究課題名（英文）Creation of vascular structures from non-vascular cells

研究代表者

栗原 裕基（Kurihara, Hiroki）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・教授

研究者番号：20221947

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、血管新生能を担っている内皮細胞特有の分子システムを見出して内皮細胞以外の細胞において再構築し、血管構造を実際に作らせることを目標とした。その結果、血管内皮細胞では他の非血管系細胞と異なる特有の動態を示し、その一部にVE-カドヘリンが関与することが明らかになった。さらに、血管新生過程での単一細胞レベルのRNA-seqにより、KLF転写因子が内皮細胞特有の動態発現制御に関与することを見出した。しかし、現時点でVE-カドヘリン、KLF転写因子のみの導入では非内皮細胞に血管構造形成能を賦与するには至らず、現在VE-カドヘリン非依存性運動の制御分子など、第3の因子を探索中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管新生能を担っている内皮細胞の運動特性を明らかにし、これらに関与する分子機能を非血管内皮細胞において再構築することで血管構造を実際に作らせることが出来れば、血管新生についてはより普遍的な樹状パターン形成機構の理解が飛躍的に進歩すると考えられる。さらに、非血管細胞のアイデンティティを保持したままで血管構造を作ったり、生体内の血管内膜に組み込むことができれば、血液循環系に直結した臓器機能の再建（特に、内分泌代謝系臓器）にも可能性を開くなど、将来的には細胞移植による再生治療の新しい技術開発にもつながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to discover the molecular system unique to endothelial cells that are responsible for angiogenic ability and to reconstruct them in non-endothelial cells to test whether they can create the vascular structure. Vascular endothelial cells show unique dynamics different from non-vascular cells, in a part of which VE-cadherin is involved. Furthermore, single-cell RNA-seq revealed the involvement of a KLF transcription factor in governing the manifestation of behaviors unique to endothelial cells. However, at present, introduction of VE-cadherin and KLF transcription factor alone is not enough to confer the ability of vessel-like structure formation on non-endothelial cells. We are currently searching for the third factor(s) critical for the formation of the vascular branching structure.

研究分野：発生学

キーワード：血管新生 血管内皮細胞 形態形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管新生は血管内皮細胞によって血管の管腔構造が樹枝状に構築されるプロセスであり、胚発生から組織の修復過程、腫瘍の増殖に至るまで生体内で広く営まれている。これまで、血管新生における樹枝状構造の伸長は、先端に位置する先端細胞 (tip cell) が血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial cell growth factor; VEGF) に反応して糸状仮足を伸ばしながら先端を導き、後方につながる茎細胞 (stalk cell) がこれに続くという図式によって説明されていた。しかし、我々を含めた2つの研究グループにより、血管の伸長における細胞の位置関係や役割は固定的なものではなく、細胞は追い越し合い、混ざり合いながら先端細胞が常に入れ替わり、極めて複雑で多様な動態を示すことが明らかになった (Arima S et al. *Development* 138:4763, 2011; Jakobsson et al. *Nat Cell Biol* 12:943, 2010)。細胞集団がこうした一見極めてランダムな動態を示しながら、全体として樹状構造が形成されていくロジックを明らかにするために、我々はこれまでマウス大動脈の組織片培養による *in vitro* 血管新生モデルにおいて、内皮細胞選択的な蛍光標識による細胞動態のライブイメージングを行い、その時空間情報のコンピューター解析によって血管新生の過程を速度や同調性等の要素にモジュール化して解析し、それに基づいて数理モデルを構築して検討を重ねてきた。その結果、細胞の追い越し現象による血管伸長には個々の細胞の確率論的な速度変化に加えて先端細胞とその後続細胞との間の相互作用が重要であることを数理モデルと検証実験によって明らかにするとともに (Sugihara K et al. *Cell Rep.* 13:1814, 2015)、細胞間相互作用を引力と斥力に模して抽象化したセルオートマトンモデルと微分方程式による決定論的連続変数モデルによって、二次元平面上で伸長血管様の樹状構造を再現した (間田潤ほか、日本応用数理学会論文誌 26:105, 2016; Matsuya K et al. *SIAM J. Appl. Math.* 76:2243, 2016)。さらに研究過程で、本研究に直接つながる以下の結果を得た。

- 1) 細胞動態解析で内皮細胞に特徴的で血管新生の素過程につながると思われる性質 (細胞接着による方向性運動の亢進) が明らかになり、その効果が VEGF や Rho キナーゼ、VE-カドヘリンなどのシグナルによって制御されることを見出した。
- 2) 内皮細胞株を用いて *in vitro* の発芽様血管新生モデルを確立し、大動脈の組織片培養による実験モデルと同様の集団運動パターンによって樹状構造を形成することを明らかにした。
- 3) 2) のモデルにおける遺伝子発現プロファイルを単一細胞レベルの RNA-seq により解析し、通常培養条件との比較から血管新生過程で変動すると思われる遺伝子群を同定した。

これらの結果から、内皮細胞における細胞接着依存性の血管新生素過程には、VE-カドヘリンを介する細胞接着と Rho キナーゼあるいは Rho ファミリー低分子量 G タンパク質制御を介したアクチンフィラメントの内皮細胞特異的な動態制御が重要であることが考えられた。もしこの制御系をモジュールとして他種細胞にそのアイデンティティを保持したままで再構築することができれば、VE-カドヘリンを介するホモフィリックな細胞接着を含めてその細胞に血管新生能を賦与することができる可能性があると考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

血管の樹枝状管腔構造を作る能力は血管内皮細胞 (もしくはリンパ管内皮細胞) 特有の性質である。実際、個体発生過程をはじめ炎症や組織再生、腫瘍形成などにみられる血管新生は、血管内皮細胞の増殖と遊走によるホモフィリックな自己組織化過程であり、血管の内面を覆っている内膜を構成するのは血管内皮細胞に限られている。その形成過程は、同じ管腔構造を特徴とする気管支肺泡や分泌腺などと大きく異なり、細胞が追い越し合ったり行きつ戻りつしながら複雑で多様な集団運動によって営まれていることが、最近の我々の研究などで明らかになってきた。本研究では、こうした内皮細胞において血管新生能を担っている分子システムを内皮細胞以外の細胞において再構築し、その細胞本来の性質を維持しながら血管構造を実際に作らせることに挑戦する。これにより、内皮細胞がもっている血管新生の設計図そのものを明らかにするとともに、その設計通りに血管構造を作ることのできる細胞内外の環境条件を解明することを目指す。

3. 研究の方法

細胞培養

培養血管内皮細胞として、主にマウス臍島由来微小血管内皮細胞株 MS-1 を使い、適宜ヒト臍帯静脈内皮細胞株 HUVEC やウシ大動脈由来内皮細胞なども併用した。非内皮細胞として、マウス胎仔由来線維芽細胞株 NIH3T3、イヌ腎臓尿管上皮細胞由来細胞株 MDCK などを用いた。1細胞あるいは細胞分裂後の2細胞状態での動態を共焦点レーザー走査型顕微鏡でタイムラプスイメージングを行って種々のパラメータを計測評価した。また、血管新生の発芽伸長モデルとして、培養皿に滴状に配置したマトリゲル内への集団的細胞遊走における動態を評価した。

遺伝子変異導入

遺伝子の欠失変異は CRISPR-Cas9 によるゲノム編集により、遺伝子の強制発現はプラスミドベクターにより導入し、遺伝子機能を解析した。分子動態のイメージングには EGFP 融合タンパクの発現や LifeAct によるアクチン線維の可視化を行った。

単一細胞のトランスクリプトーム解析

通常平板培養とマトリゲル内血管新生モデル形成過程の MS-1 細胞を単離し、Fluidigm 社 C1 システムによって逆転写と増幅を行い、PCR または HiSeq-2000 による RNA-seq によって遺伝子発現プロファイルを取得した。

4. 研究成果

(1) 内皮細胞動態の特性抽出と分子機構の解析

一般に、細胞は接触によって運動(遊走)が抑制されるか接触を回避して反対側に離れていくことが知られている(contact inhibition of locomotion)。しかし、上記の実験に見られる細胞の動きは、こうした一般的な細胞運動の性質とは異なるように見える。即ち、血管内皮細胞には固有の細胞運動の性質が備わっていて、それによって樹状形態の形成が可能となっていることが予想される。こうした内皮細胞固有の特徴を抽出するため、マウス臍島由来微小血管内皮細胞株 MS-1 細胞を用いて、細胞分裂前の 1 細胞状態と分裂後の 2 細胞状態で細胞動態を比較した。その結果、内皮細胞では 1 細胞状態よりも 2 細胞状態の方が接触を保ちながら運動が亢進すること、2 つの細胞が軸方向を揃えながら協調的に運動すること、方向性を持った並進的な運動に加え、特徴的な回転運動も行うことが明らかになった。これらの動態はヒト臍帯静脈内皮細胞株 HUVEC やウシ大動脈由来内皮細胞などでも認められたが、マトリゲル内での樹枝状の発芽伸長は MS-1 細胞において顕著であった。これに対し、間葉系細胞の NIH3T3 では細胞分裂後の解離現象が、上皮系細胞の MDCK では細胞接触に伴う運動性抑制が認められ、contact inhibition of locomotion に合致する所見を示し、マトリゲル内での樹枝状の発芽伸長を示さなかった。以上から、接触を保ちながら運動性が亢進し、方向性をもった運動を維持する性質は、内皮細胞に特徴的であると考えられた。

これらの内皮細胞固有の特徴の分子メカニズムを明らかにするため、内皮細胞間の接着に中心的役割を果たす VE-カドヘリンに注目し、ゲノム編集により VE-カドヘリン欠損 MS-1 細胞を作成してその動態を解析した。VE-カドヘリン欠損 MS-1 細胞ではアクチン線維の配列の変化とともに細胞分裂後の 2 細胞における方向性を持った協調的な並進運動が著明に低下し回転運動が顕著となった。また、マトリゲル内での発芽伸長も抑制された。次に、VE-カドヘリン欠損 MS-1 細胞に EGFP を結合した VE-カドヘリンを導入して動態を観察したところ、回転する細胞では接着部位の糸状仮足様構造に一致して局在し、偏側性にエンドサイトーシスによる細胞内への取り込みが認められた。高発現細胞では細胞間の接着面に連続的な局在パターンを取り、回転運動が抑制されて並進運動が主となった。この結果と野生型 MS-1 細胞における VE-カドヘリンの局在パターンから、内皮細胞では回転運動とエンドサイトーシスによる VE-カドヘリンの取り込みが連動し、これによる接着機能の低下が運動速度の増加をもたらし、VE-カドヘリンの局在パターンの変化と運動パターンが連動して内皮特有の動態を形成している可能性が示唆された。

これらの結果から、内皮細胞固有の動態のうち、方向性を持った協調的な並進運動は VE-カドヘリンに依存する一方、接触による速度亢進や回転運動は VE-カドヘリン非依存性であることが明らかになった。マトリゲルを用いた実験から、VE-カドヘリン依存性の並進運動は、血管新生における効率的な発芽伸長に重要であると考えられた。

(2) 血管新生で発現変動する遺伝子の抽出と機能解析

血管新生過程で変動する遺伝子群とそのネットワークを解明するため、通常平板培養とマトリゲル内血管新生モデル形成過程の MS-1 細胞を単離し、C-1(Fluidigm 社)によって逆転写と増幅を行った後、PCR または RNA-seq により遺伝子発現プロファイルを解析した。血管新生過程を制御する遺伝子ネットワークを明らかにするため、単一細胞の RNA-seq で明らかになった遺伝子プロファイルから MONOCLE を用いて発芽形成細胞の配置から偽時系列を推定した後、この偽時系列上で KLF 遺伝子や先端細胞(tip cell)マーカー遺伝子などの発現変動を解析した。その結果、先端細胞様の発現プロファイルをとる細胞群を 1 つの極として、発芽形成細胞における遺伝子変動の仮想推移が示唆された。

本解析から、発芽伸長で発現誘導される遺伝子として、転写因子 KLF4 が見出された。KLF4 の内皮細胞動態における機能を明らかにするため、遺伝子欠損 MS-1 細胞を作成した。KLF4 単独欠損では表現型に顕著な変化は見られなかった。しかし、関連遺伝子の中でその欠損により内皮固有の運動性に影響を及ぼすものが同定され、これらの実験結果とクロマチン構造変化の解析から、KLF 2 との協調作用が転写ネットワークの制御が接着分子をはじめとする遺伝子発現変化を介して、血管新生過程における細胞動態の多様性を生み出している可能性が考えられた。

(3) 非内皮細胞による血管構造構築の試み

NIH3T3 細胞への遺伝子導入により、内皮細胞様の細胞動態やマトリゲル内での発芽伸長の可能性を探索した。現在のところ、VE-カドヘリン、KLF4 のみの導入では非内皮細胞に血管構造形成能を賦与するには至らず、現在 VE-カドヘリン非依存性運動の制御分子など、第 3 の因子を探索中である。特に、内皮細胞固有の運動特性のうち、VE-カドヘリン非依存性の要素の責任遺伝子が同定されれば、有力な候補となり得ると考え、現在 VE-カドヘリン遺伝子欠損変異株による検討を進めている。これと単一細胞レベルの RNA-seq を進めることにより、「内皮細胞ら

しさ」を賦与する遺伝子カスケードを明らかにすることを第一の目標にする。VE-カドヘリンの役割に関しては、マトリゲルを基質とした細胞移植などにより MS-1 細胞の血管新生能を確認した後、VE-カドヘリン欠損内皮細胞と変異型を含めた VE-カドヘリン再導入細胞を用いて、培養下での細胞動態が *in vivo* における血管新生能を反映するか否かを検討する。さらに、非血管細胞に VE-カドヘリンとともに他の候補遺伝子を導入することによって血管内皮細胞と同様の細胞動態が再現されたものについて同様の移植実験を行い、新生血管に取り込まれるかどうかを検討する。同様の実験を、腫瘍血管促進能をもつ腫瘍細胞との同時移植によっても試み、腫瘍組織内における血管構造形成への関与についても併せて検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Maruyama K, Miyagawa-Tomita S, Mizukami K, Matsuzaki F, Kurihara H. Isl1-expressing non-venous cell lineage contributes to cardiac lymphatic vessel development. *Dev. Biol.* 452(2):134-143, 2019.

Takubo N, Yura F, Naemura K, Yoshida R, Tokunaga T, Tokihiro T, Kurihara H. Cohesive and anisotropic vascular endothelial cell motility driving angiogenic morphogenesis. *Sci. Rep.* 29(1):9304, 2019.

〔学会発表〕(計 9 件)

礪波一夫、金井政宏、牛島俊征、須賀原啓、内島泰信、栗原裕基、血管新生を可能にする内皮細胞の協調動態とその分子基盤の解析、第 26 回日本血管生物医学会学術集会(東京、2018/12/7)(ポスター)

礪波一夫、金井政宏、牛島俊征、須賀原啓、内島泰信、栗原裕基、血管新生の素過程としての内皮細胞動態とその分子基盤の解析、第 41 回日本分子生物学会年会(横浜、2018/11/28)(口頭)

栗原裕基、血管系構築を可能にする細胞動態と遺伝子転写制御の連携機構、第 91 回日本生化学会大会(京都、2018/9/25)(口頭)

栗原裕基、血管構造を作り出す細胞動態のロジック、第 28 回日本病態生理学会(横浜、2018/8/4)(口頭)

礪波一夫、金井政宏、牛島俊征、内島泰信、栗原裕基、Analysis of single endothelial cell behaviors as a fundamental process of sprouting angiogenesis、Weinstein Cardiovascular Development and Regulation Conference 2018(奈良、2018/5/16~18)(ポスター)

礪波一夫、金井政宏、牛島俊征、内島泰信、栗原裕基、血管新生の素過程としての単一内皮細胞動態の解析、第 40 回日本分子生物学会年会(神戸、2017/12/9)(口頭)

牛島俊征、礪波一夫、内島泰信、栗原裕基、血管新生における内皮細胞の協調運動を担う VE - カドヘリンとアクチンファイバーの相互調節機構、第 40 回日本分子生物学会年会(神戸、2017/12/9)(口頭)

礪波一夫、金井政宏、牛島俊征、内島泰信、栗原裕基、血管新生を特徴づける内皮細胞の運動様式の同定とその分子機構の解明、第 25 回日本血管生物医学会学術集会(大阪、2017/12/8)(口頭)

内島泰信、戸澤英人、礪波一夫、栗原由紀子、田久保直子、苗村和明、田口明糸、椎名香織、小林美佳、山本尚吾、仲木竜、興相貴英、和田洋一郎、油谷浩幸、栗原裕基、単一細胞遺伝子発現分析を用いた血管新生調節機構の解析、第 40 回日本分子生物学会年会(神戸、2017/12/7)(ポスター)

〔その他〕

ホームページ等

<http://bio.m.u-tokyo.ac.jp/home-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：和田洋一郎

ローマ字氏名：(WADA, Youichiro)

研究協力者氏名：内島泰信

ローマ字氏名：(UCHIJIMA, Yasunobu)

研究協力者氏名：礪波一夫

ローマ字氏名：(TONAMI, Kazuo)

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。