

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：17601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20744

研究課題名（和文）微小血管網異常による組織機能の破綻を理解するマウスモデル解析系の開発

研究課題名（英文）Development of a mouse model analysis system to understand the breakdown of tissue function due to microvascular network abnormalities

研究代表者

小河 穂波（Ogoh, Honami）

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：30813290

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：生活習慣病誘導マウスを用いて血管密度の変化、血管内皮細胞-ペリサイト連関が組織に与える影響を蛍光免疫染色法、EVG染色法、血管マイクロスコプを用いて行った。生活習慣病誘導マウスでは体重と血圧の顕著な上昇、腎臓の優位な肥大を確認しており、耳介皮膚では毛細血管密度の優位な低下が見られた。また、ペリサイトには血管壁に密着するような扁平な形状のものと、複数の血管を跨いで細胞質を伸ばす比較的立体的な形状のものが存在することが分かった。毛細血管の非連続部位には、後者のペリサイトが多い事を示唆するデータを得ている。加えて血管構築機序の破綻を誘発するColl4 a1/a2-floxマウスを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織やペリサイトとの関係性を加味した毛細血管網の機能評価法は確立されていない。毛細血管網は全身の臓器に限らず張り巡らされており、皮膚の毛細血管は心・腎といった観察が難しく、機能低下が死に直結しやすい臓器の毛細血管網の状態を反映している可能性が高い。皮膚と他臓器間における毛細血管網異常の相関性が見つかれば、将来的に非侵襲的な皮膚での毛細血管網評価によって危険性が高い他の臓器の疾患予備軍を早期発見できる技術に繋がる可能性がある。安価で安全で簡易的な検査方法の開発は世界的規模で切望されており、本研究の成果は学術的にも診断・治療法の開発にも資する基盤を提供する。

研究成果の概要（英文）：Using lifestyle-related disease-induced mice, we investigated changes in vascular density and the effects of vascular endothelial cell-pericyte interactions on tissues using fluorescent immunostaining, EVG staining, and vascular microscopy. In lifestyle-related disease-induced mice, we confirmed a significant increase in body weight and blood pressure, and predominant hypertrophy of the kidneys, and a predominant decrease in capillary density was observed in the ear skin. We also found that there are pericytes with a flat shape that adheres closely to the vascular wall, and those with a relatively three-dimensional shape that stretches the cytoplasm across multiple blood vessels. We obtained data suggesting that the latter type of pericyte is more prevalent in discontinuous areas of capillaries. In addition, we generated Coll4 a1/a2-floxed mice that induce a breakdown of the vascular construction mechanism.

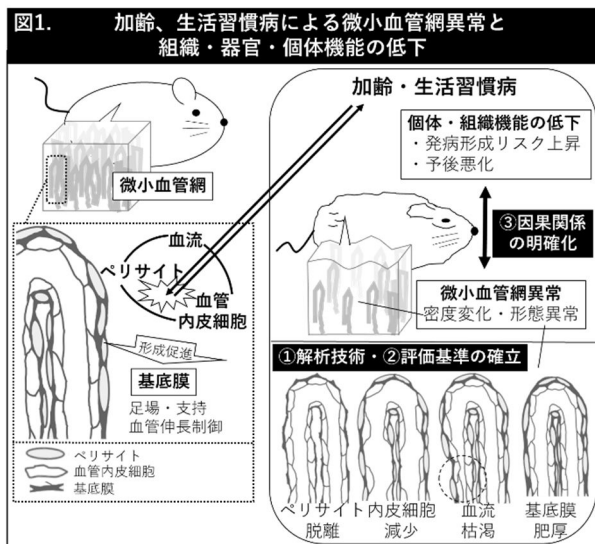
研究分野：血管動態生化学、血管発生学、老化

キーワード：毛細血管 ペリサイト 老化 加齢 生活習慣病 皮膚 マウス Col4

1. 研究開始当初の背景

「人は血管とともに老いる」アメリカの医学者オスラーの言葉である。血管の老化が人の健康寿命や健康状態を決めると述べている。加齢や高血圧、糖尿病などの生活習慣病による動脈硬化から、脳・心血管障害などが生じ、個体レベルの機能低下をきたすことを指す。動脈硬化は、比較的大きな血管に生じ、血管内皮細胞の機能低下に起因する。内皮細胞は、毛細血管レベルの微小血管においても、構造的、機能的に重要な役割を果たす。微小血管は、体中に張り巡らされ、組織のガス交換、栄養運搬、老廃物除去など血管機能の中核の担い手である。しかし、加齢や生活習慣病による内皮機能の低下が微小血管網の異常をきたし、組織そして個体レベルの機能低下に繋がるのか、その因果関係は不明であった(図1)。微小血管網機能の異常が、褥瘡や心不全といった病態形成に関与している可能性が指摘されており、加齢した皮膚では、血管密度の低下や血管形態異常など、形態学的な微小血管網の変容が報告されている(Microvasc Res 100:25, 2015)。さらに、脳、心、筋肉など皮膚以外の組織において、同様な微小血管網形態異常が、加齢や生活習慣病により観察される(Endocr Rev 42(1):29, 2021)。これらの事実は、微小血管機能異常と病態形成の関係性を支持する。しかし、血管形態異常は、効率よく血液を流すという血管機能の異常に繋がっているのか、組織機能低下に関与するかなど、その関係性を裏付ける科学的根拠に未だ乏しい。その理由として、微小血管網の性状を定量的に十分評価しうる解析系、そして、微小血管網の機能異常と組織機能低下の因果関係を明らかにする解析系がないことが挙げられた。

微小血管網は、血管内皮細胞がそれを囲むペリサイトと相互作用し、また、血流による刺激を受けつくり、維持される。一方、生理的範囲内で血管網が傷害されても、血管新生によって修復されることで、微小血管網機能の恒常性は動的に維持されている。申請者の研究室では、この血管修復の際に新しく血管を増生する血管新生が、血流に伴う血流圧により抑制されることを見出した(Nat Commun 2022, 13(1):2594)。また、ペリサイトは、内皮細胞との相互作用にて血管基底膜形成を促進し、血流圧による血管新生抑制をさらに抑制的に制御していることが分かった(Nat Comm, in revision)。一方、糖尿病による網膜血管障害等、ペリサイト機能異常の病態への関与が示唆されている(Dev Cell 21:193, 2011)。以上から、加齢や生活習慣病により、内皮-ペリサイト相互作用による血管新生制御が異常を来し、微小血管網の破綻と組織機能低下に至るしくみが推測されていた(図1)。



2. 研究の目的

本研究は以降に挙げる4つの項目を目的として行った。(1) マウス組織を用いて、3次元微小血管網の構造的と機能性を統合的に定量評価する解析方法の確立。(2) 生活習慣病マウスモデルにおける全身的な微小血管網異常の有無。(4) 生活習慣病マウスモデルを用いて微小血管網異常と組織・器官機能異常の関係性を明らかにする解析系の確立。(5) 血管基底膜形成を標的として微小血管網異常を誘導するモデルマウス系を確立

3. 研究の方法

(1) 3次元微小血管網構造の定量評価系の確立：成獣マウスの耳介皮膚、心筋ブロックを用いホルムン免疫染色する(内皮:CD31等、ペリサイト:PDGFR等、血管基底膜:Coll4等)。心筋組織では、透明化する試薬(Scale等)・条件を最適化する。可視化画像から、血管網構造、ペリサイト被覆率、基底膜性状等、血管網の性状を定量する。

(2) 生活習慣病マウスモデルにおける微小血管網異常の全身性の評価：生活習慣病誘導、非誘導マウスの皮膚と心筋組織にて微小血管網の変化を定量比較する。生活習慣病は、心機能が保たれた心不全モデル作製法として確立された高脂肪食負荷＋一酸化窒素酵素抑制負荷で誘導する(Nature 568:351,2019)。

(3) 微小血管網と組織・器官機能異常の連関性を評価可能な解析系の確立：生活習慣病による皮膚と心筋組織の微小血管網変化と組織虚血、組織・器官構造、機能との相関性を統計解析する。皮膚では、弾性繊維などの結合組織、基底膜および毛根構造、表皮・毛根幹細胞数、性状等、心筋では、心筋形態、繊維化状態、心機能、心不全発症・予後等を組織、生理学的に評価する。

(4) 血管基底膜形成を標的として微小血管網異常を誘導するモデルマウス Coll4 a1/a2 遺伝子改

変マウスの樹立：本研究室の研究の結果、ペリサイトとの相互作用による内皮細胞の Coll4 a1 および a2 発現が血管基底膜形成に重要とわかった。Coll4 a1/a2 の Flox マウスを樹立し、Cdh5-CreERT2 マウスとの交配にて、血管内皮、時期特異的 Coll4 a1/a2 ダブルノックアウト(DKO) マウスを得る。通常の Coll4 a1/a2 DKO は、胎性致死となる (Development 131:1619, 2003)。タモキシフェン投与にて DKO を誘導し、組織評価にて微小血管網異常誘導の最適時期を探る。その後、微小血管網異常の誘導が、加齢や生活習慣病による組織・器官機能の低下を来すか、悪化させるか、因果関係を追究する。

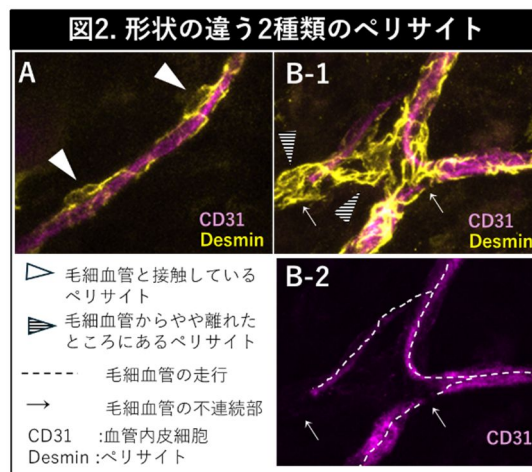
4. 研究成果

(1) 生活習慣病は、心機能が保たれた心不全モデル作製法として確立された高脂肪食負荷 + 一酸化窒素酵素抑制負荷 (Nature 568:351, 2019) で誘導を行い、体重と血圧の顕著な上昇、腎臓の優位な肥大が生じることを確認した。一方で、先の論文で報告されているような HFpEF の発症は見られなかった。微小血管網異常が臓器機能性に与える影響の評価系として、心臓以外の最適な臓器・組織の検討を進めている。

(2) マウス耳介皮膚を用いて血管内皮 (CD31)、ペリサイト (Desmin)、血管平滑筋 (SMA) に対する蛍光免疫染色を行い、SMA - CD31+血管に対して血管網密度、およびペリサイトの形状と存在比を ImageJ によって解析する実験系を立ち上げた。生活習慣病誘導マウスの耳介皮膚では毛細血管密度が統計学的に優位に低下していた。また、ペリサイトには血管壁に密着するように扁平な形状のものと、複数の血管を跨いで細胞質を伸ばす比較的立体的な形状のものが存在することが分かった (図 2.A, B-1)。

さらに、CD31 による免疫染色法により、毛細血管が不連続な場所 (図 2.B-2) が存在すること、および、立体的な形状のペリサイト (図 2.B-1) は毛細血管の分岐部や非連続な場所に多い傾向があることを示唆するデータを得ている。

(3) Cre 遺伝子の発現誘導により時期組織特異的に Coll4a1 および a2 を欠損させることで血管構築機序の破綻を誘発可能な Coll4 a1/a2 の Flox マウスを熊本大学動物資源開発研究施設・竹尾透博士と協力で作製し、flox ホモ個体を得た。今後、血管内皮特異的に Cre 発現を誘導できる Cdh5-CreERT2 トランスジェニックマウスとの交配を進め、Cdh5-CreERT2 ^{+/+}; Coll4a1/a2-flox^{flox/flox} を作製する。この遺伝子改変マウスを用いて、人為的な毛細血管網異常の誘導により、どのように組織が影響を受けるのかを解析していく予定である。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------