

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22122002

研究課題名（和文）発生期網膜における血管先端細胞と神経系細胞のクロストーク

研究課題名（英文）Crosstalk between endothelial tip cells and neurons in the developing retina

## 研究代表者

久保田 義顕（Kubota, Yoshiaki）

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：50348687

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 81,900,000円

研究成果の概要（和文）：網膜の血管網は出生後に形成される。まず網膜の最内側の表面に沿って放射状に成長し、浅部血管叢を完成させる。網膜本体への血管の進入は生後2週目以降に起こり、深部・中間血管叢が段階的に形成される。この特徴的な網膜血管形成のパターンについて、なぜそのようなパターンをとるかは明らかではない。本研究では、あらゆる血管の成長に必須の因子として知られるVEGF（Vascular endothelial growth factor; 血管内皮細胞成長因子）が、網膜神経によって取り込み・消化されることで濃度勾配が形成されるという全く新たな機序により、網膜の段階的な血管形成が制御されていることを見出した。

研究成果の概要（英文）：During development, neurons guide and attract blood vessels and consequently the parallelism of these two is established. Here we identified a non-canonical neurovascular interaction in eye development. VEGFR2, a critical endothelial receptor for VEGF, was more abundantly expressed in retinal neurons than in endothelial cells including endothelial tip cells. Genetic deletion of VEGFR2 in neurons caused misdirected angiogenesis toward neurons resulting in abnormally increased vascular density around neurons. Further genetic experiments revealed that this misdirected angiogenesis was attributable to an excessive amount of VEGF protein around neurons caused by insufficient engulfment of VEGF by VEGFR2-deficient neurons. Moreover, absence of neuronal VEGFR2 caused misdirected regenerative angiogenesis in ischemic retinopathy. Thus, this study revealed novel neurovascular crosstalk and unprecedented cellular regulation of VEGF: retinal neurons titrate VEGF to limit neuronal vascularization.

研究分野：医歯薬学

キーワード：VEGF VEGFR2 網膜 エンドサイトーシス 神経 血管新生

1. 研究開始当初の背景

血管と神経は、生体内における二大ネットワークであり、両者は密接に相互作用を及ぼし、また共通の誘導因子を持つ。脳や網膜をはじめとする中枢神経系は、臓器そのものが殆ど神経細胞により構築されているにもかかわらず、皮膚や心臓など非神経組織に比べ、血管 神経連関の解明は遅れている。本研究は視覚に特化した中枢神経系の一部である網膜をモデルとし、中枢神経系における血管 神経クロストークの実体を明らかにすべく遂行された。

2. 研究の目的

網膜における血管 神経クロストークの実体を明らかにする上で、生体内のあらゆる血管新生において必須の分子で知られる血管内皮成長因子 Vascular endothelial growth factor (VEGF) のメイン受容体である 2 型 VEGF 受容体 (VEGFR2) が、新生仔期網膜においては血管よりむしろ神経に強く発現するという事象を切り口に解析を行った。

3. 研究の方法

申請者の確立した組織ホルマウント血管染色技術を駆使し、マウス網膜の血管構築を解剖学的に観察、その血管ネットワーク変化のダイナミクスを詳細に解析した。解析対象となった遺伝子改変マウスは神経特異的 VEGFR2 欠損マウス、神経特異的エンドサイトーシス欠失マウス、可溶性 VEGFR2 欠損マウスなどである。

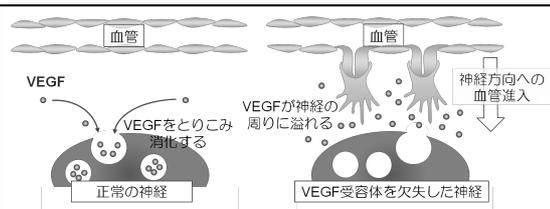
4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞特異的分子として知られてきた VEGFR2 が生後 1 週間に限定して、血管内皮細胞よりむしろ神経に発現することを見出した。また、ヘマンジオプラスト特異的 VEGFR2 エンハンサーとして知られる ( Distal-Multipotent-Mesodermal-Enhancer ; DMME ) が新生仔期の網膜神経における VEGFR2 の発現に寄与することを見出した。

(2) 遺伝学的に神経において VEGFR2 を欠損させたマウス ( Vegfr2<sup>neuro</sup> ) では、神経方向に血管が異所性に伸びていくという表現型が得られた。このメカニズムとして、VEGFR2 の欠失により神経の integrity が破綻するために二次的に血管進入するという原因が想定されたが、Vegfr2<sup>neuro</sup> における網膜神経は形態学的にも機能的にも全く正常であった。

(3) 上記 Vegfr2<sup>neuro</sup> では、神経における VEGFR2 を介した VEGF の取り込みが起こらないため、神経の周りに VEGF タンパクが溢れ、神経方向に血管が伸びていくという事象を、複数の遺伝子改変マウスを駆使して突き止めた。VEGFR2 は通常の膜型アイソフォーム ( mbVEGFR2 ) に加えて可溶性アイソフォーム ( sVEGFR2 ) が存在することが近年報告

されている ( Albuquerque et al. Nat Med 2009 )、この sVEGFR2 が VEGF をトラップし不活化することで神経への血管の接近を妨げているのではないかという、代替となりうる仮説を検証すべく、sVEGFR2 を特異的に欠損するマウスを作成することに成功した。しかしながら、このマウスにおいては Vegfr2<sup>neuro</sup> のような異所性の血管新生は見られなかった。これらの結果は、神経は通常、VEGFR2 を介して旺盛に VEGF を取り込み・消化しており、血管の進入を排除していることを示している ( Okabe et al Cell 2014 )



図：網膜において血管が神経によって排除される仕組み

正常の網膜神経 (左) は、血管の進入を誘導する VEGF をとりこみ・消化しているため、網膜に血管進入はおこらないが、VEGF 受容体を欠失した ( VEGF をとりこめない ) 神経 (右) のまわりには VEGF が多量に存在するため、網膜内部にむけて血管が進入する。

5. 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 7 件 )

全て査読有。\*corresponding author

1. Okabe K, Kobayashi S, Yamada T, Kurihara T, Tai-Nagara I, Miyamoto T, Mukoyama YS, Sato TN, Suda T, Ema M and **\*Kubota Y**. Neurons limit angiogenesis by titrating VEGF in retina. *Cell* 159: 584-596 2014. pubmed/25417109
2. Okuno Y, Nakamura-Ishizu A, Otsu K, Suda T and **\*Kubota Y**. Pathological neovascularization depends on oxidative stress regulation by ATM. *Nat Med* 18(8): 1208-1216, 2012. pubmed/22797809
3. Nakamura-Ishizu A, Kurihara T, Okuno Y, Ozawa Y, Kishi K, Goda N, Tsubota K, Okano H, Suda T and **\*Kubota Y**. The formation of an angiogenic astrocyte template is regulated by the neuroretina in a HIF-1-dependent manner. *Dev Biol* 363(1): 106-114, 2012. pubmed/22226979
4. Nakamura-Ishizu A, Okuno Y, Omatsu Y, Okabe K, Morimoto J, Ueda T, Nagasawa T, Suda T and **\*Kubota Y**. Extracellular matrix protein Tenascin-C is required in the bone marrow microenvironment primed for hematopoietic regeneration. *Blood* 119(23): 5429-5437, 2012. pubmed/22553313
5. **\*Kubota Y**, Takubo K, Hirashima M,

- Nagoshi N, Kishi K, Okuno Y, Nakamura-Ishizu A, Sano K, Murakami M, Ema M, Omatsu Y, Takahashi S, Nagasawa T, Shibuya M, Okano H and \*Suda T. Isolation and function of mouse tissue resident vascular precursors marked by myelin protein zero. *J Exp Med* 208(5): 949-60, 2011. pubmed/22797809
6. Okuno Y, Nakamura-Ishizu A, Kishi K, Suda T and \***Kubota Y**. Bone marrow-derived cells serve as pro-angiogenic macrophages but not endothelial cells in wound healing. *Blood* 117(19): 5264-72, 2011. pubmed21411758
  7. Kurihara T, **Kubota Y** (equally first author), Ozawa Y, Takubo K, Noda K, Simon MC, Johnson RS, Suematsu M, Tsubota K, Ishida S, Goda N, \*Suda T and \*Okano H. von Hippel-Lindau protein regulates transition from fetal to adult circulatory system in retina. *Development* 137: 1563-1571, 2010. pubmed20388654
- [学会発表](計 40 件)
1. **久保田義顕**: 網膜血管発生と病的血管新生; **第 23 回愛媛ハートクラブ** (松山全日空ホテル(愛媛県松山市)2014 年 11 月 13 日)(招待講演).
  2. **久保田義顕**: Neuro-vascular interaction in retinal development and pathology; 第 2 回 Ad Hoc IRCMS セミナー(熊本大学(熊本県熊本市)2014 年 10 月 27 日)(招待講演).
  3. **久保田義顕**: 網膜血管発生と病的血管新生; **第 12 回心臓血管発生研究会** (磐梯熱海温泉ホテル華の湯(福島県郡山市)2014 年 10 月 17 日)(招待講演).
  4. **Kubota Y**. Paracrine interplay between neural and vascular systems in the retina. *Lecture in Biomedicum Helsinki*. 10 October, 2014, University of Helsinki, Helsinki, Finland (Invited speaker).
  5. **久保田義顕**: Novel role of the VEGF/VEGFR2 signaling in retinal vascular development; **第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会合同年会** (奈良県新公会堂(奈良県奈良市)2014 年 9 月 29 日)(招待講演).
  6. **久保田義顕**: 網膜血管の発生と病的血管新生; **脈管クラスター研究講演会** (旭川医科大学(北海道旭川市)2014 年 9 月 26 日)(招待講演).
  7. **久保田義顕**: 腫瘍血管特異的な血管新生分子メカニズム; **京都心血管代謝セミナー** (京都大学(京都府京都市)2014 年 6 月 9 日)(招待講演).
  8. **久保田義顕**: 血管新生におけるマクロファージの役割; **第 36 回日本血栓止血学会学術集会** SPC シンポジウム(大阪国際交流センター(大阪府大阪市)2014 年 5 月 29-31 日)(招待講演).
  9. **久保田義顕**: 血管新生におけるマクロファージの役割; **千里ライフサイエンスセミナー** (千里ライフサイエンスセンター(大阪府吹田市)2014 年 5 月 28 日)(招待講演).
  10. **Kubota Y**. Oxidative stress as a target for anti-angiogenic therapy. *18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting*. 14-17 April, 2014, Miyakomesse, Kyoto, Japan (Invited speaker).
  11. **Kubota Y**. Retina as a tool for studying angiogenesis (Luncheon Seminar). *18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting*. 14-17 April, 2014, Miyakomesse, Kyoto, Japan (Invited speaker).
  12. **Kubota Y**. Oxidative stress as a target for antiangiogenic therapy. *Keystone Symposium "Metabolism and Angiogenesis (X5-2014)"*. 16-21 March, 2014, Whistler, British Columbia, Canada (Invited speaker).
  13. **久保田義顕**: 網膜血管発生における VEGF シグナルの新たな役割; **第 13 回日本再生医療学会総会 シンポジウム「血管生物学の現状と血管の発生、新生」**(国立京都国際会館(京都府京都市)2014 年 3 月 4-6 日)(招待講演).
  14. **Kubota Y**. Oxidative stress as a target for antiangiogenic therapy. *Sminar in Kings's College London*. 17 January, 2014, Kings's College London, London, UK (Invited speaker).
  15. **Kubota Y**. Oxidative stress as a target for antiangiogenic therapy. *Sminar in UCL Ophthalmology*. 16 January, 2014, UCL Institute of Ophthalmology, London, UK (Invited speaker).
  16. **久保田義顕**: 腫瘍血管特異的な分子メカニズムの解明; **千葉大学 G-COE セミナー** (千葉大学(千葉県千葉市)2012 年 12 月 17 日)(招待講演).
  17. **久保田義顕**: Tip cell independent function of the VEGF-A/VEGFR2 signaling in vascular development; **第 36 回日本分子生物学会年会 ワークショップ「血管新生分子機構のパラダイムシフト」**(神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)2013 年 12 月 3-6 日)(招待講演).
  18. **久保田義顕**: 腫瘍血管特異的な分子標的としての酸化ストレスシグナル; **第 21 回日本血管生物医学学会学術集会** (大阪千里阪急(大阪府豊中市)2013 年 9 月 26-28 日)(招待講演).
  19. **久保田義顕**: 腫瘍血管特異的な血管新生分子メカニズム; **第 4 回 Molecular Cardiovascular Conference II** (北海道キロロ・ホテルピアノ(北海道余市郡 赤井川村)2013 年 9 月 6-8 日)(招待講演).
  20. **Kubota Y**. Oxidative stress as a target for

- anti-angiogenic therapy. *11<sup>th</sup> Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology*. 22-23 August, 2013, Hyatt Regency Jeju, Korea (Invited speaker).
21. 久保田義顕：創傷血管のイメージングとダイナミクス；**第5回日本創傷外科学会総会・学術集会**（ホテルグランヴィア 京都（京都府京都市）2013年7月11-12日）（招待講演）。
  22. 久保田義顕：腫瘍血管特異的分子メカニズムの解明: Beyond VEGF blockade **第9回宮崎サイエンスキャンプ**（宮崎シーガイア(宮崎県宮崎市)2013年2月15-17日）（招待講演）。
  23. 久保田義顕：Atm function in angiogenesis；**第35回日本分子生物学会年会 ワークショップ「ATMファミリーキナーゼの多様な制御機構と組織・動物種特異的な役割」**（福岡国際会議場（福岡県福岡市）2012年12月11-14日）（招待講演）。
  24. Kubota Y. Oxidative stress in pathological angiogenesis. *Special Seminar in Biomedicum Helsinki*. 24 October, 2012, Biomedicum Helsinki, Helsinki, Finland (Invited speaker).
  25. Kubota Y. Tumor angiogenesis and oxidative stress. *Joint JSPS-Karolinska Institute (KI) Symposium*. 23 October, 2012, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden (Invited speaker).
  26. 久保田義顕：マウス毛乳頭血管発生のメカニズム；**第2回細胞再生医療研究会 臨床研究情報（TRI）センター**（兵庫県神戸市）2012年7月29日）（招待講演）。
  27. 久保田義顕：抗腫瘍血管新生療法の新規標的；Beyond VEGF blockade **第30回日本骨代謝学会学術集会**（京王プラザホテル（東京都新宿区）2012年7月19-21日）（招待講演）。
  28. 久保田義顕：血管パターンニング制御機構と腫瘍血管新生. **第39回 NIH 金曜会**（Bethesda,USA 2012年6月1日）（招待講演）。
  29. Kubota Y. Pathological neoangiogenesis depends on oxidative stress regulation by ATM. *Mini Seminar in the Scripps Institute*. 12 March, 2012, San Diego, CA,USA (Invited speaker).
  30. 久保田義顕：Pathological neoangiogenesis depends on oxidative stress regulation by ATM. **第34回日本分子生物学会年会ワークショップ「Dynamic linkage of vascular system and organ functions - novel roles of blood vessels in health and disease」**（パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）2011年12月13-15日）（招待講演）。
  31. 久保田義顕：抗腫瘍血管新生療法の新規標的の探索；Beyond VEGF blockade **第42回 ニューロ・オンコロジーの会**（東京女子医科大学・早稲田大学連携先端生命科学教育施設（東京都新宿区）2011年12月3日）（招待講演）。
  32. Kubota Y. Pathological neoangiogenesis depends on oxidative stress regulation by ATM. *The Second Pacific Symposium on Vascular Biology*. 30 October-2 November, 2011, Jeju, Korea (Invited speaker).
  33. 久保田義顕、貴志和生：形成外科と免疫組織学的解析 **第20回日本形成外科基礎学術集会**（京王プラザホテル（東京都新宿区）2011年10月6日）（招待講演）。
  34. Kubota Y. ATM drives pathological angiogenesis by suppressing oxidative stress. *9th Japan-Korea vascular biology symposium*. 25-26 August, 2011, Busan, Korea (Invited speaker).
  35. 久保田義顕：Role of Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) in angiogenesis. **第7回 Aso International Meeting**（ホテルグリーンピア南阿蘇（熊本県阿蘇郡南阿蘇村）2011年7月29-31日）（招待講演）。
  36. Kubota Y. ATM-mediated suppression of oxidative stress is required for pathological neovascular expansion. *8th International Symposium on the Biology of Endothelial Cells*. 15-18 June, 2011, Zurich, Switzerland (Oral presentation).
  37. 久保田義顕：マクロファージのリンパ管新生における役割 **第35回日本リンパ学会総会**（東京ステーションコンファレンスセンター（東京都中央区）2011年6月3-5日）（招待講演）。
  38. 久保田義顕：Role of macrophages in angiogenesis and lymphangiogenesis. **第18回 日本血管生物医学学会学術集会**（梅田スカイビル（大阪府大阪市）2010年12月1-3日）（招待講演）。
  39. 久保田義顕：組織血管前駆細胞 (tissue-resident vascular precursors)の同定と機能解析 **第11回 Organ Microcirculation Forum**（慶應義塾大学医学部（東京都新宿区）東京 2010年11月4日）（招待講演）。
  40. Kubota Y. M-CSF as a therapeutic target for tumor lymph/angiogenesis. *5th Gordon Research Conference (Endothelial Cell Phenotypes In health & Disease)*. 8-13 August, 2010, Biddeford, ME,USA (Invited speaker).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.keiovascular.com/>

6．研究組織

(1)研究代表者

久保田 義顕 (KUBOTA YOSHIAKI)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：50348687