

令和元年5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0173

研究課題名(和文) 集団的細胞運動を制御するしくみの構成的理解

研究課題名(英文) Constructive understanding of the regulatory machinery of collective cell movement

研究代表者

西山 功一 (Nishiyama, Koichi)

熊本大学・国際先端医学研究機構・准教授

研究者番号：80398221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：血管を新しく増生する血管新生では、内皮細胞が相互作用を繰り返しながら集団となって運動し、枝分かれ構造をもつ複雑なかたちを作っていく。しかし、そのしくみは十分にわかっていない。本研究では、血管新生を試験管内で再現しながら理解するための、マウス個体からの内皮細胞、壁細胞単離培養法、細胞間相互作用を解析する細胞接着培養法、試験管内血管新生モデル、および得られた4次元動態の定量解析並びに血管新生の数値モデルを新たに開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管新生に限らず、我々生物の組織や器官は、細胞が寄り集まることで作られている。その際には、細胞同士が様々な相互作用を通して集団として移動する集団細胞運動が非常に重要である。本研究で確立した、血管新生の新たな解析システムは、血管新生における集団細胞運動の理解を進めることにとどまらず、生物一般で見られる集団細胞運動の理解やそれを解析するための基盤技術として幅広く科学界に貢献することが期待される。また、血管新生の理解を深めることは、すなわち、血管新生が関与する病気の理解やそれを標的とした治療法の開発等、医療技術の発展にも大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：Angiogenesis is a process to increase the vascular bed, in which vascular endothelial cells collectively move via cell-cell interactions and finally form dendrite structure. However, the underlying machinery is not fully understood. In the research project, we newly developed a reconstitution assay system, which enables us to dissect the machinery, including primary culture for murine endothelial cell and pericyte, cell-cell interaction assay for collective cell movement, in vitro and in silico angiogenesis model, and 4D image processing and quantification.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管新生 血管内皮細胞 集団細胞運動 構成的解析システム

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、我々生物に存在する構造やかたちをつくる多細胞の現象を理解する切り口として、集団細胞運動（細胞が集団として運動する様式）が注目され研究されてきた。集団細胞運動では、個々の細胞の自律的な運動性が様々な細胞間相互作用を通して制御されて、最終的に秩序ある集団としての運動になる巧妙なしくみが存在すると考えられる。顕微鏡技術や可視化手法の進歩により、細胞の集団運動動態の全貌が徐々に見渡せるようになってきた。しかし、そのしくみをまだ十分理解するまでには至っていなかった。

(2) もともとある血管から血管を新しく作る血管新生は、集団細胞運動のしくみを解析する良いモデルである。血管新生においては、血管内皮細胞が寄り集まり、それを取り囲むように存在する壁細胞や組織環境からの影響を受けながら、枝分かれ構造を持つ複雑なかたちを創発的につくっていく。これまで我々は、4次元的に内皮細胞動態を解析する独自のシステムを用いることで、血管新生においても集団細胞運動が非常に重要であることを示した。また、その集団細胞運動において、血管新生を先導する細胞（チップ細胞）が頻繁に入れ替わるなど、これまでの想定を超え、ダイナミックで複雑な現象であることがわかってきた。さらに、数理モデルを併用した解析にて、その複雑な動態を制御しているしくみとして、細胞運動の自律性の関与や細胞間作用の一端を明らかにするに至った。また、研究協力者横川らと協働して、微小流体デバイス上に灌流できる血管網を構成的に構築し、血管腔内に血流を模した流れを再現し、より生体内に近い現象を構築することが可能になってきた。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、これまでの4次元細胞動態解析と数理モデルを使った解析に加えて、血管新生現象を *ex vivo* で徐々に再現しながら解析する構成的な実験系を新たに構築することを目指した。

(2) 構築した実験系で得られる4次元データの定量解析システムの構築、さらに、それを駆使し以下を明らかにすることで、一つの内皮細胞の自律的な運動から血管新生という秩序ある集団細胞運動が成り立つしくみを理解し、最終的には生物の構造やかたちをつくる中枢の原理に迫ることを目指した。

- ① 自律的な内皮細胞動態とそれを制御する細胞間作用
- ② 細胞間相互作用を介した血管新生の集団細胞運動メカニズムを解析する数理モデルの構築
- ③ 細胞間相互作用を介して血管新生の集団細胞運動を制御するしくみ
- ④ 壁細胞並びに血流が血管新生の集団細胞運動に与える作用

### 3. 研究の方法

(1) マウス大動脈組織片から、血管新生を行う構成細胞、血管内皮細胞と壁細胞を単離する。同細胞による凝集塊を作製しコラーゲン内に埋め込み培養することで、3次元的に血管新生を誘導する（スフェロイドアッセイ）。さらに、タイムラプスイメージングと定量解析によりその4次元動態を捉える。

(2) 単離した血管内皮細胞もしくはヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いて、一細胞の自律的な挙動の4次元動態と予測される細胞間相互作用を構成的実験と機能阻害実験にて分子・細胞レベルで抽出する。

(3) 研究協力者Köhn-Luqueらと共同して、実験データに基づき、一内皮細胞の自律的な挙動が予測される細胞間相互作用で統合され血管新生の集団細胞運動をシミュレートする数理モデルを、セルラポツ・モデルの枠組みで構築する。

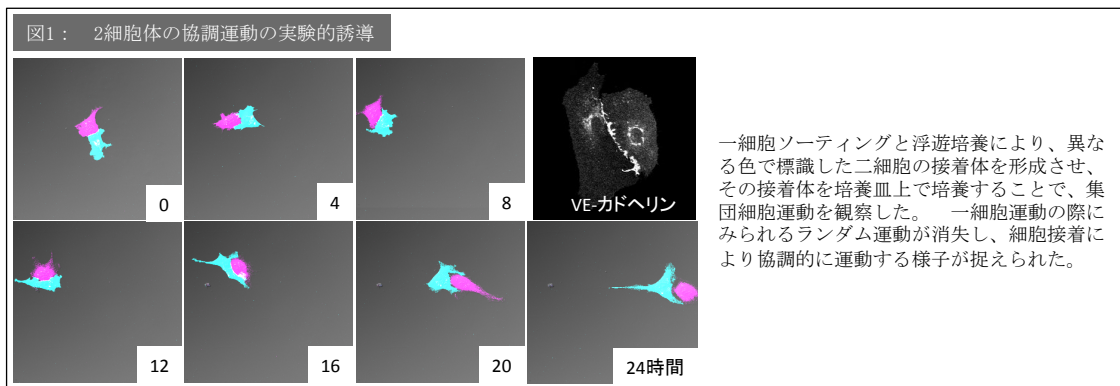
(4) 構築した数理モデルを使った理論予測と実験的検証にて数理モデルの改善を繰り返す。さらに、細胞間作用を遺伝的もしくは薬理的に介入し乱した状態でも同様に解析し、血管新生における内皮細胞の集団運動を最も再現するモデルを得る。この過程を通して、集団細胞運動を制御しているしくみを分子、細胞、システムレベルで理解する。

(5) 壁細胞を追加した場合、また血管内腔に血流を模した流れを追加した場合にも、上で得たしくみにより内皮細胞の集団細胞運動動態を同様に説明できるか検討する。血流を模した流れを血管内腔へ追加する際には、微小流体デバイスを用いた血管新生モデルを使用する。

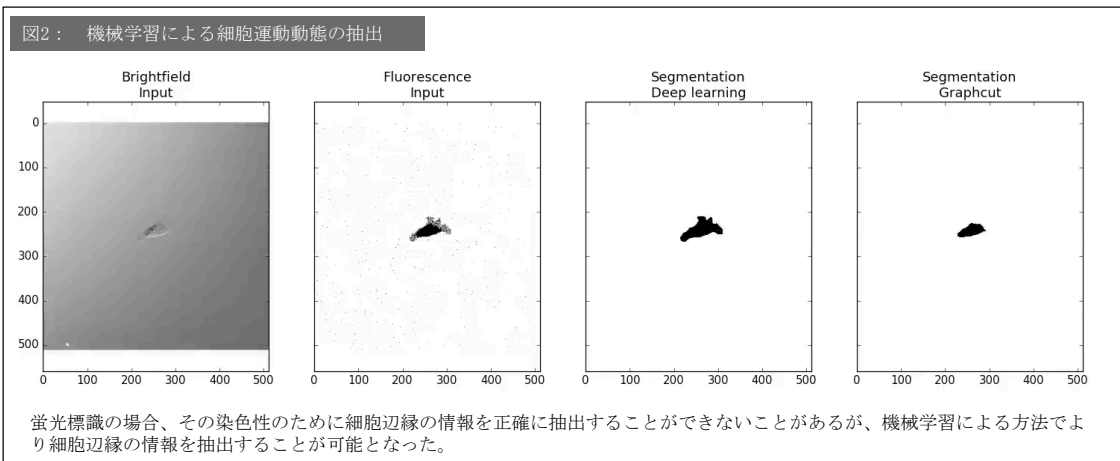
### 4. 研究成果

(1) 血管新生モデルの構築に必要となるマウス由来の血管内皮細胞と壁細胞の初代培養細胞を、質高く簡便に単離・培養する方法を開発した。内皮細胞培養の際に、TGFβシグナル経路阻害剤を添加することにより内皮間葉転換 (EndMT) を抑制し、より質の高い内皮細胞を培養増幅できることがわかった。また、至適濃度の増殖因子 PDGF-BB を加えることで、NG2 陽性の壁細胞分画を効率よく増幅することが可能であった。さらに、単離したマウス内皮・壁細胞を用いたスフェロイドアッセイにより血管新生機能を検討した結果、*in vivo* の血管新生とその際の細胞動態をよく模す現象が再現できることがわかった。これまで、血管新生などの形態形成機能を保った、質の良いマウス由来血管内皮細胞や壁細胞を単離培養する方法論はあまり報告されておらず、血管生物学領域の発展に大きく貢献できる成果である。現在、論文化を進めている。

(2) 血管新生における集団細胞運動に重要な細胞間相互作用を理解するために必要となる、細胞接着体誘導培養法の基盤技術を確立した。あらかじめ異なる蛍光色素で標識した HUVEC を細胞分離装置で選り分け、浮遊培養で 2 細胞接着体を誘導、同接着体を採取し培養皿上で培養、タイムラプス観察することで、目的とする細胞数の集団運動を *ex vivo* で再現することに成功した (図 1: 2 細胞接着体でみられる細胞接着依存的な細胞方向性運動)。集団細胞運動における細胞間相互作用を明確に解析する実験系はこれまでに報告がなく、同方法は今後広く応用され、様々細胞間相互作用に基づく多細胞現象を研究するツールとなる。



(3) 研究協力者である Köhn-Luque らと共に、一つの内皮細胞における細胞移動と細胞形状の時間変化を抽出する機械学習をベースとした方法を構築した。蛍光標識した細胞と微分干渉画像データを併用することで、特に細胞形状の時間変化をより明確に解析することが可能となった (図 2)。また、得られてきた細胞重心の経時的な位置情報から、平均 2 乗変位や自己相関関数などを含む細胞運動の特徴を評価する様々なパラメータ変化を算出する技術を確立した。さらに、テンソル分解と主成分解析の手法を合わせることで、細胞形状変化の特徴がより詳細に抽出できることがわかった。この 1 細胞動態解析法の有用性を確かめるために、細胞運動に必要な F-アクチンの制御分子の一つである低分子 G タンパク Rac1 をノックダウンしたヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を用いて、野生型 HUVEC と比較することで、Rac1 に特徴的な細胞運動パターンの抽出に成功した。本解析システムは、細胞運動パターンをこれまでより高い時空間解像度で解析する一つの有用な方法であり、現在、論文化を進めている。次のステップとして、同方法を応用し、二細胞、三細胞での集団細胞運動の定量化、細胞間相互作用の抽出を試みている。



(4) 研究協力者である Köhn-Luque らと共に、Morpheus などのプラットフォームを用いて一内皮細胞や二細胞接着体の運動動態をシミュレーションするモデルをセルラポッツ・モデルの枠組みで構築した。現在、今後の血管新生における細胞動態のメカニズム解析に応用展開する準備を進めている。

(5) 微小流体デバイスを用いた血管新生再現系において、壁細胞を血管内皮細胞に対して一定の比率で混入させることで、壁細胞が血管内皮細胞の新生血管枝を囲むことが再現された。また、壁細胞が存在することにより、血管枝の伸長が促進され、また、血管径が狭小化することがわかった。さらに、細胞レベルの観察から、壁細胞の存在により内皮細胞形態は枝の長軸方向に伸長すること、並びに内皮細胞の運動性が亢進することがわかった。現在、これらの細胞レベルでの効果と血管枝の伸長促進、血管径の狭小化の関連性に関して検討を進めている。血管新生における壁細胞の役割、特に、細胞レベルでの作用機序に関しては不明な点が多く、その理解に繋がる成果が得られた。

(6) 微小流体デバイスを用いた血管新生再現系において、誘導した新生血管内腔に血流を模した流れを再現するために、微量シリンジポンプを用いて毛細血管流程度の流れを付加することを試みたが、細胞外マトリクスの崩壊や細胞へのダメージと思われる原因により、血管新生の流れの効果を理解するのに十分な結果を得るには至らなかった。原因として、シリンジポンプをデバイスに接続する際に生じる一時的な力（流路や血管内腔面への圧力）によるダメージが考えられた。それを解決するため、静水圧格差による流れの再現を試み、毛細管流レベルの流れを様々なダメージなく付加できることがわかった。本研究で開発した静水圧格差を利用した方法は、シリンジポンプを用いる際の煩雑な実験手技を必要とせず、簡便に行えることから、今後汎用されていく方法であると期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 4 件）

- ① Araki M, Hisamitsu T, Kinugasa-Katayama Y, Tanaka T, Harada Y, Nakao S, Hanada S, Ishii S, Fujita M, Kawamura T, Saito Y, Nishiyama K, Watanabe Y and Nakagawa O. Serum/glucocorticoid regulated kinase 1 as a novel transcriptional target of bone morphogenetic protein-ALK1 receptor signaling in vascular endothelial cells. *Angiogenesis* 2018;21(2):415-23. doi: 10.1007/s10456-018-9605-x.
- ② Suzuki T, Minerva D, Nishiyama K, Koshikawa N and Chaplain MAJ. Study on the tumor-Induced angiogenesis using mathematical models. *Cancer Sci* 2017;109(1):15-23. doi: 10.1111/cas.13395
- ③ Nashimoto Y, Hayashi T, Kunita I, Nakamasu A, Torisawa Y, Nakayama M, Takigawa-Imamura H, Kotera H, Nishiyama K, Miura T and Yokokawa R. Integrating perfusable vascular networks with a three-dimensional tissue in a microfluidic device. *Integrative Biol* 2017;9(6):506-18. doi: 10.1039/c7ib00024c.

〔学会発表〕（計 14 件）

- ① Koichi Nishiyama, Reconstitution assay system for understanding angiogenic morphogenesis: the morphogenetic function of pericardial pericytes, International Vascular Biology Meeting, 2018
- ② 西山 功一, 構成的アプローチによる血管新生における細胞移動の理解, 第 91 回日本生化学大会, 2018
- ③ Koichi Nishiyama, Isolation and functional assay of murine endothelial cells and pericytes for understanding of angiogenic morphogenesis, Keystone symposium “Angiogenesis and Vascular Biology”, 2017
- ④ Koichi Nishiyama, Collective cell migration in angiogenic morphogenesis, ZiF Workshop “Multiscale Analysis and Modeling of Collective Migration in Biological Systems”, 2017
- ⑤ 西山 功一, Coordinated angiogenic movement of tip endothelial cell revealed by experiments combined with mathematical modeling, 第 24 回日本血管生物医学会学術集会, 2016

〔その他〕

- ① 西山 功一, 発見から 100 年、ベールを脱ぐペリサイト, 実験医学, 36(1)87-93, 2018
- ② 西山 功一 他, わかる・できる生命科学の数理モデルとシミュレーション - 血管を伸長する細胞メカニズムの解析, 実験医学:増刊号, 35(5)200-202, 2017
- ③ ホームページ等

<http://kumamoto-ircms-nishiyama.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名： 横川 隆司

ローマ字氏名： (YOKOKAWA, Ryuji)

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名： Alvaro Köhn-Luque

ローマ字氏名： (ALVARO, Köhn-Luque)

※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。