

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09429

研究課題名(和文) 網膜血管新生・リモデリングをつかさどる基底膜動態のライブ解析

研究課題名(英文) Basement membrane dynamics in the development of retinal blood vessels

研究代表者

二木 杉子 (Futaki, Sugiko)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：00403014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトやマウスの網膜では血管が中心部から放射状に広がっている。血管の壁をつくる内皮細胞は常に“基底膜”に接しており、基底膜は内皮細胞の足場としてなくてはならない役割を持っている。しかし血管基底膜がどのように作られるかは意外と知られていない。本研究ではマウスの網膜で血管が伸びるときの基底膜の変化について詳細に解析し、血管が成長するにしたがって基底膜の成分や周辺環境が変化することを明らかにした。また、蛍光蛋白質によって基底膜が光るマウスを用いて生きた状態で血管基底膜を観察することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管は成体組織を維持するためには不可欠であり、血管の働きを理解するためには内皮細胞の足場である基底膜の役割の解明も重要である。しかし基底膜の形成・維持・分解の仕組みはほとんど知られていない。本研究ではマウス眼球内の網膜の血管で基底膜の変化を明らかにした。今後、血管基底膜の変化とその仕組みをさらに解明していくことで、成体組織で血管が正しく作られて働くメカニズムを理解し、がんや組織再生の際に血管の形成を制御する技術にもつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In the mammalian retina, blood vessels extend from the center with a hierarchical branching pattern. In the blood vessels, vascular endothelial cells are attached to a "basement membrane," which plays an important role as a scaffold for vascular endothelial cells. However, it has remained unclear how the vascular basement membrane is formed and maintained. In this study, we analyzed in detail the molecular changes in the basement membrane during the growth of blood vessels in the mouse retina. As a result, it was revealed that the distribution of the components and related molecules in the basement membrane changes as the blood vessels grow. They also succeeded in observing the basement membrane of blood vessels in a living state using mice in which the basement membrane was irradiated with fluorescent proteins.

研究分野：細胞生物学、発生生物学

キーワード：基底膜 血管 網膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大動脈から毛細血管に至るまですべての血管内皮は基底膜を有している。基底膜は細胞から分泌された線維蛋白質や糖鎖分子で構成される薄膜構造で、細胞の基底側に接している。血管内皮細胞はインテグリンなどの細胞表面受容体を介して基底膜分子に結合し、それによって細胞内に生存や分化に関わるシグナルが伝達される。血管の形成と機能には基底膜のはたらきが不可欠であることが、遺伝子変異マウスなどを用いた解析で示されている。例えば血管基底膜を構成する蛋白質の遺伝子変異マウスでは胎仔期からの出血や血管の形成異常が報告されている。従来、基底膜の構造の解析は固定組織を用いて電子顕微鏡や免疫組織染色によって行われてきた。しかし血管は動的な組織であり、その制御機構を理解するためには基底膜の形成・分解・ターンオーバーといった動的な変化の解明が不可欠だと考えられた。そこで血管新生過程が観察しやすいマウス網膜をモデルとして、基底膜の変化の詳細な解析に取り組んだ。

2. 研究の目的

網膜の血管網形成で見られる血管新生やリモデリングにおいて、血管基底膜の形態と分子レベルでの変化を免疫組織学的に詳細に解析すること、およびライブイメージング等の手法により規定幕の動態(基底膜の形成・分解、形態変化、ターンオーバー)を明らかにすることで、正常および病的な血管形成メカニズムにおける基底膜の役割を理解する。

3. 研究の方法

マウス新生仔の網膜における血管新生を観察対象とし、主に免疫組織学的手法により網膜血管網の形成時における基底膜蛋白質や蛋白質分解酵素の発現・局在を詳細に解析した。

また、我々が開発した基底膜に蛍光蛋白質を発現するトランスジェニックマウスを用いて、網膜血管のライブイメージングによる基底膜の変化の観察を行なった。

4. 研究成果

(1) マウス新生仔網膜の血管新生過程における基底膜関連蛋白質の発現・局在を解析した。伸長中の網膜血管網においては部位によって基底膜組成が異なること、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)-9, -14が血管周囲に発現・局在を明らかにした。

(2) 未熟児網膜症のマウスモデル(OIRマウス)を導入し、病的な血管形成における血管基底膜の形態変化、基底膜蛋白質の局在、MMP-9, -14の局在について検討した。OIRマウス網膜では中心領域の血管が大幅に消失し、網膜辺縁部の血管の異常な拡張・蛇行などが観察された。Whole-mount 蛍光免疫染色による観察では、これらの異常な血管網も基底膜を有しており、代表的な基底膜蛋白質の局在についても正常血管と顕著な差はないことが示された。OIRにおける病的な血管出芽部と見られる部位についても血管基底膜の異常やMMPの局在などは認められなかった。

(3) 我々が開発した Nid1-mCherry Tg を用いて、生後 2 週目の網膜で血管基底膜のライブ観察を行なった。血管基底膜の蛍光は網膜組織培養下でも 24 時間以上継続して観察可能であることが示された。培養下の網膜血管基底膜の蛍光を局所的に褪色させたところ、24 時間後には一定程度の蛍光回復が認められた。これらの観察から成長期の網膜血管基底膜では過剰発現させた基底膜蛋白質が継続的に集積することが示され、血管基底膜がターンオーバーしていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Iida Tomato, Futaki Sugiko, Shibata Masa-Aki, Otsuki Yoshinori, Kondo Yoichi	4. 巻 64
2. 論文標題 Differential Localization of Laminin Subunits and MMP-9 in Mouse Retinal Angiogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bulletin of the Osaka Medical College	6. 最初と最後の頁 27～33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Futaki Sugiko, Nakano Itsuko, Kawasaki Miwa, Sanzen Noriko, Sekiguchi Kiyotoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular profiling of the basement membrane of pluripotent epiblast cells in post-implantation stage mouse embryos	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2019.04.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sato Yuya, Kiyozumi Daiji, Futaki Sugiko, Nakano Itsuko, Shimono Chisei, Kaneko Naoko, Ikawa Masahito, Okabe Masaru, Sawamoto Kazunobu, Sekiguchi Kiyotoshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Ventricular-subventricular zone fractones are speckled basement membranes that function as a neural stem cell niche	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 56～68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E18-05-0286	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirakawa Yuka, Futaki Sugiko, Furukawa Fukumi, Kondo Yoichi, Moriwaki Shinichi	4. 巻 36
2. 論文標題 Acute changes in nidogen-1 expression in the epidermal basement membrane of a 3-dimensional cultured human skin model after ultraviolet B irradiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Photodermatol Photoimmunol Photomed	6. 最初と最後の頁 499～502
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/php.12607	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 二木杉子、飯田知子、平田あずみ、柴田雅朗、関口清俊、近藤洋一
2. 発表標題 マウス新生仔網膜血管新生における基底膜蛋白質およびMMPの局在
3. 学会等名 第51回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二木杉子、平田あずみ、柴田雅朗、関口清俊、近藤洋一
2. 発表標題 マウス新生仔網膜血管新生における基底膜蛋白質およびMMPの局在
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯田 知子、二木 杉子、関口 清俊、大槻 勝紀、近藤 洋一
2. 発表標題 マウス網膜血管形成における基底膜イメージング
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

〔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
---------	---------