

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03397

研究課題名(和文)臓器特異的血管パターンニングの制御機構

研究課題名(英文)Analysis for organ-specific vascular patterning

研究代表者

久保田 義顕 (KUBOTA, Yoshiaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：50348687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、臓器によって異なる血管パターンニングの多様性がいかにして獲得されるかを解剖学・細胞生物学・生化学、in vivoイメージングなど多様な技術を統合して解き明かすべく遂行された。特に歯における血管ネットワーク構築の分子メカニズム、および血管が歯の硬化に与える影響を明らかにする(Matsubara et al., J Exp Med 2022)とともに、進行がんの血管に特異的に使われている血管内皮細胞間接着システムを明らかにし、がんの転移を効率的に抑える分子標的を同定した(Ando et al., J Clin Invest 2022)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の血管の解析で見出された細胞メカニズム、網羅的に同定された血管由来の象牙芽細胞成熟因子などの解析をさらに進めることによって、虫歯・歯周病により失われた歯の再生への応用が期待される。また腫瘍血管の研究成果については、血管ががん細胞を転移させるユニークな仕組みを解明したものであり、ヒトでこのFLRT2の働きを特異的に抑えられる薬剤が開発されれば、VEGF阻害剤では不十分であった、がん転移を効率的に抑える分子標的薬となることが期待される。さらには、免疫チェックポイント阻害剤をがんの奥まで深達させ、その効果を最大限にさせるための、「地ならし」的な併用療法への応用も期待される。

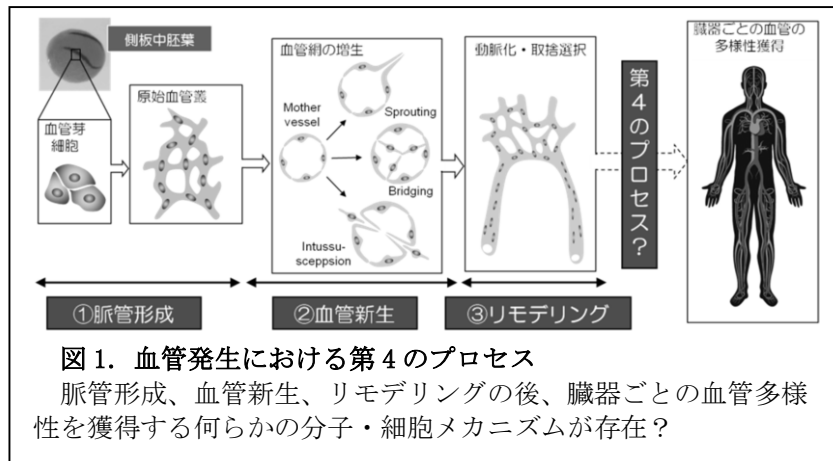
研究成果の概要(英文)：In vertebrates, the vascular network develops throughout the body to meet the demand of oxygen and nutrients in tissues, and to secrete organotypic paracrine molecules, known as angiocrine factors, driving cell differentiation and tissue morphogenesis. Recent advances in the imaging technique and single cell transcriptomics comprehensively uncovered the vascular cell heterogeneity ensuring the functional diversity of organotypic vasculature. In this study, we uncovered the cellular and molecular basis of cell-to-cell communication regulating angiogenesis in the skeletal system in particular teeth, the hardest tissue in our bodies (Matsubara et al., J Exp Med 2022). Moreover we identified an inter-endothelial junction molecule which could be a novel therapeutic target for cancer therapy (Ando et al., J Clin Invest 2022).

研究分野：血管生物学、解剖学

キーワード：血管新生 VEGF 歯 がん FLRT2

1. 研究開始当初の背景

血管は生命の維持のために必須の組織である。個体発生の過程でこの血管ネットワークが全身に張り巡らされるプロセスは、特に解剖学・発生学分野における中心的な課題の一つとして、長らく精力的に解析されてきた。多くの教科書において、この血管発生という現象は vasculogenesis (脈管形成)、



angiogenesis (狭義の血管新生)、remodeling (血管リモデリング) という3つの連続的なステップに分けられ説明される。それ故、現行の血管研究においては、全身の血管形成を一般化し、各ステップごと、縦割り式に理解しようというスタイルが一般的である。例えば、肝臓や骨格筋で見つかった新たな血管新生機構が他の組織では存在しない場合、例外的な事象としていわゆる『一般的な血管発生メカニズム』から排除される傾向にある。しかしながら、全身の血管網の最終形態を考えた場合、臓器によって異なる血管の多様性が獲得される最終ステップを抜きにして考えることはできず、また上記3つの教科書的なカテゴリでは説明できない。また、臓器特異的血管パターンニングは、各臓器の恒常性維持に寄与する機能の発揮のために重要な生物学的システムであると考えられ、これを規定する細胞・分子メカニズムの解明は欠かせない。実際、臨床の現場において、現行の血管を標的とした治療 (ベバシツマブなど) は、全身の血管を無差別に標的とするため、副作用 (血管障害) が大きな問題となるとともに、それ故投与量を十分に上げられず、モデル動物における劇的効果と比し、ヒトにおいては十分な効果が得られていない。本研究では、もともと組織によって血管が張り巡らされる土壌は全く違うものであることを出発点とし、より大きな枠組みで物事を捉え、血管ネットワークの多様性の獲得における未知の普遍原理を炙り出し、上記3つのカテゴリに加え、新たなパラダイム (『第4のプロセス』) (図1) を構築するものである。また、本研究は、現行の血管を標的とした治療の問題を克服し、より副作用の少ない臓器特異的な分子標的薬の開発につながるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、臓器によって異なる血管パターンニングの多様性がいかにして獲得されるかを解剖学・細胞生物学・生化学、in vivo イメージングなど多様な技術を統合して取り組むというプロジェクトである。当該分野における従来研究との大きな違いは、血管形成という現象を画一化し、十把一絡げに理解しようとはせず、臓器機能発揮のために如何様にもカスタマイズされる多様な現象であるとし、より大きな枠組みで物事を捉え、その本質を解き明かすという点である。また、血管と各臓器固有細胞との相互作用や機能的な連関、不要な血管が退縮していく過程を重視するとともに、『臓器の成長に伴う物理的な力』『同じリガンドに対する、状況に応じたシグナルの使い分け』などの新たな要素を加えたユニークなアプローチにより血管形成を俯瞰するという独創性の高い研究を展開する。本研究は一見、臨床や疾患とは関係の薄い、基礎的に見える研究だが、あらゆる臓器の恒常性維持の理解、そして血管の関わる各臓器の病態の理解、つまりがんや糖尿病などの血管新生病や虚血性疾患の病態解明に貢献するとともに、斬新な治療法の開発の基盤になると考えられる。

3. 研究の方法

申請者はこれまでマウス網膜をモデルとし、その特徴的な血管パターンニングに資する異種細胞間クロストークの全容を解明してきた。中でも、血管に限定して発現するとされてきた VEGF のメイン受容体である VEGFR2 が、血管よりむしろ神経に強く発現し、VEGF と会合して神経細胞内に取込み・消化することで、神経の周囲の VEGF 濃度を調節し、血管成長の方向性を規定することを見出した (Okabe et al Cell 2014)。また、この取り込み機構が網膜胎仔循環系である硝子体血管の自然退縮のタイミングも規定していることを見出した (Yoshikawa et al J Exp Med 2016)。本研究はこの予備的知見や、これまで確立してきたオリジナルの組織学的解析の技術を突破口とし、他の臓器、特に骨や歯を初めとする硬組織の血管パターンニング制御機構、がんの血管においてのみ用いられている血管維持機構などを包括的に捉え、血管多様性の獲得の基盤となる普遍原理を見出す。

4. 研究成果

以下、本研究課題における大きな成果である、歯の形成過程における異種細胞間相互作用、および腫瘍血管の維持機構の特殊性の2つについて順に詳細に説明する。

(1) 歯は人体の中で最も硬い構造物で、特に食事においてその硬さが不可欠である。その硬い歯の中央部には歯髄というやわらかい組織があり、この部位の血管が歯が硬くなる過程でなんらかの役割があることは示唆されてきた。しかし、組織を細かく観察するための『切片を切る』という作業が、他のやわらかい組織とは違って、その硬さゆえにほぼ不可能であったため、血管がどのように歯に入っていくか、そして血管がどのように歯の硬さに貢献しているかは不明であった。本研究ではまず、この歯の血管の可視化を可能にすべく従来の実験手技にさまざまな改良を加え、マウスの歯の切片をきれいに切ることに成功、歯の血管の立体構造を単一細胞レベルで可視化する技術を確立した。この技術を使って血管の走行を詳細に観察したところ、歯の硬化を担う象牙芽細胞の周辺にまとわりつき、象牙芽細胞の成熟を促すとともに、リンなどの硬化に必要な成分を供給しているユニークな血管細胞集団を見いだした。さらにその特定の血管細胞だけを除去するような遺伝子改変マウスを作成したところ、歯が硬くならないことも見いだした (Mastubara et al., J Exp Med 2022)。

(2) がんの進行、転移には、がん内部への血管新生が必要とされる。そのため、血管新生をとめる薬剤によって、がんの進行、転移は抑えられると考えられ、そうした薬剤 (VEGF 阻害剤など) が既に臨床のがん治療の現場において用いられている。しかしながら、VEGF 阻害剤はがんの転移に関しては、抑える効果が不十分なケースもみられ、そのメカニズムについて世界的に解析が進められるとともに、がん転移を効率的に抑える新たな分子標的が探索されてきた。本研究では神経ガイダンス因子 FLRT2 について、多数のヒト大腸がんサンプルでの発現を解析したところ、がんの血管、特に進行がんの血管で強く発現し、その発現量は患者予後と逆相関していることを見出した。次に血管内皮特異的に FLRT2 遺伝子を欠損したマウスを作成し、がんモデルを適用したところ、皮膚に発生したがん (原発巣) において、血管内部へのがん細胞の侵入が顕著に抑えられ、その結果、肺や肝臓への遠隔転移が顕著に減少することを見出した。続いてそのメカニズムについてさまざまなアプローチで検討した結果、FLRT2 はがんの血管に特有な隙間の多い (幼弱な) 血管に強く発現し、その血管内皮細胞同士をつなぎ留め、がん特有な血管構造を維持していることを見出した (Ando et al., J Clin Invest 2022)。

(1) の研究成果は世界で初めて、歯の組織の高精度イメージングを可能にしただけでなく、その技術を用いて、歯の硬化に重要な特定の血管細胞集団を同定し、血管による歯の硬化の詳細なメカニズムを解明したものである。将来的には、本研究で見出された細胞メカニズム、網羅的に同定された血管由来の象牙芽細胞成熟因子などの解析をさらに進めることによって、虫歯・歯周病により失われた歯の再生への応用が期待される。(2) の研究成果については、血管ががん細胞を転移させるユニークな仕組みを解明したものであり、ヒトでこの FLRT2 の働きを特異的に抑えられる薬剤が開発されれば、VEGF 阻害剤では不十分であった、がん転移を効率的に抑える分子標的薬となることが期待される。さらには、免疫チェックポイント阻害剤をがんの奥まで深達させ、その効果を最大限にさせるための、「地ならし」的な併用療法への応用も期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tai-Nagara I, Hasumi Y, Kusumoto D, (16名省略), *Baba M, *Kubota Y	4. 巻 11
2. 論文標題 Blood and lymphatic systems are segregated by the FLCN tumor suppressor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6314 ~ 6314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20156-6	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 該当する
1. 著者名 Brash JT, Bolton RL, Rashbrook VS, Denti L, Kubota Y, *Ruhberg C	4. 巻 127
2. 論文標題 Tamoxifen-Activated CreERT Impairs Retinal Angiogenesis Independently of Gene Deletion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation Research	6. 最初と最後の頁 849 ~ 850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCRESAHA.120.317025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ma X, Uchida Y, Wei T, Liu C, Adams RH, Kubota Y, Gutkind JS, Mukoyama YS, *Adelstein RS.	4. 巻 31
2. 論文標題 Nonmuscle myosin 2 regulates cortical stability during sprouting angiogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 1974 ~ 1987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E20-03-0175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 4.Takahashi M, Misaki M, Shibata S, Iga T, Shindo T, Tai-Nagara I, Hirata A, Ogawa M, Miyamoto T, Nakagawa T, Ema M, Ichiyama Y, Shima DT, Hozumi K, Nishimura S, *Kubota Y.	4. 巻 464
2. 論文標題 Macrophages fine-tune pupil shape during development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 137 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2020.06.004	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 該当する

1. 著者名 Okabe K, Fukada H, Tai-Nagara I, Ando T, Honda T, Nakajima K, Takeda N, Fong GH, Ema M, Kubota Y.	4. 巻 459
2. 論文標題 Neuron-derived VEGF contributes to cortical and hippocampal development independently of VEGFR1/2-mediated neurotrophism.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 65-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2019.11.016.	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 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 久保田義顕
2. 発表標題 血管の発生と創傷治癒
3. 学会等名 第50回日本創傷治癒学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保田義顕
2. 発表標題 血管・リンパ管の発生と病態
3. 学会等名 横浜市立大学大学院医学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保田義顕
2. 発表標題 Cell-to-cell communication regulating angiogenesis and lymphangiogenesis
3. 学会等名 The 21st International Vascular Biology Meeting. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保田義顕
2. 発表標題 Cellular and molecular basis of the neurovascular link
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保田義顕
2. 発表標題 血管・リンパ管の発生と病態
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiaki Kubota
2. 発表標題 Cellular and molecular basis of the neurovascular link.
3. 学会等名 Asia Australia Vascular Biology Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ラボウェブサイト http://www.keiovascular.com/</p>
--

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
---------	---------