

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07257

研究課題名（和文）毛細血管の有窓形成を調節する細胞外マトリクス分子の同定と制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Identification of extracellular matrix molecules that regulate fenestra formation in capillaries and their regulatory mechanisms.

研究代表者

中倉 敬 (Nakakura, Takashi)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：60568658

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）：物質交換が盛んな内分泌器官や小腸などの組織には、血管壁に窓が開く有窓型毛細血管が分布している。ホルモンや栄養素などの移動路として機能する窓は直径約70 nm程度のトンネル構造であり、集まることで篩板を形成している。

本研究課題では、はじめにラット下垂体前葉の有窓型内皮細胞新規培養法を確立した。次に、フィブロネクチンがインテグリン 5 1を介して微小管を制御し、窓を覆う隔膜の構成タンパク質PLVAPの細胞内輸送を調節していることを明らかにした。さらに、アクチン系に着目した研究を展開することで、ダイナミンとアクチンが協調的に機能し、窓の形成を抑制的に調節していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有窓型毛細血管は下垂体や小腸といった正常組織のほか、がん組織にも分布することが知られる。本課題の遂行で得た研究成果は、毛細血管の有窓性調節における細胞外マトリクスやエンドサイトーシス調節分子との関係性および重要性を示す新知見であるとともに、今後これらの分子に着目した研究をさらに発展させることで、有窓性調節の分子機序の全貌解明のみならず、新しいがん治療戦略への応用も展望できる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）： Fenestrated capillaries are distributed in various organs, such as the endocrine glands and small intestine. Fenestrae are about 70 nm in diameter and are organized as clusters of pores called sieve plates. Each fenestral pore is divided by a diaphragm consisting of plasmalemma vesicle-associated protein (PLVAP), a molecular component of fenestral diaphragm. They function as channels for blood and tissue trafficking of peptide hormones and other substances.

In this project, we first established a novel culture method for fenestrated endothelial cells in the anterior pituitary of rats. We also demonstrated that fibronectin-integrin 5 1 signaling regulates the formation of microtubule cytoskeletons to control the transport of PLVAP at the endothelial fenestrae. We then found that the interaction between the actin cytoskeleton and dynamin2 is essential for endothelial fenestra formation in the rat pituitary.

研究分野：内分泌形態学

キーワード：有窓型毛細血管 窓 基底膜 下垂体 細胞外マトリクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

毛細血管は内皮細胞からなる管腔の外周を基底膜と周皮細胞が裏打ちするシンプルな構造であり、物質交換の場として機能する (Stan, *J Cell Mol Med.* 2007)。また、毛細血管はその構造の違いから、連続型と有窓型に大別される。とりわけ、有窓型毛細血管は物質交換が盛んな内分泌器官や小腸などに分布し、その壁には内外の細胞膜が融合して開口した直径約 70 nm 程度の「窓」が無数に存在することで、血液 - 組織間を連絡している。この存在により、ホルモンや栄養素などの物質は迅速に各部を移動することができる。過去の報告から、窓の形成には VEGF-A やレチノイン酸の関与が指摘されているが、これらは全身性に機能する因子であることから、この他にも有窓性を調節する特異的な因子や機序が存在すると予想される。申請者はこれまでに、下垂体の前葉機能の調節に不可欠な下垂体門脈系の形成機序に関する研究を進めてきた。下垂体門脈系は門脈と有窓型毛細血管からなる特殊な血管系であり、申請者はその形成機序に関する成果を発表している (Nakakura et al. *Cell Tissue Res.* 2006; Tanaka, Nakakura et al. *Gen Comp Endocrinol.* 2013)。その一方で、毛細血管における有窓性の調節機序についてはいまだに明らかにできていない。

基底膜は IV 型コラーゲンをはじめとした多種多様な細胞外マトリックス分子からなり、その分子構成は血管型ごとで異なるとともに (Sorokin et al. *Dev Biol.* 1997) それぞれが血管系の調節因子として機能することが知られる (Thyboll et al. *Mol Cell Biol.* 2002 他)。また、細胞外マトリックスによる刺激で培養内皮細胞の有窓性が持続できることから (Milici et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985 他)、有窓型毛細血管の基底膜を構成する細胞外マトリックス因子が有窓性調節に関わっている可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究課題では毛細血管の有窓性調節と細胞外マトリックスとの関係性を明らかにすることを目的として、以下の視点から研究を展開した。

- (1) 血管基底膜を構成する主要な細胞外マトリックス因子と有窓性調節との関係性を明らかにする。
- (2) 申請者が実施したラット下垂体前葉と大脳由来の有窓型および窓のない連続型内皮細胞を対象にした比較トランスクリプトーム解析の情報を参考に、有窓型内皮細胞に高発現する細胞外マトリックス因子を選別し、毛細血管の有窓性調節における役割やその分子機序を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、ラット下垂体および大脳の組織切片と下垂体前葉の細胞分散液から Dynabeads 標識 PECAM1 抗体を用いて単離した有窓型内皮細胞(以下、下垂体内皮細胞)を実験モデルとして、以下の方法で研究を進めた。

- (1) 単離した下垂体内皮細胞を血管基底膜の主要構成因子をコートしたシャーレ上で数日間培養する。この際、アゴニストやアンタゴニストも必要に応じて培養液に添加する。培養後、PLVAP (窓マーカー) や F-アクチン、 チューブリン (微小管マーカー) その他の因子に対する蛍光免疫染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡で観察することでその細胞内分布や構造変化を調べる。さらに、内皮マーカーの遺伝子発現変化をリアルタイム PCR で解析するとともに、走査型電子顕微鏡観察により細胞表面の超微細構造を調べる。
- (2) ラット下垂体と大脳の組織切片を対象に、比較トランスクリプトーム解析で絞り込んだ有窓型内皮高発現因子の mRNA 発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法で調べ、有窓型内皮細胞に局限して発現する分子に絞り込む。
- (3) ラット下垂体と大脳の組織切片を対象に、(2) で絞り込んだ候補因子に対する特異的抗体を用いて、血管マーカー PECAM1 や基底膜マーカー IV 型コラーゲンと蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察することで有窓型毛細血管の基底膜周囲に特異的に分布する因子を探すと同時に、その局在部位を明らかにする。
- (4) 培養下垂体内皮細胞に(3)で絞り込んだ候補因子の siRNA をトランスフェクションし、PLVAP 分布の変化を蛍光免疫染色にて確認することで、候補因子の発現増減と窓形成の関係性を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) 毛細血管の有窓性と血管基底膜を構成する主要細胞外マトリックスとの関係を明らかにするため、下垂体内皮細胞をフィブロネクチン、IV 型コラーゲン、ラミニン 411 および 511 をそれぞれコートしたシャーレ上で培養し、蛍光免疫染色、リアルタイム PCR、走査型電子顕微鏡により、有窓性への影響を調べた。その結果、有窓性の維持にはフィブロネクチンが必要なことが明らかとなった (*Cell Tissue Res.* 383: 823-833. 2021)。
- (2) 下垂体内皮細胞におけるフィブロネクチンの受容機序と役割を明らかにするため、フィブロネクチンの受容体として知られるインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ に着目し、細胞生物学的に解析を

進めた。その結果、下垂体有窓型内皮細胞膜に局在するインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を介して微小管を制御し、窓を覆う隔膜の構成タンパク質 PLVAP の細胞内輸送を調節していることが明らかとなったにした (*Cell Tissue Res.* 384: 449-463. 2021)。

- (3) 窓の配向に細胞骨格の関与が想定されることから、下垂体内皮細胞を研究モデルにしてアクチンフィラメントに着目した研究を展開した。その結果、ダイナミン 2 とアクチンが協調的に機能し、窓の形成を抑制的に調節していることを見出した (*Cell Tissue Res.* 390: 441-451. 2023)。
- (4) 比較トランスクリプトーム解析および形態学的解析からコラーゲンファミリーの *Col15a1* が下垂体前葉の有窓型内皮細胞に高発現し、同タンパク質 COL15A1 が毛細血管周囲の基底膜に局在することがわかった。次に、下垂体内皮細胞を対象に *Col15a1* に対する siRNA ノックダウンを行い、*Plvap* をはじめとした各種遺伝子発現への影響について調べた。リアルタイム PCR による解析の結果、*Col15a1* のノックダウンにより *Plvap* 発現の減少がみられたことから、有窓型内皮細胞が分泌した COL15A1 が同細胞にオートクライン、パラクライン的に作用することで、*Plvap* 発現を遺伝子レベルで調節している可能性が示唆された。

本課題の遂行で得た研究成果は、毛細血管の有窓性調節における細胞外マトリックスやエンドサイトーシス調節分子との関係性および重要性を示す新知見であり、今後これらの分子に着目した研究をさらに発展させることで、有窓性調節の分子機序の全貌解明を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakakura T, Tanaka H, Suzuki T	4. 巻 390
2. 論文標題 Regulation of fenestra formation via actin-dynamin2 interaction in rat pituitary endothelial cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 441-451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-022-03685-y	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 -
1. 著者名 Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Nakakura T, Yoshida S, Hasegawa R, Takigami S	4. 巻 68
2. 論文標題 Differentiation of stem progenitor CD9/SOX2-positive cells is promoted when increased prolactin-producing and endothelial cells in the pituitary.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Reprod Dev.	6. 最初と最後の頁 278-286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2022-047.	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 -
1. 著者名 Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Nakakura T, Yoshida S, Hasegawa R, Takigami S	4. 巻 388
2. 論文標題 The multiciliated cells in Rathke's cleft express CYP26A1 and respond to retinoic acid in the pituitary.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 583-594
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-022-03614-z	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 -
1. 著者名 Shimizu T, Saito T, Aoki-Saito H, Okada S, Ikeda H, Nakakura T, Fukuda H, Arai S, Fujiwara K, Nakajima Y, Horiguchi K, Yamada S, Ishida E, Hisada T, Shuto S, Yamada M	4. 巻 36
2. 論文標題 Resolvin E3 ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance via the phosphatidylinositol-1-3-kinase/Akt signaling pathway in adipocyte.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 e22188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202100053R	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 -

1. 著者名 Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Nakakura T, Yoshida S, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S	4. 巻 156
2. 論文標題 CD9-positive cells in the intermediate lobe migrate into the anterior lobe to supply endocrine cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Histochem Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 301-313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-021-02009-5.	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 -

1. 著者名 Horiguchi K, Fujiwara K, Takeda Y, Nakakura T, Tsukada T, Yoshida S, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S	4. 巻 385
2. 論文標題 CD9-positive cells in the intermediate lobe of the pituitary gland are important supplier for prolactin-producing cells in the anterior lobe.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 713-726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-021-03460-5	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 -

1. 著者名 Horiguchi K, Yoshida S, Tsukada T, Fujiwara K, Nakakura T, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S	4. 巻 155
2. 論文標題 Cluster of differentiation (CD) 9/CD81/S100 /SOX2-positive mouse pituitary cells are adult stem/progenitor cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Histochem Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 391-404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-020-01943-0	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 -

1. 著者名 Nakakura T, Suzuki T, Horiguchi K, Tanaka H, Arisawa K, Miyashita T, Nekooki-Machida Y, Hagiwara H	4. 巻 384
2. 論文標題 Fibronectin-integrin signaling regulates PLVAP localization at endothelial fenestrae by microtubule stabilization.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 449-463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-020-03326-2	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 -

1. 著者名 中倉敬	4. 巻 47
2. 論文標題 下垂体内皮細胞におけるフィブロネクチン インテグリンシグナル系の役割 微小管を介した孔へのPLVAP 輸送調節	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 比較内分泌学	6. 最初と最後の頁 55-57
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horiguchi K, Fujiwara K, Takeda Y, Nakakura T, Tsukada T, Yoshida S, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S	4. 巻 385
2. 論文標題 CD9-positive cells in the intermediate lobe of the pituitary gland are important supplier for prolactin-producing cells in the anterior lobe.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 713-726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-021-03460-5	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 -

1. 著者名 Nakakura T, Suzuki T, Horiguchi K, Tanaka H, Arisawa K, Miyashita T, Nekooki-Machida Y, Hagiwara H	4. 巻 383
2. 論文標題 Fibronectin-integrin signaling regulates PLVAP localization at endothelial fenestrae by microtubule stabilization.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 449-463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-020-03326-2	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 -

1. 著者名 Horiguchi K, Yoshida S, Tsukada T, Fujiwara K, Nakakura T, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S	4. 巻 155
2. 論文標題 Cluster of differentiation (CD) 9/CD81/S100 /SOX2-positive mouse pituitary cells are adult stem/progenitor cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Histochem Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 391-404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-020-01943-0	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 -

1. 著者名 Nakakura T, Suzuki T, Tanaka H, Arisawa K, Miyashita T, Nekooki-Machida Y, Kurosawa T, Tega Y, Deguchi Y, Hagiwara H	4. 巻 383
2. 論文標題 Fibronectin is essential for formation of fenestrae in endothelial cells of the fenestrated capillary.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 823-833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-020-03273-y	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 -

1. 著者名 Horiguchi K, Yoshida S, Tsukada T, Nakakura T, Fujiwara K, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S	4. 巻 66
2. 論文標題 Expression and functions of cluster of differentiation 9 and 81 in rat mammary epithelial cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Reprod Dev.	6. 最初と最後の頁 515-522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-082	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 -

1. 著者名 Nemoto T, Nakakura T, Kakinuma Y	4. 巻 15
2. 論文標題 Elevated blood pressure in high-fat diet-exposed low birthweight rat offspring is most likely caused by elevated glucocorticoid levels.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PloS one	6. 最初と最後の頁 e0238223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0238223	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 -

1. 著者名 Yoshida Y, Aoki K, Fujiwara K, Nakakura T, Kawamura A, Yamada K, Ono M, Yogosawa S, Yoshida K	4. 巻 なし
2. 論文標題 The novel ciliogenesis regulator DYRK2 governs Hedgehog signaling during mouse embryogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife.	6. 最初と最後の頁 e57381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.57381.	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 -

1. 著者名 Sato M, Aoki-Saito H, Fukuda H, Ikeda H, Koga Y, Yatomi M, Tsurumaki H, Maeno T, Saito T, Nakakura T, Mori T, Yanagawa M, Abe M, Sako Y, Dobashi K, Ishizuka T, Yamada M, Shuto S, Hisada T	4. 巻 33
2. 論文標題 Resolvin E3 attenuates allergic airway inflammation via interleukin-23/interleukin-17A pathway.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 12750-12759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201900283R.	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 中倉敬, 田中秀幸, 鈴木健史
2. 発表標題 下垂体内皮細胞の有窓性調節におけるアクチンフィラメントの役割
3. 学会等名 第48回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中倉敬
2. 発表標題 下垂体門脈系の構築を調節する分子機序
3. 学会等名 日本動物学会 第93回早稲田大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中倉敬
2. 発表標題 下垂体の毛細血管に必須な「孔」の構築機序
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中倉敬, 田中秀幸, 鈴木健史, 萩原治夫
2. 発表標題 下垂体有窓型内皮細胞におけるフィブロネクチン インテグリン系の役割.
3. 学会等名 第47回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中倉敬
2. 発表標題 下垂体前葉の機能を調節する血管系の構築機序
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回 日本生理学会大会合同大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中倉敬, 鈴木健史, 堀口幸太郎, 藤原研, 塚田岳大, 萩原治夫
2. 発表標題 ラット下垂体に存在する運動線毛保有細胞の分子形態学的性質.
3. 学会等名 第93回 日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中倉敬, 鈴木健史, 萩原治夫
2. 発表標題 ラット下垂体前葉を対象にした有窓型内皮細胞の単離法の確立と培養条件の検討
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 2020年

1. 発表者名 中倉敬、鈴木健史、萩原治夫
2. 発表標題 ラット下垂体前葉に分布する有窓型内皮細胞の単離と培養系の確立
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会およびシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中倉敬、鈴木健史、萩原治夫
2. 発表標題 ラット下垂体前葉からの有窓型内皮細胞の単離と培養条件の検討
3. 学会等名 第46回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakakura T, Suzuki T, Hagiwara H.
2. 発表標題 The endocrinal signal transduction systems in the mouse corticotroph cell line AtT20 cells are finely tuned by the tubulin acetylation of microtubules.
3. 学会等名 The 19th Congress of the International Federation of Associations of Anatomists (IFAA 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------