

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03352

研究課題名(和文) 生体内細胞代謝と連動する血管内皮細胞の栄養供給調節の非侵襲・非線形生体観察

研究課題名(英文) Intravital Imaging for Nutrient Regulation in Vascular Endothelial Cells  
Interconnected with Local Cells Metabolism

研究代表者

本藏 直樹 (Honkura, Naoki)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40518081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：生体内唯一の栄養循環路である血管を介した物質交換を直接顕微鏡観察することで、生体内細胞活動を計測することを試みた。まず全身の血管内皮細胞に特異的なカルシウムセンサーを発現するマウスを作製し、血中内物質の変動に応じた血管内皮細胞の機能変動を計測した。その結果、血管内皮細胞は静的条件下でも分枝ごとに機能調節をおこなっていること、また血中内物質の変動に応じてその活動パターンに変動を起こすことが、生体イメージングとTGマウスの組み合わせで明らかになってきた。これに加えて、全身の細胞でカルシウムセンサーを発現するマウスも作製し、血管近傍の細胞代謝活動が変化することも合わせて計測することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非侵襲生体光イメージング技術を駆使することで、哺乳動物の生体反応を単一血管、単一細胞ごとに計測することが出来る画期的な方法論を構築した。これにより、いつ・どこで・どのように栄養素が分配され、組織を構成する細胞の活動レベルやその生死が制御されているのかを計測可能となってきた。また生体唯一の物資連絡路の調節機構の一端の解明により、特定の細胞に生体物質を優先に配給するなどの基礎情報とともに、人為的方法論との組み合わせにより、特定生体機能を増強することや、がん細胞の多い場所のみに薬剤を供給すること、エネルギー消費の違いから、がん領域を単一細胞レベルで境界領域を決定なども視野に入ってくると想定している。

研究成果の概要(英文)：We aimed to measure in vivo cellular activity by directly observing substance exchange through blood vessels, the only pathway to nutrient circulation in our body. To achieve this, we generated mice expressing a calcium sensor specific to vascular endothelial cells throughout the body. We then measured the functional changes in these endothelial cells in response to fluctuations in blood substances. Our results, obtained through live imaging and the use of transgenic mice, revealed that vascular endothelial cells regulate their functions even under static conditions, with variations occurring at different branches. Furthermore, these cells exhibit changes in activity patterns in response to fluctuations in blood substances. Additionally, we created mice expressing a calcium sensor in all body cells, successfully measuring changes in the metabolic activity of cells near blood vessels.

研究分野：血管生理学

キーワード：血管生理学 非線形光学顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

### ○物質交換の場、微小循環とは？

1920年にノーベル生理学賞を受賞したアウグスト・クログの研究により、毛細血管で酸素や栄養供給がおこなわれ、また不要となった老廃物や二酸化炭素が引き取られることが発見された。この研究は、その当時革新的な先進計測機器である血中微細ガス検出のための装置、マイクロマンノメーターによって動脈・静脈から採血した血液のガス濃度などを検出し比較することで得られた結論である。また発表されてから100年以上が経過するスターリングの物質交換仮説は、いまだに実証実験は示されていなかった(申請者により仮説を否定)。スターリング・クログの研究以降、血管透過性の実証実験により巨大分子の漏出場所の特定などが調べられてきた(Michel CC '99)。しかし当時は、ラベルした巨大分子の漏出場所をたった1枚の固定したサンプルの低解像顕微画像、もしくは狭視野電顕画像から識別するのみで、血管密度の高さおよびラベル分子の拡散が生じるため困難を極めた。このため物質供給は、(毛細血管後)細静脈のみで起こると推定された(McDonald DM '94, Dejana E '09)。これらの結論は、有効な技術および方法論の欠落により推論でしかなかった。このためクログの研究から100年経過した現在でも、微小循環の”いつ・どこで・どのような血管を介して物質交換がおこなわれているのか？”また特に時空間的に制御されるその調節機構の詳細に関して、いまだに未知であった。そのため物質交換の機構の本質を、細かな時空間分解能を伴って、単一細胞および物質の動きを正確に計測・解析することは、極めて重要である。そこで申請者は、新規非侵襲生体光イメージング技術を開発し、血管を介した物質交換のメカニズムの解明を目指してきた(Nat Commun '18)。

この100年の論争に終止符を打つために、申請者は新規の非線形光学顕微鏡注を開発し、非侵襲生体光イメージング技術と生体高速画像取得を組み合わせることで、世界で初めてライブで、物質の供給場所を可視化することに成功した。その結果、動脈および毛細血管前半部は強固なタイトジャンクション(TJ)が形成され一切の漏れがないこと、またそのタイトジャンクションの形成の弱まりが毛細血管中間部から下流にかけておこり、最終的に毛細血管後半部で消失することを示し、弱まりが始まる中間部以降から物質の漏れが生じることを最終的に見いだした(図1)。さらに、血管に隣接した組織細胞から放出されるシグナル分子(VEGF, Histamine など)により、血管から組織への物質(蛍光ラベル分子)供給が調整されていることを発見した。このことは、隣接した細胞の活動レベルに応じて、血管が供給する栄養量の調節を動的に制御していることを強く示唆する。これらのことより、“いつ・どこで・どのように”栄養供給がおこなわれるかを明示し、その上で生体組織内の単一細胞代謝を直接モニターし、栄養供給と細胞生理学を直接結びつける研究を提案したい。

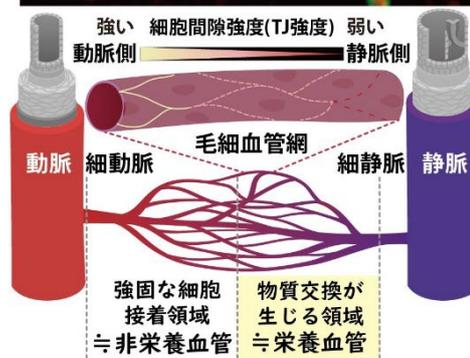
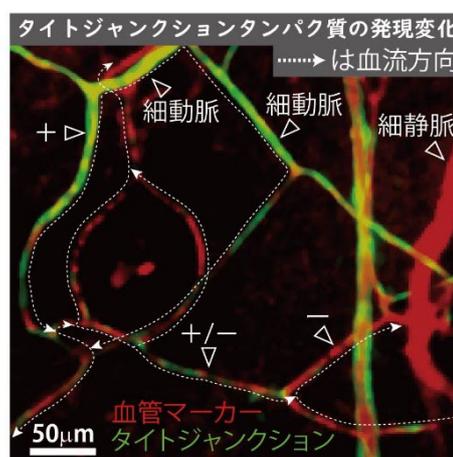


図1:毛細血管の細胞間隙TJ強度に依存した物質放出の場

## 2. 研究の目的

### ○生体内細胞代謝と連動する血管内皮細胞の栄養供給調節の非侵襲・非線形生体観察

生き物は食物を摂取することで栄養素を補給し生命を維持している。その吸収した栄養素を、全身に存在する細胞へ隈無く、また適切に運搬することが必須である。これを一手に担っているのが生体で唯一の物質輸送路、血管のネットワークである。すなわち血管を介した物質のやり取りが生命維持機構の根幹となり、それが崩壊すると個体の死を招く。本研究では、生体内の血管および組織を可視化し、血管からどのように栄養素が組織内の細胞に輸送され、その輸送の結果、変動する代謝活動を単一細胞ごとに計測する。これによって“いつ・どこで・どのように”エネルギーが消費され、細胞機能がどのように変動するのかを解明し、栄養供給と生体細胞生理学を直接結びつける研究を提案する。

### 3. 研究の方法

生体組織に存在する細胞の活動維持を一手に担っている栄養供給が、どのようなメカニズムで運用されているのかを証明することは、細胞レベルの生命維持機構を理解するための本質である。これを正確に捉えるために、以下の研究方法で遂行する。まず物質交換の機構を正確に記述するためには人工的環境ではなく、自然な血流が存在する状態、すなわち生きたままの動物を非侵襲で計測する実験系を用い、真の血管機能を計測することは必須である。しかしながらこしでも組織侵襲があれば容易に出血がおこるため、このことよりこれまで分子・細胞レベルの解像を持って真の物質交換を見極めることはほぼ不可能であった。これを克服するために、申請者が筆頭および責任著者として新規に確立した非侵襲生体光イメージング技術は、一切の出血およびその他侵襲が生じない利点を有するため、完全オリジナル非線形光学顕微鏡をもちいることで、局所の栄養交換および局所環境が同時に計測をおこなう。またこの際、局所の細胞活動をモニターするために、本研究提案にて作成する遺伝子組換え動物を組み合わせることで、血管内皮細胞の活動、局所組織細胞の活動を生体内部で正確に計測する。

### 4. 研究成果

#### (1) マウス作出

血管およびその近傍の活動を捉えるためのプローブとして最新（2019年当時）のカルシウムセンサー（jGCaMP7s, Nature Neuroscience 2019）を用いて、広いダイナミックレンジを持ちながら、低カルシウム濃度でも検出できるS型のセンサーを選択した。その配列にFlox配列を附加することで、CREタンパク質特異的な遺伝子発現調節を可能とした。特に本研究では、DIOベクターと呼ばれるFlox配列を目的遺伝子を挟み込んだ配列を人工合成遺伝子法にて作出した。これによって目的の遺伝子が「Double-floxed with Inverted Orientation」、すなわちCREタンパク質の作用で遺伝子組換えが起こり、目的の配列がドライブされる配列を作成した。これをまずCREの作用にてjGCaMP7sが発現するのか培養細胞で確認し、その後動物作出をCRISPR-Cas9法を用いて、ゲノムセーフハーバーであるROSA26領域へ導入した。このマウスをバッククロスすることで、CRISPR-Cas9法による不特異遺伝子挿入を無効化した。またこの際今後の生体イメージングのことを考慮して、アルビノB6マウスと掛け合わせ、イメージに影響を与える色素フリーのマウスへと転換をおこなった。

血管内皮細胞特異的な遺伝子発現を誘導するためにTie2-CREトランスジェニックマウスを導入し、新規に作成したカルシウムセンサーTG動物と掛け合わせることで、生体血管内皮細胞にのみカルシウムセンサーが発現するマウスの作出にも成功した。現在記載以外のCREラインもそろえているため、今後様々な細胞発現にカルシウムセンサーが発現するマウスラインが構築できる状況になっている。

カルシウムセンサー自体はCAGプロモーター配下となっているため、多くの細胞で強い発現が見込まれる。これとTie2-Creは受精卵で遺伝子組換えを起こさせることが、可能なためジャームラインに変異を入れることで、次世代からCRE不要でカルシウムセンサーが発現するマウスを作出することが出来た。これにより様々な細胞で血流変化や血管を介した物質交換と近傍細胞との情報伝達を可視化することが可能なモデル動物を作出した。

#### (2) 生体観測

これまで構築してきた非線形光学顕微鏡に加えて、時間相関単一光子計数法を組み合わせることで、局所の代謝活動に応じて変動するpHを捉えるための生体イメージング装置に組み替えた。

その結果、生体イメージをおこないながら局所環境の変動を捉えるための、顕微鏡を手にした。これと先に作出したTGマウスを組み合わせることで、血流変化と血管内皮細胞の活動、局所環境の変動、さらには局所環境に存在する細胞活動を取得することが可能となった。はじめに血管内皮細胞の静的な活動を明らかにするために、血管内皮細胞のみにカルシウムセンサーを発現したマウスをTie2-creマウスと、DIO-jGCaMP7sマウスを掛け合わせて作出した。その後そのマウスの耳の真皮の血管を鮮明に可視化するために、TRITC-Dextran2000kdaを尾静脈注射し、機能的な循環路の生体観察をおこなった。またその際赤色で血流変化を計測し、また緑色で細胞内カルシウム濃度を検出し、血流変動や静的な活動を計測した。その結果これまでほとんど知られていなかった、血管内皮細胞の活動が明らかとなり、その活動パターンは驚くべきことに分枝ごとに機能単位を持っていることが明らかとなった。また血流変化に

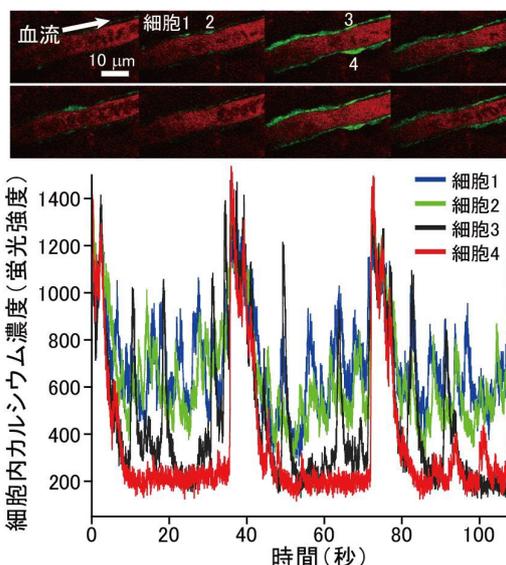


図2: 血管細胞の厳密な周期的カルシウム変動

応じて、その活動パターンも変動すること、さらには活動パターンの表現型により、血管拡張もしくは収縮が生じることも計測されている。すなわち劇的な刺激入力など無くとも、微小血管網は常に活動しており、その活動の時空間パターンも多用であることが判明した (図2)。さらにその詳細を探るために組織内に炎症物質 (histamine)、血管成長因子 (VEGF)、運動代謝物質 (乳酸など) を、微小ガラス電極を用いて微量注入することで、生体内局所環境を人為的に変動させ、その際生じる生体応答を先述のカルシウムセンサー発現血管内皮細胞を非線形生体光学顕微鏡にて捕らえることに成功した。その結果、局所環境で発生したシグナルは、血管内皮細胞のギャップ結合を介して情報伝達をおこなっていることを計測でき、またそれはシグナルの種類によって伝達の範囲が異なる様子を捕らえることに成功しつつある。これに加えて血管での情報伝達と、近傍の細胞活動との連動を切り分けながら計測できる研究も継続しておこなっている。これらの結果まとめると、血管内皮細胞の活動は、血流変化に非常に繊細に、また局所環境の変動にも敏感に素速く反応し、組織への物質交換を調整していると考えられる結果を得ている。これをさらに促進させることで、生体内の単一細胞の活動パターンと血流調節などが網羅的に解明できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mochizuki Liina, Sano Hideto, Honkura Naoki, Masumoto Kazuma, Urano Tetsumei, Suzuki Yuko	4. 巻 123
2. 論文標題 Visualization of Domain- and Concentration-Dependent Impact of Thrombomodulin on Differential Regulation of Coagulation and Fibrinolysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 016 ~ 026
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0042-1757407	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 Mathews Nitty Skariah, Suzuki Yuko, Honkura Naoki, Sano Hideto, Iwashita Toshihide, Urano Tetsumei	4. 巻 210
2. 論文標題 Pre-administration of a carboxypeptidase inhibitor enhances tPA-induced thrombolysis in mouse microthrombi: Evidence from intravital imaging analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 78 ~ 86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.thromres.2021.12.031	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 Ito Tae, Suzuki Yuko, Sano Hideto, Honkura Naoki, Castellino Francis J., Urano Tetsumei	4. 巻 122
2. 論文標題 Demonstration of Three Distinct High-Molecular-Weight Complexes between Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 and Tissue-Type Plasminogen Activator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 336 ~ 343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/a-1508-7919	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10件（うち招待講演 7件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Naoki Honkura
2. 発表標題 Multidimensional nano-scale analyses for in vivo vascular cells
3. 学会等名 The 101st Annual Meeting of The Physiological Society of Japan（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 本藏直樹
2. 発表標題 生体組織連続反応を捉えるための顕微技術の開発と応用
3. 学会等名 第8回 血管生物医学会 若手研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本藏 直樹 , 諸岡 七美
2. 発表標題 生体微小循環の機能を捉えるための高速可視化技術とその生理学研究
3. 学会等名 第30回日本血管生物医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本藏直樹
2. 発表標題 生体内タンパク質の超高速立体構造変動検出のための新論
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本藏直樹 , 諸岡七美 , 浦野哲盟 , 鈴木優子
2. 発表標題 血管を介した物質交換の生体多次元ナノ計測
3. 学会等名 第69回 中部日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本藏直樹
2. 発表標題 量子光学を巧みに用いた生体研究
3. 学会等名 第7回 血管生物医学会 若手研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本藏直樹
2. 発表標題 血管物質交換によって駆動される生体内細胞活動の定量イメージング解析
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本藏直樹
2. 発表標題 非線形光学顕微鏡を用いた生体血流イメージング
3. 学会等名 第46回 レーザ顕微鏡研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本藏直樹
2. 発表標題 生命を司る血液循環の定量生体イメージング解析
3. 学会等名 第64回 日本神経化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本藏直樹
2. 発表標題 生体細胞代謝に関する血管物質交換の定量生体イメージング解析
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 本藏直樹	4. 発行年 2024年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 372
3. 書名 量子生命科学ハンドブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap <a href="https://researchmap.jp/pon">https://researchmap.jp/pon</a>
--

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
研究分担者	鈴木 優子  (Suzuki Yuko)  (20345812)	浜松医科大学・医学部・教授    (13802)	

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