

「高次血管網の形成を制御する微小環境ダイナミクス」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：木戸屋 浩康

1. 研究のねらい

書籍などに記されている血管形成の模式図には、血管内皮細胞が連なった管が VEGF などの血管新生誘導因子による刺激に応じて伸長するという単純な概念が描かれている。それらの模式図は、生体組織内における血管形成が、微小環境の多様な分子・細胞群との相互作用によって制御されるシステムにて進行するという観点を欠いている。さらに血管が、複雑に分岐する多数の管が集合する「血管組織」として構築されている、という生体内の状況を反映していない。生体内で進行する真の血管形成過程を理解するためには、血管組織という観点から組織微小環境に存在する多細胞間の相互作用の解析が求められる。

申請者はこれまでに、組織環境に適応した多様な血管構造が作り出されるメカニズムと、その結果として生み出される多才な機能に注目して研究を行ってきた。その過程で、組織微小環境の細胞群によって制御される血管網の形成過程を理解するためには、生体組織内における解析を行う必要性を感じた。そこで、血管イメージングマウスの作成と、多光子顕微鏡を用いた生体内イメージング系の確立に取り組み、長期間にわたる観察を世界に先駆けて可能にした。この解析系を用いることで観察された血管の形成過程は予想を超えてダイナミックであり、うごめくように支配領域を拡大していた。特に次の2つの点が特徴的であった。

1. 既存の血管から新たな血管の芽が生える「発芽」と伸長が、至る所で様々な方向に向かって乱雑に起こる様子が認められた。この血管発芽の過程は、VEGF などの分泌因子の濃度勾配による誘導という従来の考え方では説明することができず、周辺の微小環境が生み出す複合的な作用の存在が示唆された。

2. 一部の血管は、管腔構造を保ったまま水平方向へと移動しており、その結果として血管網の構造変化が起きていた。この現象は、我々が血管の発生過程で発見した「血管束移動」と名付けた現象 (Kidoya H. Dev Cell. 2015) に類似しており、血管構造の多様性を生み出す一因と考えられる。

生体内でダイナミックに進行する血管形成過程の解析には技術的な障壁が存在していたが、申請者が構築した生体内イメージング解析系はブラックボックスの解明を可能とする。本研究では、生体内の血管形成過程を時間空間的に包括して解析することで、多様な細胞や環境変化が血管組織の形成に及ぼす影響を明らかにする。

2. 研究成果

(1) 概要

生体内の隅々にまで張り巡らされている血管網は、複雑な分岐を繰り返すことで組織に適した高次構造を形成して組織の機能を支えている。このような複雑な血管構造がどのように形成されるかを知るため、本研究では生体内イメージングという新しい観察技術を活用することで解析を進めた。生体内イメージング解析にて観察された血管形成過程は、過去の研究にて示されているような単純なものではなく、血管がランダムに発芽して蠢くように支配領域を拡大していた。この結果から、血管の複雑な構造は周囲の多様な細胞群や環境因子による制御を受けていると考えた。

この考えに基づき、血管形成の最初のステップである新規血管の「発芽と伸長」に組織の硬さが与える影響について検討を進めた。圧縮弾性率の異なる環境下で培養組織や培養細胞を用いて血管形成への影響を検討したところ、血管の発芽を誘導するには適切な組織の硬さが必要であることが明らかになった。

次に、血管の高次構造を形作るメカニズムの解析を進めた。我々のこれまでの解析から、血管が組織内を移動することで高次構造を変化させるという現象が確認できており、血管束移動と名付けている。この血管束移動の制御メカニズムについて解析を進めたところ、これまでに報告されていない新たな好中球サブセットが関与していることを発見した。そこで、このサブセットを血管制御好中球と名付け、血管束移動を制御する分子機構の解析を進めた。血管制御好中球が特徴的に産生する分子を遺伝子発現解析から探索した結果、いくつかの候補分子が同定された。さらに、その際の血管内皮細胞における遺伝子発現解析を行うことで、関連するシグナルの候補を同定することができている。また、血管制御好中球を生体内で可視化できるイメージングマウスを作成して 2 光子励起顕微鏡にて観察を行った。以上のように、複雑な血管の高次構造の形成に働く細胞や因子が本研究によって明らかになった。

(2) 詳細

<課題1>血管発芽起点を規定する複合的システムの解明

血管発芽の形成は、重要分子とされている VEGF の濃度勾配による単純な機構のみでは説明できないことが、VEGF の免疫染色解析などによって示されている。そこで、組織の硬さが生み出す物理的な力が血管の発芽に影響を与えていると考え解析を進めた。

血管の発芽を *In vitro* の培養系にて解析するため、マウスから大動脈を回収してコラーゲングル内で培養することで血管形成の誘導が可能な大動脈リングアッセイの系を構築した。この系において、大動脈リングを弾性率の異なるコラーゲングル内にて培養し、硬さが血管発芽に与える影響を検討した。その結果、圧縮弾性率が 12kPa をピークに血管の形成が最も盛んに起きることが観察され、それよりも圧縮弾性率が低い場合でも高い場合でも形成される血管数が減少することが解った(図1)。この結果から、血管周辺の適切な硬さが血管発芽と伸長を引き起こすために重要であることが明らかになった。この結果を基に、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を圧縮弾性率が 15kPa に調整したコラーゲングル内で培養したところ、自立的に管腔構造を持つ 3 次元的な血管構造体を構築することができた。同様なことが様々な組織に由来する血管内皮細胞に共通しているかを調べるため、ヒトの肺微小血管、肺

動脈、腎糸球体血管、脳微小血管、冠動脈、心微小血管、伏在静脈の血管内皮細胞を用いて同様の解析を行ったところ、それぞれに若干の違いはあるものの概ね圧縮弾性率が 10-20kPa のコラーゲンゲルにて血管構造が構築された。これらの結果から、「組織の硬さ」が血管の発芽・伸長や管腔形成の誘導するための重要な要素であることが明らかになった。

次に、生体組織内においても同様に硬さが血管発芽に関わることを示すため、組織の硬さを決める要因となるコラーゲンに注目し、コラーゲンを産生する線維芽細胞の動態が血管の発芽・伸長に影響を与えるかを検討することにした。繊維芽細胞の生体内イメージング解析を行うため、繊維芽細胞のイメージングマウス(Coll α 2 プロモーター-GFP マウス、PDGFR α プロモーター-GFP マウス)をそれぞれ RIKEN BRC から導入し、血管イメージングマウス(Apelin TdTomato マウス)との掛け合わせを行った。このマウスの頭蓋に観察窓を設置し、多光子レーザー顕微鏡にて生体内イメージング解析を行ったが、Coll α 2 プロモーター-GFP マウスでは不特定多数の細胞に GFP の蛍光が認められ、PDGFR α プロモーター-GFP マウスでは全く GFP の蛍光が認められなかった。原因は不明であるが、これらのイメージングマウスでは繊維芽細胞の動態を観察することは不可能であると考え、コラーゲン自体のイメージング系を用いることに変更した。コラーゲンのイメージングについては、藤原裕展(CEST 研究代表・多細胞領域・理化学研究所)が作成した Collagen TypeIV-GFP マウスを供与して頂き、血管イメージングマウス(Apelin TdTomato マウス)との掛け合わせを行った。このマウスの大脳表層部に腫瘍組織を形成させてイメージング解析を行うことで、血管を被覆する Collagen TypeIV の変遷を GFP の蛍光を指標として経時的な動態観察が可能となっている。現在は、撮影した動画から血管発芽と Collagen TypeIV の関連性について解析を進めている。

<課題2>血管束移動を制御する細胞システムの解明

血管構造に多様性をもたらす「血管束移動」の過程は、血管近傍に動員された特殊な「血管制御好中球」により制御されていることが明らかになっている。本課題では、血管制御好中球が血管近傍に動員される分子機構および、血管束移動を誘導する分子機構の解明に取り組んだ。

次に、組織内で血管制御好中球が血管束移動を誘導する一連の過程を明示するため、血管制御好中球を可視化するイメージングマウスの作成に着手した。

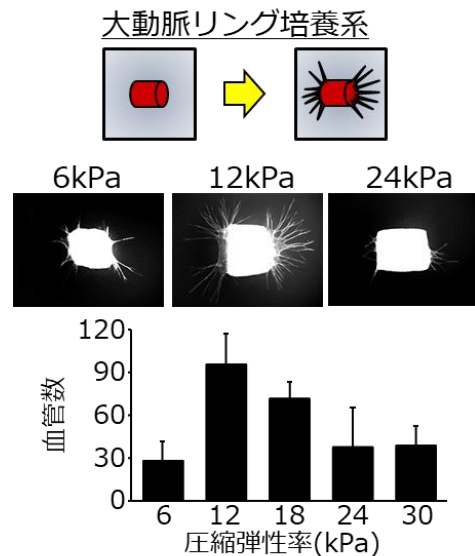


図1. 硬さが血管発芽に与える影響
大動脈リングを弾性率の異なるゲル培養したところ、12kPaのゲルをピークとして弾性率による血管形成の増減が認められた。

3. 今後の展開

本研究の成果から、血管の高次構造の形成には組織微小環境に存在する細胞群の相互作用の重要性が示された。さらには、細胞外基質による「場」など、近年のシングルセルオミクスや生体内イメージングでは注目されていなかった要素の重要性も示された。本研究の今後の展開について、各研究項目に分けて以下に記載する。

<課題1>血管発芽起点を規定する複合的システムの解明

血管発芽の形成における組織微小環境の役割に着目し、特に組織の硬さを生み出す細胞外基質の解析を進めた。その結果、従来から血管新生に重要であることが示されている VEGF だけでは発芽を誘導することができず、そこには適度な硬さの「場」が必要であることが *in vitro* の解析から明らかとなった。生体組織内での解析は、イメージングマウスの作成が思うように進まずに研究期間中に結果を示すことができなかったが、ようやく確立した Collagen TypeIV-GFP マウスを用いた系で解析を進めていきたい。

<課題2>血管束移動を制御する細胞システムの解明

血管の高次構造の形成過程で起きる「血管束移動」と名付けた現象を制御する細胞・分子メカニズムの解析を進め、関連する細胞である血管制御好中球と誘導分子を同定することができた。これらは組織の形成過程以外にも関与している可能性が高く、血管束移動の制御による疾患治療法の標的候補となると考えられ、今後は治療薬の開発に向けた研究を展開する予定である。

また、好中球においてもマクロファージのような多様性を示す可能性が示されたことから、血管制御好中球が分化系譜に関する研究も展開していく。その結果から、血管制御好中球に限らず、多彩な機能を持つ好中球の存在を明らかにし、新たな研究領域を開拓していきたい。

4. 自己評価

本研究では、組織微小環境に存在する多様な細胞や因子がどのような相互作用を示すことで血管の高次構造が形成されるかを解析した。その結果、血管の発芽に及ぼす「場」の硬さによる物理的作用の重要性や、血管構造変化を制御する新たな細胞サブセットや分子を同定することができた。特に、申請書が構築した生体内イメージング観察系を発展させ活用することで、これまで観察されることのなかった血管束移動というダイナミクスを示せた点は、血管研究分野および関連分野における大きな進捗であったと思われる。

研究を進めるに当たっては、同領域のさきがけ研究員である大阪大学・橋本昌和准教授や徳島大学・高岡勝吉准教授と連携することで、各種遺伝子改変マウスを効率よく作成することができた。また、本研究では最先端のイメージング機器を改造して駆使するため、設備備品費の多くはその費用にあてている。また、血管制御好中球の解析および回収に必須となるセルソーターを購入することで、効率よく研究を進めることができた。

本研究の成果は、組織が血管新生に依存せずとも移動させることで血管を獲得できるという新たな概念を創出した。さらに、血管束移動の制御機構を解明したことから、医療応用に向けて促進や阻害の可能性を広げることができた。

また、本さきがけ研究の成果が認められ、福井大学学術研究院医学系部門にて教授として採用されて血管統御学教室という独立した研究室を立ち上げることができた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:7件

1. Jia W, Kong L, Kidoya H, Naito H, Muramatsu F, Hayashi Y, Hsieh HY, Yamakawa D, Hsu DK, Liu FT, Takakura N. Indispensable role of Galectin-3 in promoting quiescence of hematopoietic stem cells. *Nat Commun.* 2021, 12, 2118.

成熟個体において、造血幹細胞は骨髄中の特殊な血管が構築するニッチに存在し、分化や増殖が厳密に制御されている。本研究では、ニッチとなる骨髄血管が造血幹細胞とどのような相互作用を行っているかの研究を進めた。その結果、骨髄血管の一部がニッチ型に変化して Angiopoietin1などのアンジオクラインファクターを産生することで、造血幹細胞における galectin-3 の発現を誘導して静止状態に誘導することが明らかとなった。

2. Tsukada Y, Muramatsu F, Hayashi Y, Inagaki C, Su H, Iba T, Kidoya H, Takakura N. An in vivo model allowing continuous observation of human vascular formation in the same animal over time. *Sci Rep.* 2021, 11, 745.

本研究では、生体組織内における血管形成の過程を長時間に渡って観察するための生体内イメージング解析系を構築した。確立したイメージング系では、腫瘍組織をマウスの大脳表層部に移植して観察窓を設置し、二光子顕微鏡を用いることで最大 72 時間に及ぶ撮影が可能となった。さらに、このモデルを用いて VEGF 拮抗剤が腫瘍血管にどのような作用を示しているかを解析し、VEGF の阻害が腫瘍血管の崩壊を誘導するという実態を明らかにした。

3. Kidoya H, Muramatsu F, Shimamura T, Jia W, Satoh T, Hayashi Y, Naito H, Kunisaki Y, Arai F, Seki M, Suzuki Y, Osawa T, Akira S, Takakura N. Regnase-1-mediated post-transcriptional regulation is essential for hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis. *Nat Commun.* 2019, 10, 1072.

本研究では、がんの進展に伴う血管機能の変化が微小環境の細胞群に及ぼす影響の解析を行った。正常状態においては、造血幹細胞は骨髄血管が構築するニッチによるシグナルを受けることで、過剰な分化や増殖が起きないように制御されている。しかしながら、血液のがんである白血病を発症すると、骨髄の血管は構造の異常化を起こすのみならず、アンジオクラインファクターの再生プロファイルを変化させることで造血幹細胞の Regnase-1 を活性化させ、異常な分化・増殖が促進されることを明らかにした。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0 件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞

第 38 回日本癌学会奨励賞、2019

令和元年度大阪大学賞、若手教員部門、2019

学会発表など

時空間的生体内イメージング解析が示す真の腫瘍血管形成過程、木戸屋 浩康、

第 93 回日本生化学会大会、シンポジウム、2020 年

革新的イメージング技術が解き明かす新しい血管機能、木戸屋 浩康、

第 44 回日本分子生物学会年会、ワークショップ企画と講演、2021 年

生体内イメージング技術が解明する腫瘍微小環境のダイナミズム、木戸屋 浩康、

第 65 回日本口腔科学会中部地方部会学術集会、特別講演、2022 年 10 月 2 日