

研究報告書

「血流による血管ネットワークの制御と再現」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 佐藤 有紀

1. 研究のねらい

血管は、中枢から末梢へ向かって分岐を繰り返し、末梢部では細かい網目状のネットワークを形成している。中枢の太い血管から末梢血管まで、血流量に対応した階層的な循環網と役割分担が確立されている。毛細血管は、損傷を受けてもすぐに再生あるいは迂回路を作ることができる。その一方で、このような末梢血管の可塑性こそが、腫瘍近傍に新たに血管を呼び込むことにつながり、ガン細胞の増殖・浸潤の危険性を高める要因となっている。また、近年の実現可能性が高まりつつある組織の再建研究では、培養条件下の未熟な組織に機能的な血管網をいかにして呼び込むかが重要な課題である。このような背景から、血管形成の制御に直結する研究・技術開発への要請は高い。からだの広域にわたる血管パターンの階層性は、血流循環を介して中央集権的に制御される可能性が高い。このため、形成途中の血管に対する血流操作は血管ネットワークを人為的に制御する有効なアプローチであることが期待されるが、その方法論は確立されていない。本研究では、ウズラ胚血管網への高いアクセシビリティを利用し、生体内の血流を実験的に操作することによって、血管形成のしくみを理解する。血流の構成的変化(流量・速度等)と血管内皮細胞の挙動との相関について、イメージング・定量解析から基礎的な知見を積み上げ、血流の役割を詳細にする。これをもとに、血管パターンを変えうる必要十分な要素を導きだし、血流操作による血管ネットワークの形成制御を試みる。本研究を通じて、実際の生体内において血管ネットワーク形成を自在に操ることができるモデルシステムを確立する。

2. 研究成果

(1)概要

本研究では、血管内皮細胞を可視化できるトランスジェニックウズラ胚に第2の心臓(マイクロポンプ)を取り付け、生体内における血流操作を試みた。マイクロポンプを通じてウズラ胚の血管内へ灌流させる血流量・血球数などの要素を変化させ、血管内皮細胞の挙動のタイムラプス観察、定量化を行った。その結果、血流の速さに応じて血管内皮細胞が移動速度および方向を変化させることを明らかにした。また、細い血管から太い血管へのリモデリング過程を血流が制御することがわかった。さらに血管の脈動が空間伸縮刺激として作用し、細胞外基質のフィブロネクチン(FN)の分布パターンを制御することを発見した。この発見をもとに、FNの全く新しいパターンニング機構およびその生物学的意義を解明した。本研究を通じて、血流が血管内皮細胞のみならず、その外側に位置する細胞外基質にもメカニカルストレスとして作用することが明らかとなり、血管と周辺組織の形態形成のカップリング機構の解明に繋がった。

(2) 詳細

研究テーマ A「血管内皮細胞挙動における血流の役割の解明」

卵殻外で培養したウズラ胚の背側大動脈をマイクロシリンジポンプと連結させ、外部からウズラの血液を灌流させる実験システムを構築した。さらに、灌流させた血球細胞と血管内皮細胞の双方を可視化する為、全細胞を可視化できる PGK:H2B-mCherry トランスジェニックウズラ胚から血液を採取し、血管内皮細胞を特異的に可視化する Tie1:H2B-EYFP トランスジェニックウズラ胚へ輸血する手法を確立した。これにより、血管内皮細胞と血球細胞の双方の可視化に成功した。この方法を用いて、血球量を増大させ血流停滞を引き起こす操作を行い、血流停滞が血管内皮細胞の移動停止を引き起こすことを明らかにした(図1)。さらに光刺激による血栓誘導実験を行い、血流が全くない状況下の血管内皮細胞挙動を詳細にした。これらの血流操作実験から、血流存在下の血管内皮細胞は上流に向かって移動し、その結果、上流に位置する血管ほど多くの血管内皮細胞の寄与を受けて太くなること、一方で血流量が低下した領域は太い血管を維持することができず、毛細血管を形成することがわかった(論文投稿準備中)。

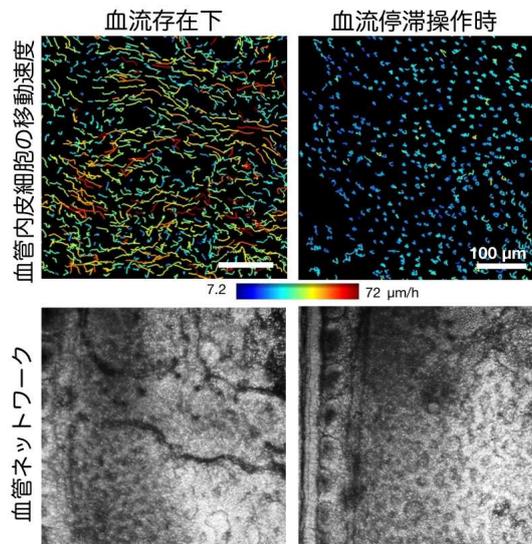


図1 血流操作時の細胞挙動と血管形成への影響

研究テーマ B「脈動ストレスによる細胞外マトリクス制御」

心臓に近い位置に形成される背側大動脈の近傍の空間がどのような分子機構により支持されるのかを明らかにする為、細胞外マトリクスのフィブロネクチン(FN)に着目し、詳細な解析を行った。FNは背側大動脈の側方空間に「ピラー(柱)」様に蓄積し、背側大動脈の周囲の組織群(体節中胚葉と内胚葉)を架橋することを発見した。ピラー様のFN構造体形成には、体節細胞から伸長する長い糸状仮足のインテグリン受容体および細胞内のアダプタータンパク質 Talin を介して起こることを明らかにした。FNの繊維化および束化には、「力」によるFNの unfolding が必須のステップであることから、背側大動脈の脈動に起因する空間伸縮ストレスがピラー形成に作用すると仮定し、検証を試みた。上記の血栓誘導システムを利用して解析を行った結果、血管の脈動が空間伸縮刺激として作用してFNピラーが維持されることが分かった(図2)。さらに、本研究で初めて存在を証明したFNピラー形成に関わる糸状仮足が、分泌

性シグナル分子 Sonic hedgehog (Shh)の伝播にも関わる可能性を示した。これらの成果をもとに、組織構築過程における空間伸縮ストレスの新しい役割を明らかにした(Sato et al.,

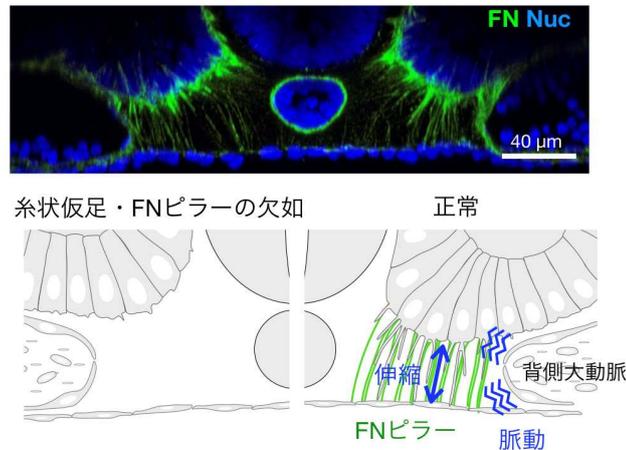


図2 脈動による空間伸縮ストレスがFNピラー形成に関わる

(Development, in press)。

3. 今後の展開

(研究テーマ A の発展)心拍に起因する血液の脈流が血管ネットワーク形成に及ぼす影響を明らかにする為、脈流制御実験を行う。シリンジポンプとピンチバルブを組合せ、血液に脈を付ける灌流システムを構築し、ウズラ胚へ連結する。定常流の場合と脈動制御時とで血管内皮細胞挙動を比較し、脈動の有無や間隔が血管形成に果たす役割を理解する。また、血流が順・逆行を周期的に繰り返す灌流システムを構築する。この実験系を用いて、血流方向変化に対する血管内皮細胞の応答時間を明らかにし、血流の向きを感知する分子機構解明の糸口を得る。

(研究テーマ B の発展)血管脈動による空間伸縮ストレスの生物学的意義をより詳細に理解する為、血管の脈動を模した動きを起こすマイクロデバイスを作製し、ウズラ胚へ取り付けて形態形成への影響を調べる。これにより、反復的空間伸縮ストレスの役割および細胞応答の分子機構を明らかにしていきたい。

4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

・研究目的の達成状況

研究期間中に米国の共同研究者から血球を可視化できるトランスジェニックウズラ系統を入手できた為、生体に近い条件で血球と血管内皮細胞の多色イメージング解析を実施でき、当初計画以上に精緻な実験システムを構築できた。これを用いて血流操作下における血管内皮細胞挙動の定量データを得ることができ、目的を達成できた(研究テーマ A)。今後は血管パターンニング過程のシミュレーション実験を行い、数理的なアプローチからも仮説を検証する。本研究を進める中で脈流の重要性が浮上してきた為、脈動ストレスによる細胞外マトリクス制御

の課題(研究テーマ B)にも取り組むことができ、論文発表までこぎ着くことができた。

・研究の進め方

研究期間を通じてテクニカルスタッフ 1 名を雇用し、研究を円滑に推進することができた。所属先の異動に伴い、動物飼育施設の新設や実験設備の移設などの為、実験がストップする期間が発生したが、研究費の増額措置を受けることができた為、予算不足で研究が停滞することがなかった。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

本研究成果が起点となり、メカノバイオロジーの観点からの組織形態形成機構の解明が進むことを期待している。また本研究は、培養条件下での再建組織内への血管誘導技術の開発や、血管腫の発症メカニズム解明への応用を強く意識し、生体内血流操作モデルの確立に挑んだ。血流に応答する細胞挙動を数値化できることが大きなメリットである為、創薬標的分子の同定・評価等に利用可能なモデルシステムとしての普及も考えている。さらには医療用のマイクロデバイスの性能向上や、安全性試験の生体モデルとしても貢献できる可能性が高い。今後も積極的に本研究成果を発信していきたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

PGK:H2B-mCherryトランスジェニックウズラとTie1:H2B-EYFPトランスジェニックウズラとの掛け合わせによって、血管内皮細胞と血球細胞の同時可視化に成功し、これを用いて、血球の流れと血管内皮細胞挙動を解析することが可能になった。このユニークな実験系を確立したことは高く評価できる。さらに、培養条件下での再建組織内への血管誘導技術の開発や、血管腫の発症メカニズム解明への応用を目指し、血管ネットワークの再構築と精密な制御の実現を期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. *Sato Y, Nagatoshi K, Hamano A, Imamura Y, Huss D, Uchida S, Lansford R. "Basal Filopodia and Vascular Mechanical Stress Organize Fibronectin into Pillars Bridging the Mesoderm-Endoderm Gap". *Development* (in press, *corresponding author)

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(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)

1. Sato Y. "Vascular mechanical stress organizes Fibronectin into pillars bridging tissue gap". 日本生物物理学会第 54 回年会, つくば国際会議場, 11 月 25 日 (2016) 招待講演

2. Sato Y, Huss D, Lansford R, “Dynamic imaging of endothelial cells and circulating blood in developing embryos”. CYMV2015 心血管代謝週間, 神戸, 12月10日 (2015) 招待講演
3. Sato Y, Nagatoshi K, Imamura Y. “Basal Filopodia and Vascular Pulsing Organize Fibronectin into Pillars That Bridge Somites and the Endoderm”. Asia-Pacific Developmental Biology Conference 2015, 西安(中国), 9月13日 (2015) 招待講演
4. 佐藤有紀「血管内皮細胞挙動と血流動態の関係性を探る」第8回 Symphony, ホテルメトロポリタンエドモント飯田橋, 9月27日 (2015) 招待講演
5. Sato Y, Nagatoshi K, Imamura Y. “Fibrillar Adhesion and Vascular Constriction Regulate Patterned Deposition of Fibronectin Pillars that Bridge Somites and the Endoderm”. 第48回日本発生生物学会大会, つくば国際会議場, 6月4日 (2015)
6. Sato Y, Nagatoshi K, Imamura Y. “Filopodia-Mediated Fibrillar Adhesion and Vascular Constriction Facilitate Patterned Deposition of Fibronectin Pillars that Bridge Somites and the Endoderm” 62nd NIBB conference, Force in Development, 岡崎カンファレンスセンター, 11月17日 (2014)
7. 佐藤有紀「血管パターンニングにおける血流の役割」*生体の科学* 65巻, 5号, p430-431 (2014)
8. Kanda S, Tanigawa S, Ohmori T, Taguchi A, Kudo K, Suzuki Y, Sato Y, Hino S, Sander M, Perantoni AO, Sugano S, Nakao M, Nishinakamura R, “Sall1 maintains nephron progenitors and nascent nephrons by acting as both an activator and a repressor”. *Journal of the American Society of Nephrology*. 25, p2584-2595 (2014)