

動脈・静脈間の相互作用が制御する、血管分化メカニズムの解明

木戸屋浩康

大阪大学微生物病研究所 情報伝達分野

【研究の背景】

これまでに多数の血管新生誘導因子が発見され、血管形成を開始させるメカニズムの詳細が明らかになりつつある。その成果により、生体内での血管形成の制御が可能となっており、血管再生療法という形で医療応用が進められている。しかしながら、血管新生の誘導によって再生された血管網は、動脈・静脈・毛細血管から構成されるべき階層性が失われた乱雑な構造を示す。このような無秩序な血管構造は、治療後の血管退縮や透過性亢進による浮腫の発生など、血管の質の低下に繋がると考えられている。そのため、成熟した構造を有する血管網の再生が望まれているが、特に静脈血管への分化制御機構や動静脈間での相互作用などは意外にも解明が進んでいない(Carmeliet P. *Nature*. 2011)。本研究では、申請者が確立した実験系を活用することで、特に解明の進んでいない静脈血管の分化・形成過程の解明に取り組んだ。

【目 的】

我々はこれまでに、生理活性ペプチドである **Apelin** が動脈血管内皮細胞から分泌され、静脈血管内皮細胞の **APJ** 受容体に作用して血管成熟化に働いていることを明らかにしてきた(Kidoya H. *EMBO J.* 2008, *Blood.* 2010)。また、発生期の血管リモデリング過程において、**Apelin-APJ** 系を介した動静脈間の相互作用が静脈血管の動脈近傍への移動を引き起こし、並走する血管構造の形成に寄与していることを示した(Kidoya H. *Dev Cell.* 2015)。本課題では、動・静脈血管内皮細胞が生体内でどのような制御を受けることで、未熟な毛細血管内皮から分化誘導されるかを明らかにするため、動脈・静脈血管内皮にそれぞれ特異的分子として同定した **Apelin** と **APJ** を活用し、「1.発生過程における静脈分化における **Apelin-APJ** シグナルの重要性」、「2. **Apelin** と **APJ** を指標とした動静脈血管の生体解析系の構築」に取り組んだ。

【方 法】

1.発生過程における静脈分化における **Apelin-APJ** シグナルの重要性

これまでのマウス胎児の皮膚発生モデルを用いた解析から、血管リモデリングによって動脈・静脈の分化が進むにつれて、それぞれの血管内皮細胞にて特異的に **Apelin** および **APJ** が発現することを見出している(Kidoya H. *Dev Cell.* 2015)。そこで、**Apelin** および **APJ** がどのような時期に動脈・静脈血管内皮細胞に発現するかを免疫染色によって経時的に観察した。また、未熟な血管内皮細胞から静脈血管内皮細胞への分化における **Apelin-APJ** シグナルの重要性を調べるため、ES細胞から分化させた **Flk1** 陽性の未熟な血管内皮細胞を用いて解析を行った。

2. **Apelin** と **APJ** を指標とした動静脈血管の生体解析系の構築

Apelin および **APJ** の発現を指標として、動静脈血管内皮細胞の生体組織での観察や、組織からの細胞の分離を可能とするため、これらのプロモーターにて蛍光を発現する **BAC-Tg** マウスの作成を試みた。**Apelin** についてはコーディング領域を含む 224kbp のゲノム配列にて **tdTomato** を発現するようにデザインし、**APJ** については同じく 233kbp のゲノム配列にて **EGFP** を発現するようにデザインしてマウスを作成した。それぞれのマウスにおいて、蛍光タンパクの発現量が **Apelin** および **APJ** と関連しているかを検討するため、免疫染色による局在の確認と、セルソーターにて分取した血管内皮細胞にて **mRNA** の発現を解析した。

【結 果】

1. 発生過程における静脈分化における Apelin-APJ シグナルの重要性

皮膚発生モデルにおける Apelin と APJ の発現時期を解析すると、両者とも形成直後の毛細血管にてある程度の発現が認められており、その後に血管のリモデリングが進むにつれて、Apelin は胎生 14 日頃、APJ は 14.5 日頃から、動脈および静脈血管にて発現が上昇していた。また、ES 細胞から分化させた未熟な血管内皮細胞に Apelin 刺激を加えると、わずかに静脈血管への分化誘導が進んでいたが、顕著な変化は認められなかった。

2. Apelin と APJ を指標とした動静脈血管の生体解析系の構築

作成した Apelin-tdTomato BAC-Tg マウスでは、動脈血管および新生血管に特異的な tdTomato の発現が免疫染色および RT-PCR にて確認できた。APJ-EGFP BAC-Tg マウスに関しては、一部の静脈血管において EGFP の発現が認められたが、静脈血管における陽性率や蛍光強度は弱かった。

【考 察】

本課題研究の結果からは、Apelin-APJ シグナルが静脈血管内皮細胞の分化系には深く関与していないと考えられる。実際に、Apelin/APJ 系を欠失したマウスでも、乱雑な構造ではあるが静脈血管の形成が確認されており、血管の分化制御には未知の動静脈間の相互作用の存在が予想される。一方で、Apelin および APJ が分化した動静脈血管内皮細胞の有用なマーカーとなることは確認できた。作成した Apelin-tdTomato BAC-Tg マウスおよび APJ-EGFP BAC-Tg マウスを用いることで、生体内で動脈と静脈をそれぞれ識別して解析することが可能となった。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究で作成および検証された動静脈を識別されるマウスを用いることで、静脈内皮細胞を選択的に生体から回収することが可能になるなど、今まで未知であった動静脈血管構造の形成に働く分子機構の解析に役立つと期待できる。再生医療の発展に向けては、組織再生の基盤となる効率的な血管循環系の再建は必須であり、そのためには動静脈の形成機構のさらなる理解が求められている。引き続き、Apelin-APJ を指標として動静脈血管内皮細胞の分化機構の解明を進め、新たな血管再生療法の開発に繋げていきたい。

【参考・引用文献】

- Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011 May 19;473(7347):298-307.
- Kidoya H, Naito H, Muramatsu F, Yamakawa D, Jia W, Ikawa M, Sonobe T, Tsuchimochi H, Shirai M, Adams RH, Fukamizu A, Takakura N. APJ Regulates Parallel Alignment of Arteries and Veins in the Skin. *Dev Cell*. 2015 May 4;33(3):247-259.
- Kidoya H, Naito H, Takakura N. Apelin induces enlarged and nonleaky blood vessels for functional recovery from ischemia. *Blood*. 2010 Apr 15;115(15):3166-3174.
- Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, Fujii R, Takakura N. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J*. 2008 Feb 6;27(3):522-534.