

メカノセンシングによる血管新生ブレーキ機構の解明と医療応用

西山功一

熊本大学 国際先端医学研究機構

【研究の背景】

組織が虚血状態に陥ると、低酸素誘導因子(HIF)を介して血管新生因子 VEGF の産生が亢進し、血管内皮細胞による血管新生が誘導される。この VEGF を中心とした血管新生促進機構はよく研究され、同経路を標的とした治療法もいくつか実用化されている。我々はこれまでに、血管新生の内皮細胞動態を可視化・定量化する独自の方法を確立し、“内皮細胞の混ざり合い”といった新しい細胞運動動態を発見した。加えて、VEGF は内皮細胞の方向性運動を効率化し血管新生を促進することを明らかにした^{1,2)}。さらに、VEGF が血管新生のアクセラレーターとすると、心臓ポンプ圧による血流静水圧(血管内腔圧)とそれに伴う血管壁の伸展刺激がブレーキとして作用することを最近見出した(論文投稿中)。新生された血管にはすぐに管腔が形成され血液が流入する。したがって、血流は血管新生に何らかの作用を及ぼしていると推測される。しかし、これまでほとんど検討されてこなかった。我々は、微小流体デバイスを使った独自のオンチップ解析系を構築することで方法論の壁を克服し、それを用いて同定した血流によるブレーキ機構が生体内でも機能していることを実証した。これまでに、血管内腔圧によって血管壁の内皮細胞膜が伸展されることで、内皮細胞の方向性運動が失われ血管新生にブレーキがかかる機序が分かってきた。しかし、内皮細胞が膜伸展を感知する(メカノセンシング)しくみは十分明らかにできておらず、また、このブレーキ機構の正常血管新生における意義は明らかにできていなかった。

【目 的】

本研究では、血流により生じる力学刺激が血管新生にブレーキをかけるメカノセンシング・トランスダクション機構を明らかにする。さらに、マウスモデルを用いて同ブレーキ機構をモニターすること、また遺伝的介入することを通して血管発生における意義を明らかにし、全く新しい血管新生制御機構の提示と医療応用への展開を目指した。

【方 法】

1. オンチップ解析系による血管壁伸展のメカノセンシング・トランスダクション機構の解明

最近、細胞膜の陥入等に必要となる BAR タンパク FBP17 が細胞膜伸展のメカノセンサーであることが報告された³⁾。我々は、そのファミリー分子 CIP4 が新生血管内皮細胞におけるセンサーである可能性をこれまで見出した。したがって、オンチップ解析系を用いて、CIP4 の細胞膜局在と下流分子経路との関連、および CIP4 機能阻害効果を分子細胞生物学、免疫組織学、薬理学的に解析し、その必要十分性を検討した。

2. 血管壁伸展のメカノセンシングをモニターする遺伝子改変マウスの樹立

センサー分子の細胞内局在動態をモニターする壁伸展リポーターマウス(CIP4 とリポーターの融合遺伝子のノックイン)を樹立するため、リポーター遺伝子を融合させた CIP4 が内因性の CIP4 の挙動と生理的に同等であるかオンチップ解析系にて検討した。

3. マウスモデルを使った血管新生ブレーキ機構の血管発生での役割の解明

CIP4 ノックアウトマウスを用いて、網膜血管発生におけるセンサー分子 CIP4 の機能的関与を検討した。

【結 果】

1. CIP4 およびファミリー分子の TOCA1 は、F-actin の形成に必要な Arp2/3 複合体と共に、新生血管のチップ内皮細胞先端の細胞膜に局在し、血管内腔圧負荷による細胞膜伸展によりその膜局在が消失することが分かった。さらに、siRNA を使った実験から、CIP4 のノックダウンにより血管新生が阻害されるがその効果は十分でなく、TOCA1 の共ノックダウンにより Arp2/3 複合体の先端膜局在が消失し新生血管枝の伸長が十分に阻害された。また、Arp2/3 阻害剤 CK-666 の処理にて血管枝の伸長が阻害された。
2. CIP4 は2つのアイソフォームが知られているが、神経細胞においては CIP4 short form がより細胞辺縁の膜に局在することが報告されている⁴⁾。新生血管枝のチップ内皮細胞においては、N 末に EGFP を融合させることで内因性の CIP4 と同様の先端細胞膜局在と細胞膜伸展時の挙動が追えた。TOCA1 は、免疫染色が可能な抗体が存在せず内因性の TOCA1 の挙動と比較できなかったが、CIP4 と同様、EGFP を N 末に融合させたキメラ蛋白で先端端の特徴的な局在が確認できた。
3. 共同研究者(日本医大:福原茂朋教授)とともに、CIP4 コンベンショナルノックアウトマウスの網膜血管新生枝の伸長が遅延している予備的知見をこれまでに見出している。同様に TOCA1 コンベンショナルノックアウトマウスも解析予定であり、また、CIP4 と TOCA1 のダブルノックアウトマウスの解析も予定している。

【考 察】

以上の結果から、血管新生を行う内皮細胞において BAR タンパク CIP や TOCA1 が細胞膜の伸展を感知するセンサー分子として機能し、血流により生じる内腔圧負荷とその後の細胞膜伸展によって、チップ内皮細胞の方向性運動に必要な細胞先端の Arp2/3 複合体依存的な F-actin 重合とフィロポディア形成が阻害され血管新生にブレーキがかかる、メカノセンシング・トランスダクション機構が明らかになった。今後、壁伸展リポーターマウスの樹立と解析、および CIP4 と TOCA1 ノックアウトマウスの解析を進めていくことを通して、発生および虚血病態での意義とそれを標的とした治療法の開発に発展すると期待される。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

血管新生は、虚血性疾患に限らず癌や炎症など様々な病態に関与し、また、再生医療に向けた人工組織・器官の構築に欠かせない。現行の血管新生操作法には限界があり、力学的な血管新生抑制機序といった先例のない角度から血管新生を理解する本研究は、次世代の画期的診断法や治療法開発への視点や基盤を与え、臨床の場へ大きく貢献する。

【参考・引用文献】

1. Arima S*, Nishiyama K* (corresponding author), Ko T, Arima Y, Hakozaki Y, Sugihara K, Koseki H, Uchijima Y, Kurihara Y and Kurihara H. *These authors contributed equally to this work. Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement. *Development* 138(21):4763-76, 2011
2. Sugihara K*, Nishiyama K* (corresponding author), Fukuhara S, Uemura A, Arima S, Kobayashi R, Köhn-Luque A, Mochizuki N, Suda T, Ogawa H and Kurihara H. *These authors contributed equally to this work. Autonomy and non-autonomy of angiogenic cell movements revealed by experiment-driven mathematical modeling. *Cell Rep* 13(9):1814-27, 2015.
3. Tsujita K, Takenawa T and Itoh T. Feedback regulation between plasma membrane tension and membrane-binding proteins organizes cell polarity during leading edge formation. *Nat Cell Biol* 17(6):749-759, 2015.
4. Taylor KL, Taylor RJ, Richters KE, Huynh B, Carrington J, McDermott ME, Wilson RL, Dent EW. Opposing functions of F-BAR proteins in neural membrane protrusion, tubule formation, and neurite outgrowth. *Life Sci Alliance* 2(3):e201800288, 2019. DOI: 10.26508/lisa.201800288