

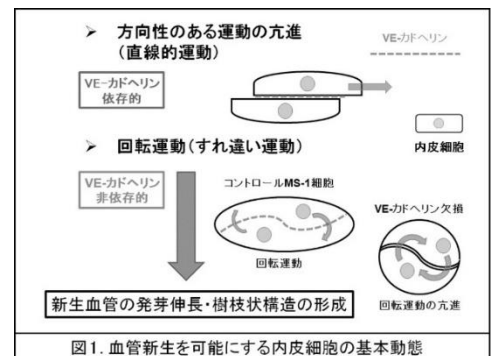
内皮細胞固有の細胞動態を生み出す遺伝子の再構成による非血管細胞からの血管構造誘導の試み

礪波一夫

東京大学大学院医学系研究科 代謝生理化学分野

【研究の背景】

血管新生は内皮細胞が出芽・伸長・分岐・管腔形成を行い新しい血管網が構築される現象である。応募者の所属研究室では、血管新生においては、内皮細胞同士が互いの位置関係を入れ替え、複雑な運動を示しながら血管を伸長していることを明らかとした^{1,2)}。本研究では、細胞外基質(ECM)中で血管新生様の発芽・伸長現象を示すマウス脾臓毛細血管由来内皮細胞株 MS-1 細胞を用いた実験から、血管新生のモジュールとなる内皮細胞固有の協調運動として、細胞接触により亢進する①直線的運動と②細胞接着面を軸とした回転運動を同定した。さらに、直線的運動は VE-カドヘリン依存性の、回転運動は VE-カドヘリン非依存性の運動要素であることを明らかとしていた(図1)。



【目的】

本研究では、内皮細胞固有の運動特性を担う責任分子を同定し、これらの分子システムを遺伝子導入により非血管細胞内で再構成することにより、非血管細胞で内皮細胞固有の細胞動態と血管新生特有の樹枝構造あるいはその一部構造を再現することを目的とする。

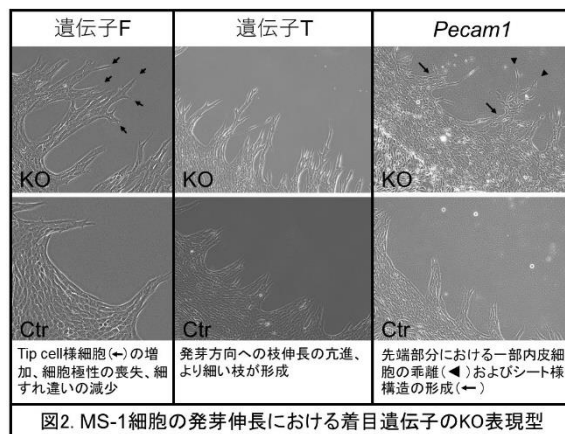
【方法】

RNA-seq 解析により同定した MS-1 細胞に発現する遺伝子の中から、内皮細胞固有の協調動態(直線的運動と回転運動)を制御する候補遺伝子を選定し、これらの KO (CRISPR-Cas9 システムによる)や過剰発現(OE)の表現型を解析することで内皮細胞固有の協調動態を制御する責任分子を同定した。さらに、VE-カドヘリンと上記で同定する責任分子を非血管細胞に遺伝子導入し、内皮細胞固有の協調動態や樹枝状構造形成をどのくらい再現出来るかを評価、検討した。

【結果】

本研究では、内皮細胞に特徴的な回転運動に着目し、これを制御する責任分子の候補を選定した。回転運動を駆動する要素として、①細胞間の接着、②細胞接触面におけるラフリング現象の亢進、③細胞運動の方向性の維持³⁾に着目し、①に寄与する分子として血小板内皮細胞接着分子-1(PECAM1)、②に関わる分子として、内皮細胞において Rac1 活性化能が報告されているカドヘリンファミリー分子である遺伝子 T、③については、上皮細胞において細胞極性を制御することが報告されている遺伝子 F に着目した。各遺伝子を KO した MS-1 細胞の発芽伸長を解析したところ、(図2)に示す表現型が観察

され、PECAM1 が内皮細胞の接着を介して血管伸長に寄与していること、遺伝子 F は内皮細胞の運動の方向性の維持や茎細胞と先端細胞の転換制御に関わること、遺伝子 T は内皮細胞の枝構造の形成・伸長に関わることが示された。特に遺伝子 F の KO では、2 細胞動態において内皮細胞が互いに反発し合う間葉系細胞に類似した運動パターンへの変化が認められた。また、各遺伝子の OE ベクターを作出し、MS-1 細胞に遺伝子導入したところ、遺伝子 F の OE では内皮細胞が互いの接着を強めながら、運動の方向性をより維持するような協調動態が観察された。最後に、VE-カドヘリン(GFP 融合型)と PECAM1(mCherry 融合型)、遺伝子 T(野生型)および遺伝子 F(mCherry 融合型)の 4 分子を非血管細胞に OE し、内皮細胞の協調動態を解析した。まず、間葉系細胞である NIH3T3 細胞に 4 分子を遺伝子導入した結果、細胞接着は賦与されず内皮細胞の運動を特徴付ける細胞接触に依存した協調動態を再現することは出来なかった。次に、上皮系細胞である MDCK に対して4分子の遺伝子導入を行ったところ、内皮細胞に類似した回転運動の亢進を示唆する所見を得ることが出来た。



【考 察】

内皮細胞における遺伝子 KO および OE の実験から、遺伝子 F は内皮細胞の運動の方向性を維持する機能により血管伸長に寄与すると共に、その KO は血管新生における先端細胞を増加させることから、内皮細胞の形質転換にも関与していることが考えられた。遺伝子 T は内皮細胞の伸長に寄与する新規機能が示されたが、内皮細胞のどの運動要素に寄与しているかは今後の明らかにすべき点である。最後に、VE-カドヘリン、PECAM1、遺伝子 F および T の4遺伝子の導入により、上皮細胞である MDCK において回転運動の亢進を示唆する所見が得られたことは、これら4遺伝子の再構成により非血管細胞で内皮細胞固有の細胞動態を誘導し得たことを示しており、これらの遺伝子導入により血管構造の誘導が可能かを検証していくことが今後の課題と考えている。

【考 察】

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究では同定した遺伝子の再構成実験により、非血管系細胞である上皮系細胞において内皮細胞固有の細胞動態である回転運動の誘導を示唆する所見を得ることが出来た。これは、これら遺伝子の導入により非血管細胞から血管構造あるいはその一部を作り出すことのできる可能性を示しており、血管誘導による臓器機能の再建や細胞移植による再生医療に新しい可能性を拓くことが期待される成果である。また、腫瘍血管の制御など病態治療における標的分子の探索にも貢献し得る成果と考えられる。

【参考・引用文献】

1. Arima, S. et al. Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement. *Development* 138, 4763-4776 (2011).
2. Takubo, N. et al. Cohesive and anisotropic vascular endothelial cell motility driving angiogenic morphogenesis. *Sci Rep* 9, 9304 (2019).
3. Camley, B.A. et al. Polarity mechanisms such as contact inhibition of locomotion regulate persistent rotational motion of mammalian cells on micropatterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 14770-14775 (2014).