

## 血管内皮-ペリサイト-血流間作用による微小血管網維持の破綻と心不全病態形成

西山 功一

宮崎大学医学部 機能制御学講座 血管動態生化学分野

### 【研究の背景】

現在、世界中で心不全パンデミックと呼ぶべき事態が進行し、心不全の増加が問題となっている。心不全の有病率は加齢とともに増加することから、超高齢社会の我が国では、その状況はより深刻である。最近、心機能が保たれた心不全(HFpEF)を含めて、心不全において心筋内微小循環異常の関与が指摘されている。そこでは、血管収縮などによる機能的な血管網の異常に加え、微小血管網構造そのものの破綻が関与していると考えられるが、その本態は不明である<sup>1)</sup>。

一方、血管新生は、既存の血管から新しい血管が伸長し血管網を増生する反応である。血管新生は、組織要求性に応じて血管網をつくることに加えて、傷害された血管網の修復にも関わり、微小血管網の恒常性維持に重要である。我々は、これまで独自の解析系にて、血管新生の新たな内皮細胞動態を同定し<sup>2)</sup>、また、VEGF や Semaphorin などの生化学的なシグナルが内皮細胞動態とそれによる血管新生を制御するしくみを明らかにしてきた<sup>3,4)</sup>。さらに、微小流路デバイスを用いた血管新生モデルで血流作用を再現する独自の解析系を開発し、血流による内腔圧と続く血管壁の伸展刺激が、血管新生の新たな抑制因子であることを発見した。また、膜タンパク BAR によるメカノバイオロジー機構を同定した。<sup>5)</sup>続いて、内皮細胞に隣接して存在するもう一つの血管構成細胞であるペリサイトは、内皮細胞との相互作用を通して、4 型コラーゲンを中心とした血管基底膜形成を促進し、血管外環境を硬くすることで血流圧による負荷に抗い、血管新生を促進するしくみが徐々に明らかになってきた。また、血流による機械刺激が血管基底膜を維持する重要な因子の一つであることもわかってきた。

### 【目 的】

本研究では、これまでの我々の知見に基づき、血管内皮-ペリサイト-血流間作用が、血管基底膜形成を介した血管新生の制御などを通して微小血管網を維持するしくみを明らかにすることを目的とした。また、微小血管網の維持機構の破綻が、いかに HFpEF 病態に関与するのか、新たなマウスを樹立し明らかにしていくことで、心不全病態の理解の深化とその医療応用を可能にする基盤を提供することを目指した。

### 【方 法】

#### 1. 血管内皮-ペリサイト-血流間作用による血管基底膜形成を介した血管新生制御による微小血管網維持機構とその破綻機序の検討

これまで、血管内皮細胞(HUVECs)とペリサイト(ヒト胎盤由来ペリサイト、hPIPC)の2次元共培養系にて、血管内皮-ペリサイト間作用を介した 4 型コラーゲン(Col-IV)の発現制御に重要な介在分子として、TGF  $\beta$  2 が候補に上がってきた。よって、2次元培養系と微小流体デバイスを用いたオンチップ血管新生系を用いて、TGF  $\beta$  2 から Col-IV 発現に至るシグナル経路と、Col-IV を介した血管新生作用に関して、薬理的介入とホールマウント免疫染色にて、定量的に解析した。

#### 2. 3次元微小血管網評価系の開発、マウス HFpEF 病態形成および微小血管網異常との関連性の解明

マウス心筋組織の厚切り切片(100  $\mu$  m)の免疫染色、続く透明化処理にて、ペリサイト被覆と血管基底膜形成を含む心筋内微小血管網の3次元形態を、共焦点レーザー顕微鏡で観察する実験条件を検討した。また、既報にならない、一

酸化窒素構成酵素阻害と高脂肪食負荷により、マウスにて HFpEF 心不全病態の誘導を試みた<sup>6)</sup>。同マウスは、経時的な状態観察(心不全兆候等)や体重測定、および負荷16週目に心エコーにて心機能評価および血圧測定を行った。また、16週目において、心臓をサンプリングし組織学的解析を行なった。

### 3. 誘導型微小血管網破綻マウスの樹立と同マウスを用いた微小血管網異常の HFpEF 病態形成の関与の検討

ここまで、血管内皮-ペリサイト-血流間作用による Col-IV 基底膜形成と維持が、血管新生や微小血管網の恒常性維持に重要であるとわかってきた。そこで、微小血管網異常が HFpEF 病態形成に重要かどうかを解析できると想定される、血管基底膜の Col-IV 成分である *col4a1* および *col4a2* 遺伝子をコンディショナルに同時にダブルノックアウト(cDKO)する Flox マウスを、CRISPR-Cas9 システムを用いて樹立した。

## 【結 果】

- まず、2次元培養系にて、TGF  $\beta$  1 および TGF  $\beta$  2 刺激下に、*col4a1* および *col4a2* 遺伝子発現レベルを qPCR 法にて解析したところ、TGF  $\beta$  2 で刺激した内皮細胞のみにて、*col4a1* および *col4a2* 遺伝子発現が増加することがわかった。また、薬理的阻害実験および免疫細胞学的解析にて、TGF  $\beta$  2 は、Alk5 受容体→Smad2/3 の核内移行を介して、*col4a1* および *col4a2* 遺伝子を発現していることがわかった。さらに、オンチップ血管新生解析系を用いて、TGF  $\beta$  2 刺激により新生血管周囲の血管基底膜への Col-IV 沈着が促進・増強されること、また、それに伴い血管径を細く保ちながら血管伸長が促進され、TGF  $\beta$  2 刺激によりペリサイトによる血管基底膜と血管伸長への作用が再現されることがわかった。現在、ペリサイト存在下でのオンチップ血管新生において、TGF  $\beta$  1/  $\beta$  2 Fc タンパクを用いて TGF  $\beta$  2 シグナル経路をブロックすることで、逆に、ペリサイト作用が抑制されるか検討している。
- マウス心臓組織厚切り切片を用いて、血管内皮細胞(CD31, VE-Cad 等)、ペリサイト(NG2, PDGFR  $\beta$  等)および血管基底膜(Col-IV)で免疫染色後、透明化し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて3次的に心筋内微小血管網を可視化できる条件を検討した結果、CD31、VE-Cad、NG2、Col-IV などの 1 次抗体、出来るだけ長波長領域の蛍光を発する色素で標識された 2 次抗体の使用、また、CUBIC-R での透明化処理といった条件により、以降の定量解析に耐えうる、70-100  $\mu$  m の厚さでの3次的な血管網描出が可能であることがわかってきた。また、既報の一酸化窒素構成酵素阻害と高脂肪食負荷プルトコールに沿って HFpEF 病態の誘導を試みたが、体重の増加、心臓重量の増加、肥大化、血圧上昇等は観察できるものの、心エコーにて拡張障害を示す所見は得られなかった。
- 血管基底膜を構成する Col-IV は、*col4a1* および *col4a2* 遺伝子で構成される。両遺伝子は、同じ染色体上に、プロモーターを共有した形で背中合わせにコードされている。したがって、同プロモータ領域を挟む両遺伝子のイントロン領域に Lox 配列を組み込んだ Flox マウスを CRISPR-Cas9 システムを用いて作成した。F0 マウスで、同組み換え遺伝子を確認後、現在、F1 マウスを樹立している。また、同時に Cdh5-ERT2:Cre マウスと交配を重ね、血管内皮かつ時期特異的に Col-IV を欠如させ、微小血管網異常を誘導する準備をしている。

## 【考 察】

以上の結果、および、これまで得られている研究結果から、血管内皮-ペリサイト間作用は、TGF  $\beta$  2-Alk5-Smad2/3 経路を介した 4 型コラーゲン発現増強ならびに血管基底膜沈着促進により、血管新生を正常に進め、また血流により血管基底膜が保持されることで、微小血管網構造が正常に維持されるしくみが示唆された。加齢や様々な病的状態により、この血管内皮-ペリサイト-血流間作用による血管基底膜形成・保持機構が破綻し、微小血管網異常をきたすことで、HFpEF 病態形成に至るしくみが推測される。また、本研究において樹立した *Col4a1/a2* flox マウスを使い今後解析していくことで、微小血管網形態異常が実際に HFpEF 病態形成に関与しているのか明らかにできると考えられる。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

今回明らかにできた、血管内皮-ペリサイト間作用の媒介分子である TGF  $\beta$  2 だけではなく、今後、血管基底膜異常から微小血管網異常に至る分子機序、さらに微小血管網異常から HFpEF 病態に至る分子機序が明らかになってくれば、単に

HFpEF 病態の理解が深まるというだけでなく、特定できた分子機序を標的にした診断ツールの開発、もしくは新たな治療法の開発といった応用展開が期待できる。

### 【参考・引用文献】

1. Camici PG, Tschöpe C, Di Carli MF, Rimoldi O, Van Linthout S. Coronary microvascular dysfunction and heart failure. *Cardiovasc Res* 116(4):806–816, 2020.
2. Arima S\*, Nishiyama K\* (corresponding author), Ko T, Arima Y, Hakozaiki Y, Sugihara K, Koseki H, Uchijima Y, Kurihara Y, 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
3. Sugihara K\*, Nishiyama K\* (corresponding author), Fukuhara S, Uemura A, Arima S, Kobayashi R, Köhn-Luque A, Mochizuki N, Suda T, Ogawa H, 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.
4. Fukushima Y, Nishiyama K, Kataoka H, Fruttiger M, Fukuhara S, Nishida K, Mochizuki N, Kurihara H, Nishikawa SI, Uemura A. RhoJ integrates and repulsive cues in directional migration of endothelial cells. *EMBO J* 39(12):e102930, 2020.
5. Yuge S, Nishiyama K, Arima Y, Hanada Y, Oguri-Nakamura E, Hanada S, Ishii T, Wakayama Y, Hasegawa U, Tsujita K, Yokokawa R, Miura T, Itoh T, Tsujita K, Mochizuki N, Fukuhara S. Mechanical loading of intraluminal pressure mediates wound angiogenesis by regulating the TOCA family of F-BAR proteins. *Nat Commun* 13(10):2594, 2022.
6. Schiattarella GG, Altamirano F, Tong D, French KM, Villalobos E, Kim SY, Luo X, Jiang N, May HI, Wang ZV, Hill TM, Mammen PPA, Huang J, Lee DI, Hahn VS, Sharma K, Kass DA, Lavandro S, Gillette TG, Hill JA. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction. *Nature* 568–(7752):351–356, 2019.