特別講演 1

再生医学・血管内皮の動態

西川 伸一

京都大学医学研究科

Shin-Ichi Nishikawa

Department of Molecular Genetics, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto.

A. 講演要旨

血管構築のリモデリングのプロセスを明らかにし、試験管内での組織化された血管構築の再現を目指す。これを実現するために、網膜血管新生をモデルにリモデリングプロセスの現象論的解析を行うとともに、血管内皮の個々の動態についてモニターできる実験システムの構築を行い VEGF, VEGF-C 等の細胞学的機能を明らかにした。

B. 目的

血管はあらゆる組織に必須の、しかし独立した組織である。従って、再生医学やガンの治療等は、血管構築についての理解無しに構想できない。組織自体は内皮と周囲細胞（平滑筋も含む）より構成される比較的単純なものであるが、それにより形成される構築には大きなバリエーションが認められ、現在なお試験管内で組織化された血管構築を再現することは困難である。本研究では、血管構築の組織化の原理を明らかにし、その知識に基づき組織化された血管構築をデザインし、試験管内で再現することを目的とする。

これまでの研究で、VEGFR2 を発現している側版中胚葉を 3 次元培養中で血管構築へと発展させられることを示した。しかし、網膜血管やガン周囲血管発生について個体レベルでの仕事を続ければ続けるほど、血管構築のリモデリングが極めて複雑なプロセスであること、またそこでの個々の分子の役割を解明するには、それらの細胞レベルでの機能を調

べる方法がほとんどないことがわかってきた。

そこで、血管内皮の動態をリアルタイムにモニターするための実験システムを構築し、新しい細胞学を目指している。

C. 結果

網膜血管系を用いたリモデリング過程の新しい研究方法

血管のリモデリング過程は、内皮と周囲細胞の相互作用を通して調節され则认为されており、Angiopoietin や PDGF 等が相互作用に関わる分子として提唱されている。ただ、この細胞間相互作用を研究するためには、相互作用をする相手側の細胞を取り除き、細胞の機能を分子で置き換えると言う実験が必要であった。ただ、発生初期や試験管内等の特殊な状況を除くと、周囲細胞と結合がない内皮構造を得ることは困難であり、リモデリングに関わるこの分子のネットの活性を調べることはほとんど不可能に近かった。

今回我々は、新生児期の網膜血管発生過程と、PDGFRb 機能阻害抗体を用いて、網膜内に周囲細胞が全く存在しない血管網を構築することに成功した。こうしてできる血管網は、全くリモデリングがみられず、また透過性亢進、そして出血を伴う内皮構築の破綻が見られることから、周囲細胞がこれらの機能を担っていることを示している。

しかし、Angiopoietin1 をそのような血管網に添加すると、動静脈の区別を伴うリモデリングが進み、同時に透過性の亢進や出血も抑制で

きることがわかった。この結果は、内皮に及ぼす周囲細胞の作用を分子レベルで調べるための新しい方法が確立できたこと、そして **angiopoietin1** は周囲細胞の機能の多くを代償することを示しており、血管研究に新しい方向性を示すものと考えている。

ES 細胞由来内皮細胞の動態

VE-Cadherin 陽性血管内皮細胞を CAG プロモーター支配下に発現する **actin-GFP** を導入した細胞から調整し、その細胞を様々な条件で培養したものをビデオでリアルタイムでモニターし、アクチンの分布の様態から細胞の活性を推察し、以下の結果を得た。

1) VEGF-A に対する反応

VEGF-A は血管内皮の発生、血管新生、或いは血管の透過性の調節等に重要な働きを演じている。しかし、正常血管内皮が VEGF にどのように反応するのかはこれまで不明であった。OP9 上に形成させた細胞層に 100ng/ml VEGF-A を加える実験で以下のことが明らかになった。

- (ア) VEGF-A 添加により、個々の細胞は線維芽細胞の様な紡錘形の細胞へ変化した。
- (イ) 個々の細胞の形態が大きく変化するにもかかわらず、集団全体は比較的安定な形状を示した。
- (ウ) ストローマ細胞上では、集団の周辺への偽足等の投射はほとんど見られないが、ストローマ細胞の代わりにマトリックスを使うと、投射が見られる。このことは、ストローマ細胞が存在することで内皮細胞集団の安定性が上昇していることを示している。
- (エ) VEGF-A 添加によって単層の細胞層が多層化する。しかし、これによっても集団が壊れることはない。

2) VE-cadherin の機能

内皮細胞層は **VE-cadherin** によって細胞同士

が接着することで集団としての構築を維持している。この **VE-cadherin** の機能を調べる目的で阻害抗体を内皮細胞集団に添加する実験を行った。既に形成された細胞層抗 **VE-cadherin** 抗体を添加しても大きな変化をすぐには示さない。しかし、集団内の細胞の移動がほとんど見られなくなることから、内皮単層内での細胞の移動には **VE-cadherin** が重要な役割を演じていることが示唆される。一方、この抗体と同時に VEGF-A を添加することで血管内皮自体を刺激すると、紡錘形への形態変化は変わりなく起こるものの、細胞同士の接着が徐々に消失する。この結果は、**VE-cadherin** が確かに血管内皮同士の接着維持に重要であること、そしてこの接着力が VEGF-A によって影響される事を示した。

3) VEGFR3 の機能

VEGFR 3 に対する阻害抗体を担ガン動物に投与する実験より、VEGFR3 シグナルは VEGFR2 の刺激により活性化した内皮細胞集団の安定性を保つためのシグナルとして機能している可能性を示唆した論文を既に報告している。この可能性を細胞レベルで確かめる目的で、**VE-cadherin** 陽性細胞集団を形成させた後、VEGFR 3 機能阻害抗体を添加しモニターした。

抗体添加により、細胞集団全体が不安定になり、あたかも **VE-cadherin** の機能阻害を行ったような像を示した。このことは、VEGFR3 シグナルが血管内皮細胞層全体の安定性を保たせるために重要な役割を演じていることを示している。

D. 考察

周囲細胞の結合しない血管網、ES 細胞培養を用いた、GFP 標識血管内皮細胞等従来存在しなかった新しい方法が開発できた。今後これらの系を用いて、血管リモデリングの分子機構が更に明らかになると期待できる。

E. 関連論文

- Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, and Nishikawa SI: *Nature* 408, 92-96, 2000
- Kubo H, Fujiwara F, Jussila L, Hashi H, Ogawa M, Shimizu K, Awane M, Sakai S, Takabayashi M, Yamaoka Y Nishikawa SI: *Blood* 96, 546-553, 2000
- Hirashima M, Kataoka M, Nishikawa S, Matsuyoshi M, and Nishikawa SI: *Blood* 93, 1253-1263, 1999
- Nishikawa SI, Nishikawa S, Kataoka H, Matsuyoshi N, and Kodama H: *Development* 125, 1747-1757, 1998
- Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa SI, Kishimoto T, and Nagasawa T: *Nature* 393, 591-594, 1998

[Abstract] Development of vascular system is a complex process in which generation of cellular components and their organization into a highly hierarchical structure are undertaken in a short period of time. The latter process is further divided into formation of the primitive vascular plexus and remodeling processes. Despite of the increasing list of remodeling molecules, however, we understand only a little how these molecules regulate the process. The major reason for this problem might be an absolute deficit of our knowledge about cell biology of endothelial cells (EC) and mural cells (MC), which is essential for correlating phenotypes displayed at structural level to the phenotype at cellular level.

To overcome this problem, we have developed a method to generate distinct sets of ECs and MCs from ES cells, surface markers defining populations at intermediate stages during differentiation of vascular cells, a monitoring system to assess the response of each EC and MC to various stimuli, methods to deliver genes to EC specifically, and finally a culture system in which an organized architecture is produced through cell-cell interactions. In this symposium, we will describe the latest status quo and also a future potential of our in vitro system. While the system itself is yet far from complete, the present system can address to some questions in cell biology of remodeling. The first question that I addressed using this system is the role of VEGFR3 in vascular remodeling. We will present evidence showing that VEGFR3-signal stabilizes the EC sheet that are agitated by VEGFR2-signal. Moreover, we will also present a method to analyze EC/MC interaction during vasculogenesis.