

—特集〔日本医科大学先端医学研究所 Cutting Edge Research (2)〕—

血管研究を通して生命を理解し医学の発展に貢献する
「先端医学研究所 病態解析学部門」

福原 茂朋

日本医科大学先端医学研究所病態解析学部門

はじめに

先端医学研究所病態解析学部門では、“血管”に関する基礎研究、さらにはその成果を実際の医療に応用するための橋渡し研究を推進している。私たちの体には、10万キロメートル（地球の約2周半）もの長さの血管が張り巡らされている。血管は、その名の通り“血液が流れる管”であり、全身の細胞に酸素や栄養を届け、二酸化炭素や老廃物を回収することで、私たちの生命を維持している。しかし、血管の役割は単に血液を運搬することだけでなく、血管は、私たちが生存するために不可欠な多彩な生命現象を担っている。例えば、血管は免疫細胞を損傷組織や病原体の感染組織に運搬することで、組織修復や生体防御機構を担っている。また、ホルモンなどのメッセージ物質を運ぶネットワークを全身に構築し、臓器間相互作用を制御することで生体恒常性を維持している。さらに、血管はアンジオクラインファクターと呼ばれるシグナル伝達分子を産生することで、臓器・組織の形成・再生・維持に積極的に関与している。

このように血管は多彩な機能を担っており、その機能破綻が様々な疾患の発症・進展と密接に関連することは容易に想像できる。本邦の主要な死因である、心疾患、脳血管疾患は、まさしく血管異常が原因で発症する疾患であり、死因第一位のがんも血管が密接に関連する病気である。また、現在、世界的に大きな脅威をもたらす新型コロナウイルス感染症（COVID-19）では、血管障害による播種性血管内凝固症候群や急性呼吸窮迫症候群などの発症が、重症化リスクになることが報告されている。さらに、米国の医学者ウィリアム・オスラー博士が「人は血管とともに老いる」と述べたように、血管機能の破綻は加齢に伴う老化とも密接に関連している。従って、健康長寿社会の実現には、血管に関する基礎・臨床医学研究の推進が極めて重要であると考えられる。当研究部門では、“血管が如何に形作られ機能しているのか？”，“血管機能の破綻が如何に様々な病気を発症するのか？”といった疑問を明ら

かにし、血管に関わる疾患の予防法・治療法の開発につなげることを目的に研究を行なっている。本稿では、病態解析学部門において推進している最先端の血管研究について紹介する（図1）。

1. 血管新生の制御機構とその破綻が関連する疾患の
病態解明および治療法の開発

血管新生は、既存の血管から血管枝が出芽・伸長し新たな血管網を構築するプロセスであり、個体発生や成長、創傷治癒、虚血性疾患などにおいて誘導され、生体恒常性維持や組織修復に関与する^{1,2}。これまで閉塞性動脈硬化症やパーリジャー病などの虚血性疾患を治療する目的で、血管新生を人為的に誘導する血管再生療法の試みがなされてきたが、いまだ十分な成果が得られていないのが現状である³。一方、血管新生は、がんや糖尿病網膜症、関節リウマチなどの炎症性疾患においても誘導され、これら疾患の病態を悪化させる。例えば、がんは1 mm以上の大きさになると、酸素や栄養を供給するための血管を必要とする。そのため、がん細胞は血管新生を誘導することで、がん組織に新たな血管網を形成し、その成長を促す。1971年に、Judah Folkman博士は、この現象に着目し、「腫瘍血管新生を阻害し、がんを兵糧攻めにすることができれば、がんを治療できる」と考え、血管新生阻害療法の概念を提唱した⁴。その後、この概念をもとに、血管新生阻害薬として、vascular endothelial growth factor (VEGF)の中和抗体ベバシツマブ（商品名アバスタ）をはじめとするVEGFシグナル阻害剤が開発された⁵。現在、これら血管新生阻害薬は臨床応用されているが、全てのがんに有効ではなく、また、効果があっても徐々に耐性を獲得することがあるなど、未だ多くの課題が残されている⁶。このように血管新生研究は、生命科学の発展に寄与するばかりでなく、虚血性疾患に対する革新的な血管再生療法の開発やがんなど病的血管新生がかかわる疾患の治療法の開発など、臨床医学の進展にも極めて重要である。



図1 研究室の風景

われわれはこれまで、血管新生の制御機構とその破綻がもたらす疾患の病態について研究を行ってきた。例えば、VEGFと同様に血管新生に重要なシグナル分子である angiopoietin-1 (Ang1) の機能についての研究を行なった⁷。Ang1は、血管内皮細胞に発現する受容体型チロシンキナーゼ Tie2を活性化することで、血管新生と血管安定化の相反する機能を制御するユニークな血管新生調節因子である。われわれは、Ang1/Tie2がこれら相反する機能を制御するメカニズムについて研究し、Ang1/Tie2は内皮細胞間接着の有無で異なったシグナル伝達系を活性化することを発見した⁸⁻¹⁰。内皮細胞同士が接着した環境下では、Tie2はAng1を介して細胞間接着部位でトランス結合を形成し、血管安定化シグナルを活性化する一方、細胞間接着が無い条件下では、Tie2はAng1を介して細胞-基質接着部位に動員され、血管新生誘導シグナルを活性化することを見出した。これにより、1つのリガンド-受容体系が、細胞間接着の有無で異なるシグナル伝達系を活性化し、相反する生命現象を制御するという、全く新しい概念を提唱し、血管再生療法や抗血管新生阻害療法の開発につながる分子基盤を確立した^{11,12}。また、われわれは蛍光イメージング技術を駆使した独自の血管新生研究を推進している(図1)。以下に具体的な研究内容とこれまでに得られた成果を紹介する。

(I) 蛍光イメージング技術を駆使した血管新生研究

「百聞は一見にしかず」のことわざが示すように、体内で起こる生命現象を実際に“目で見る”ことができれば、それら生命現象の理解を飛躍的に深化させることができる。これを可能にするのが、緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescence protein, GFP) の発見以来、飛躍的な発展をみせる“蛍光イメージング技術”である^{13,14}。われわれは、ゼブラフィッシュをモデル動物として利用し、蛍光イメージング技術を駆使することで、生体内の細胞を研究する“*in vivo* 細胞生物学研究”を独自に確立し、血管新生研究を進めてきた¹⁵(図2)。ゼブラフィッシュは、インド原産の体長5 cm程度の小型魚類で、臓器の発生や構造がヒトと類似した脊椎動物である。また、体外で受精し、発生が早く、胚が透明であることから、蛍光イメージング技術を応用することで、生きたまま胎生期における組織形成を観察できる。さらに、血管障害・心不全・糖尿病・がんなど様々な疾患モデルフィッシュが開発され、疾患研究や創薬スクリーニングに利用されている。このため、現在、ゼブラフィッシュは生命科学研究のみならず、医学研究にも広く利用されている。

われわれは、血管(血管内皮細胞や壁細胞)で蛍光バイオセンサーを発現するゼブラフィッシュを樹立し、共焦点蛍光顕微鏡下で血管新生プロセスのライブイメージングを行なっている。蛍光バイオセンサーとは、分子活性や細胞機能を可視化できる蛍光タンパク

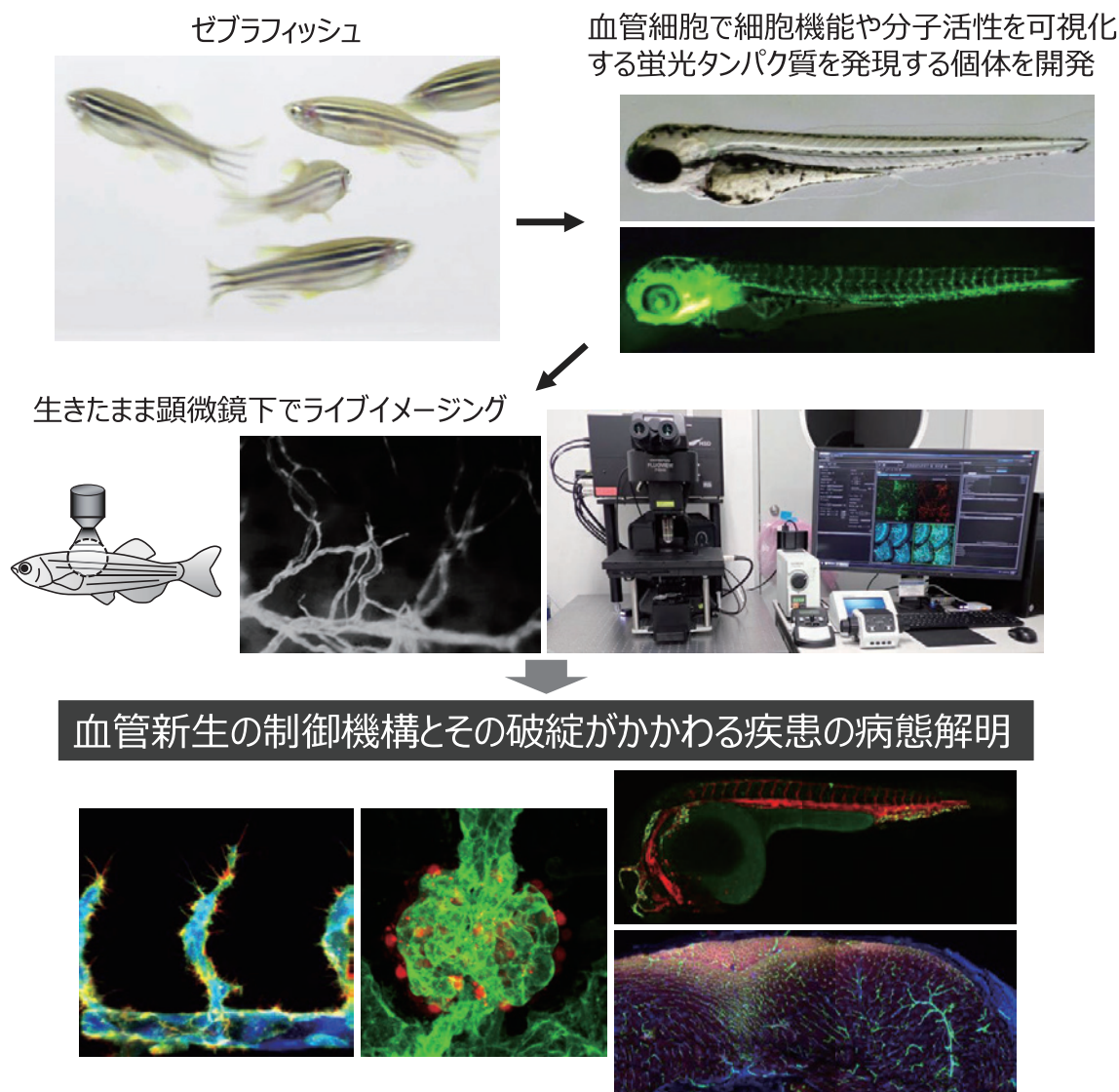


図2 蛍光イメージング技術を駆使した血管新生研究

血管内皮細胞・壁細胞で分子活性や細胞機能を可視化する蛍光バイオセンサーを発現するゼブラフィッシュを樹立し、共焦点蛍光顕微鏡下で生きたままイメージングすることで血管新生の制御機構を解析。

質であり、生きた個体で血管新生における内皮細胞機能やシグナル分子活性を解析することができる。例えば、内皮細胞における細胞周期を可視化するゼブラフィッシュを樹立し、血管新生における内皮細胞増殖の意義とその制御機構を明らかにしてきた¹⁶。また、細胞分化や発生、がんなどに関わる核転写調節因子 β -catenin の内皮細胞における転写活性を可視化するフィッシュを樹立・解析し、静脈内皮細胞分化における β -catenin の重要性を明らかにするとともに、その機能破綻が Klippel-Trenaunay 症候群と関連する可能性を示した¹⁷。さらに、血管新生における内皮細胞動態のライブイメージング解析により、低分子量 G タンパク質である Cdc42 とその下流で機能するアクチン調節

因子 Formin-like 3 が血管新生における内皮細胞遊走を制御することを発見した¹⁸。その他、共同研究により、血管新生やリンパ管形成、血管安定化にかかわるシグナル伝達系の解明にも貢献してきた¹⁹⁻²³。

(2) 成体において虚血によって誘導される生理的・病的血管新生に関する研究

組織が損傷などにより虚血状態に陥ると、血管新生が誘導され血管網を構築することにより、それを解消する。一方、がんの成長により腫瘍血管新生が誘導されると、創傷治癒に伴う血管新生とは異なり、無秩序で透過性の亢進した未熟な腫瘍血管が形成され、がんの悪性化に寄与する²⁴。しかし、血管新生が、生体に

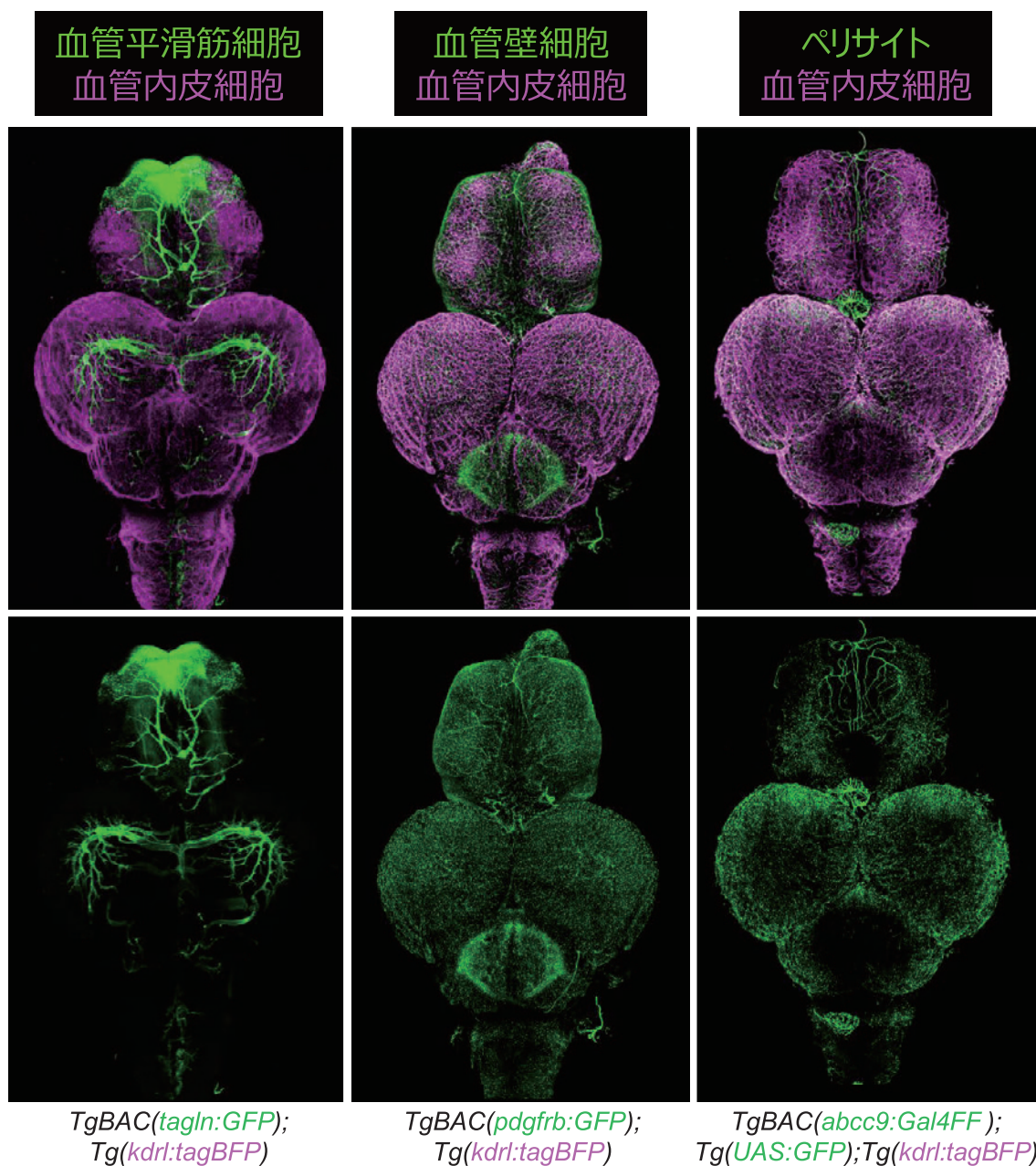


図3 ゼブラフィッシュ脳の血管壁細胞イメージング

血管壁細胞（血管平滑筋細胞・ペリサイト）および血管内皮細胞を異なる蛍光タンパク質で可視化したゼブラフィッシュ脳の血管イメージング。

とって真逆の効果をもたらす原因については未だ明らかにされていない。従って、この疑問の解明は、創傷治癒の遅延で起こる壊死や潰瘍、さらにはがんなど病的血管新生がかかわる疾患の治療法の開発につながると期待される。われわれは、ゼブラフィッシュを用いた蛍光イメージングにより、この疑問の解明を目指し研究を遂行している。

われわれは、これまで困難とされてきた、ゼブラフィッシュ成魚を長時間麻酔下で固定する技術を独自に開発し、創傷治癒における血管新生のライブイメー

ジングをおこない、組織修復における血管新生プロセスの全貌を明らかにした²⁵。これまで研究から、血管新生では、VEGFが血管壁から血管安定化に寄与するペリサイト（周皮細胞）を剝離することで内皮細胞の出芽を誘導し、逆にペリサイトが構築された新生血管を再び被覆することで血管新生が収束すると考えられてきた。一方、腫瘍血管新生では、新生血管へのペリサイトの動員が異常なため、未熟な血管網が形成され则认为られている²⁶。われわれは、内皮細胞・ペリサイトを異なる蛍光タンパク質で標識したゼブラフィッ

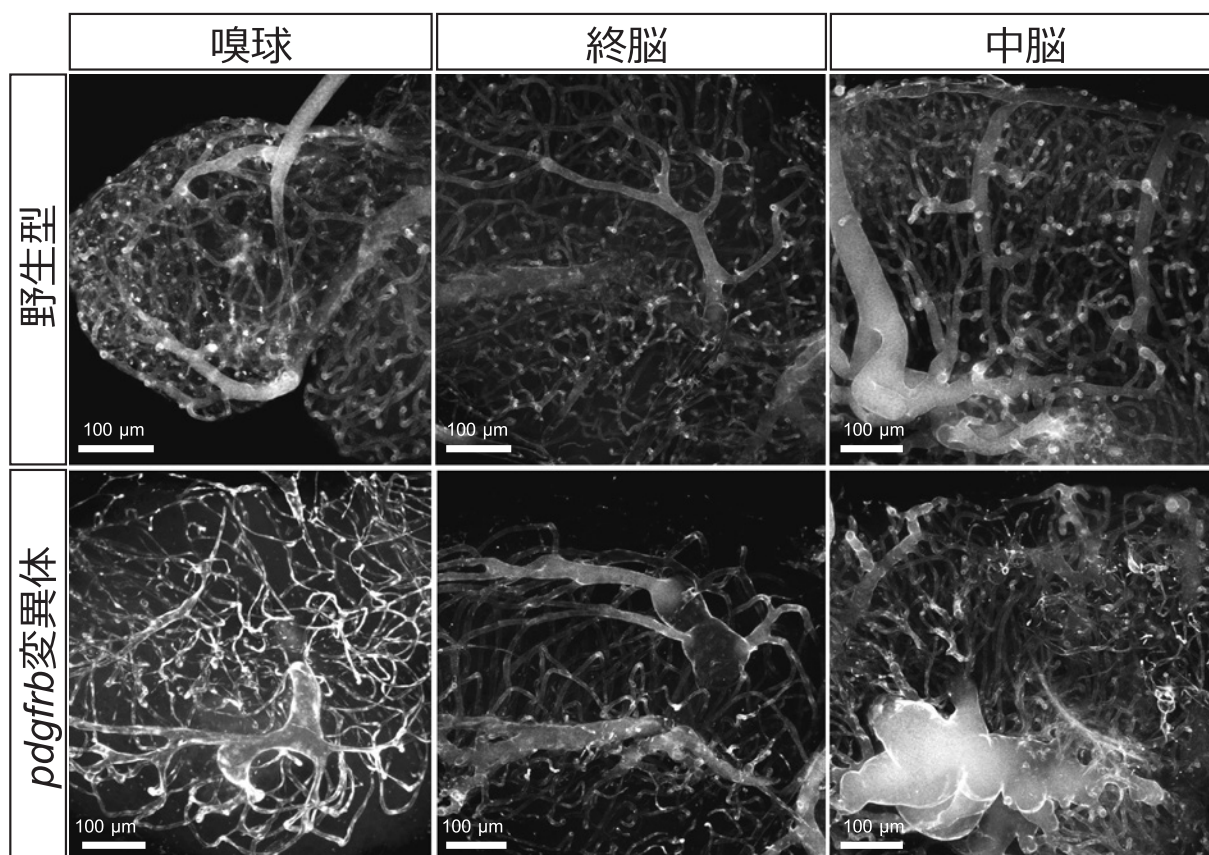


図4 血管壁細胞被覆の減少を呈する *pdgfrb* 変異体における脳血管異常

野生型および *pdgfrb* 変異体ゼブラフィッシュ脳の血管構造（正中矢状平面図）。血管壁細胞の被覆減少を呈する *pdgfrb* 変異体では、脳血管の形態異常を呈する。

シユを用いて、創傷治癒過程の血管新生を観察し、これら仮説の検証を行った。すると予想に反して、血管新生の誘導によってペリサイトは血管壁から解離せず、逆に内皮細胞とともに増殖し、蛇行血管を被覆することを発見した。この知見は、血管新生誘導時にペリサイトは活性化した内皮細胞を被覆することで過剰な内皮細胞の出芽を抑え、機能的な血管形成に寄与している可能性を示唆している。実際に、ペリサイト非存在下で創傷により血管新生を誘導すると、内皮細胞の出芽数が増加するとの本仮説を支持する結果を得ている（未発表）。これら知見は、腫瘍血管新生では、新生血管へのペリサイトの動員が異常なのではなく、血管新生の誘導によってペリサイトが増殖し血管壁を被覆できないため、無秩序で未熟な異常血管が形成される可能性を示している。今後、これら仮説の検証を通して、血管新生におけるペリサイトの真の機能が解明されれば、がんや糖尿病網膜症など病的血管新生がかわる疾患の病態解明につながり、これら疾患の革新的治療法を開発できるかもしれない。

2. 血管を被覆する壁細胞の発生と機能および疾患とのかかわり

血管は主に内腔面を構成する血管内皮細胞と、反腔側から内皮細胞を被覆する血管壁細胞からなる^{27,28}。血管壁細胞は、さらにペリサイトと血管平滑筋細胞の2種に大別される。ペリサイトは主に毛細血管を被覆する一方、血管平滑筋は動脈から細動脈までの比較的径の太い血管を被覆する。壁細胞の動員は血管形成や維持、並びに血管機能発現に必須の役割を持つ。実際に、遺伝的要因または加齢や生活習慣に伴った後天的要因による血管壁細胞の死滅や剥離、形質転換は循環器疾患や認知症など様々な疾患の発症や増悪に寄与することが知られている^{28,29}。われわれの研究室では、壁細胞の発生と機能に対する基礎的理解を、健常血管を保つことによる疾患の治療法・予防法の確立へと還元することを目指している。

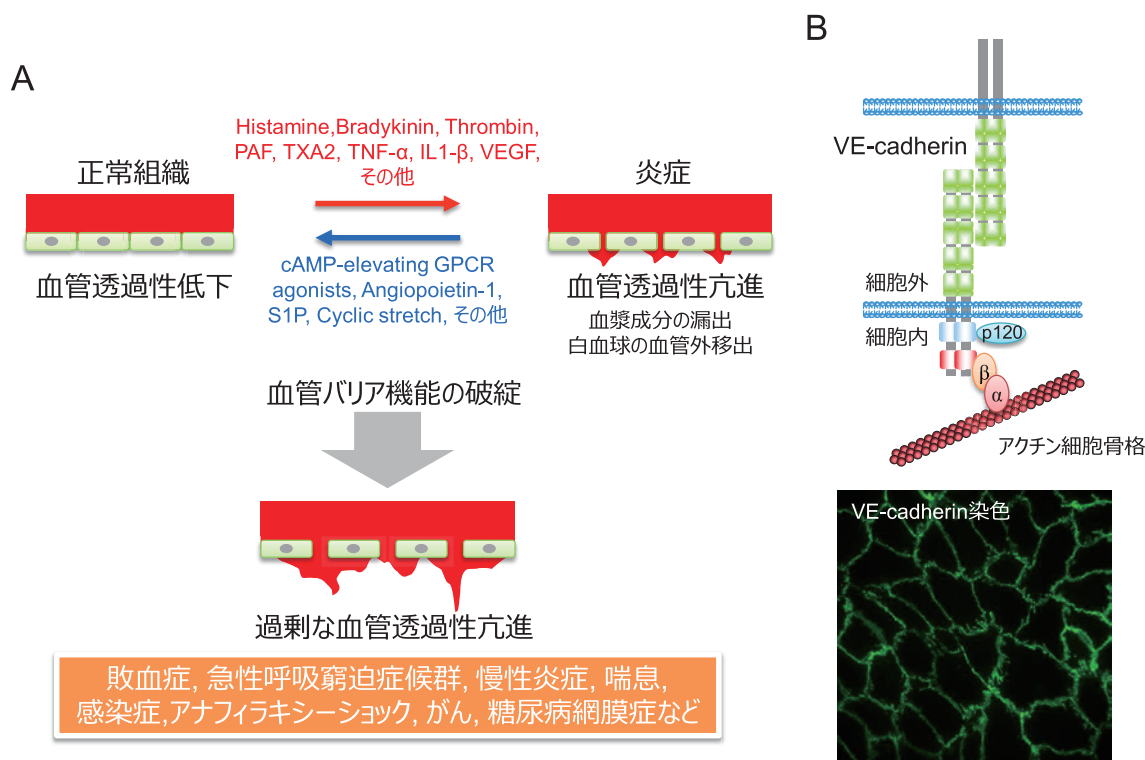


図5 血管透過性の制御機構

A. 血管透過性の制御機構とその破綻に関連する疾患. B. VE-cadherin の構造 (上) とヒト臍帯静脈血管内皮細胞における VE-cadherin の免疫染色 (下).

(I) ライブイメージング, オミクス解析, 数理モデリングを基盤とした血管壁細胞分化プロセスの包括的理解

これまでは生体内で簡便に血管壁細胞の分化や機能を解析出来るモデルがなかった. 壁細胞発生を制御する分子機構を解明するために *in vitro* の培養細胞が多く用いられてきたが, 壁細胞に限らず *in vitro* と生体内の応答には乖離が見られる場合が多い. 加えて, 血管壁細胞の発生に重要な周囲との細胞間相互作用や血流の影響も考慮し難い. また, ペリサイトに至っては *in vitro* の良い解析モデルさえなかった. そこで, われわれは蛍光タンパク質により壁細胞を可視化できる遺伝子改変ゼブラフィッシュを世界に先駆けて樹立し, ゼブラフィッシュをモデル生物とした壁細胞研究の基礎を確立してきた³⁰⁻³³ (図3). われわれは樹立したゼブラフィッシュシステムを駆使することで, 例えばこれまで解析が困難であった発生初期における前駆細胞から血管壁細胞への運命決定機構の一端を明らかにした. 生体内ライブイメージングにより, 血管壁細胞は血管内皮細胞周囲に存在する platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR β) 弱陽性の間葉系細胞から発生し, 血管内皮細胞に発現する Notch リガンドが

周囲の間葉系細胞の Notch2/Notch3 を活性化することにより血管壁細胞への分化を誘導することを明らかにした^{30,32}. 血管壁細胞は中胚葉または神経堤細胞に由来するとされるが, Notch シグナルはいずれの前駆細胞由来においても血管壁細胞への分化に必須であった. しかし, Notch 3 は脳血管壁細胞発生時に優位に機能し, Notch 2 は体幹部における血管壁細胞発生に優位に寄与することが分かった. Notch3 が脳血管の壁細胞発生において優位に機能することと一致して, これまでに脳微小血管障害を呈する遺伝性疾患である CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Sub-cortical Infarcts and Leukoencephalopathy) の原因遺伝子の一つに Notch 3 が報告されており, Notch 3 機能障害による血管壁細胞異常が病態形成に寄与するとされている³⁴. ゼブラフィッシュにおいても脳血管壁細胞の被覆が著しく減少する変異体を解析したところ, 脳出血や微小血管異常を呈することが分かった³¹ (図4). ゼブラフィッシュは薬剤スクリーニングにも有用なモデル生物であり, 上述の脳血管異常を呈する変異ゼブラフィッシュを用いて血管壁細胞障害に基づく血管異常を回復させる薬剤スクリーニングを行うことで, CADASIL を始めと

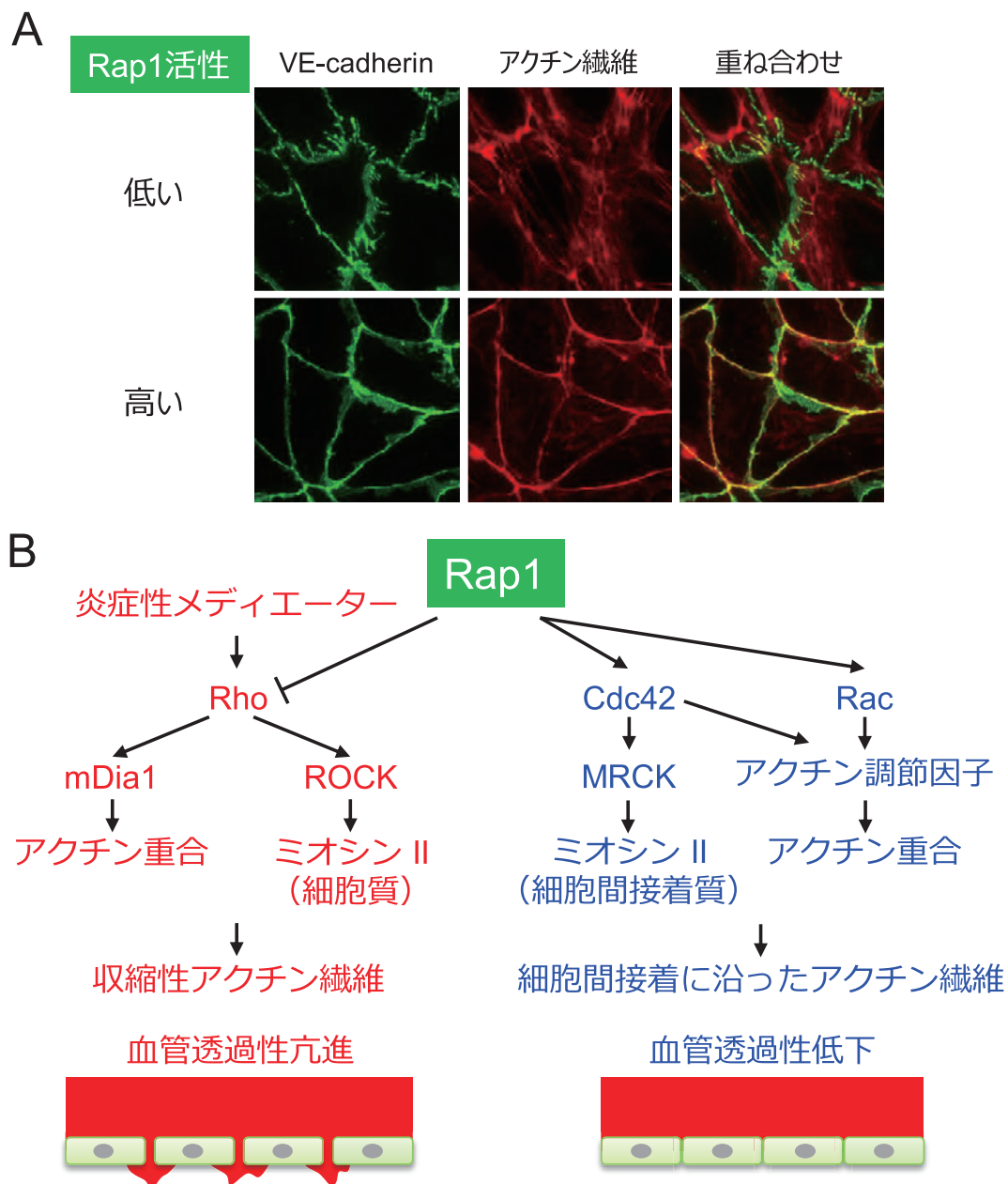


図6 Rap1 低分子量 G タンパク質による血管透過性の制御機構

A. vehicle (上) および Rap1 活性化剤 (007, 下) で処理したヒト臍帯静脈血管内皮細胞における VE-cadherin とアクチン繊維の染色画像. Rap1 活性が低い vehicle 処理細胞では, 細胞質に収縮性アクチン繊維が形成され VE-cadherin がジッパー状の構造を呈する (下). Rap1 活性化は, 収縮性アクチン繊維を消失し, その一方で細胞間接着部位に沿ったアクチン繊維を形成することで, VE-cadherin を細胞間接着部位で安定化する (上). B. Rap1 による血管透過性制御機構.

した脳血管性疾患の治療薬の開発に貢献するものと期待される.

これまでの生体内ライブイメージングから血管壁細胞は組織ごとに異なる前駆細胞から派生し, 血管壁細胞系譜への運命決定後にさらに段階的かつ組織ごとに異なる発生制御機構により発達することが分かってきた. 一方, 血管壁細胞が蛍光タンパク質で標識された

遺伝子改変ゼブラフィッシュでは, fluorescence-activated cell sorting を利用した血管壁細胞の (1 細胞) RNA シークエンスや ATAC シークエンスといったオミクス解析と親和性も高く, 組織における特定の時空間情報のある程度保持したまま 1 細胞レベルでの血管壁細胞の細胞形質情報を得ることが可能である. そこで, これまで得た壁細胞分化に関する時空間的知

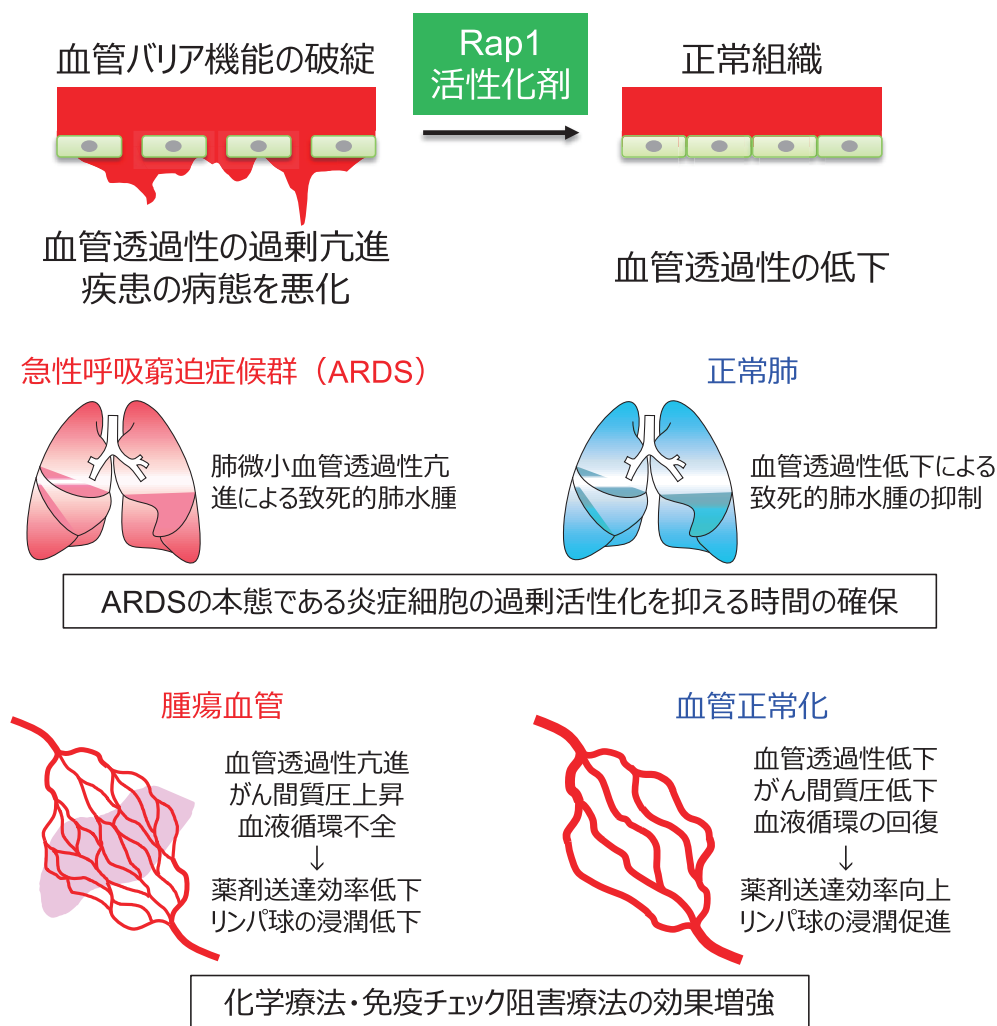


図7 血管透過性を標的とした創薬の可能性

Rap1 活性化剤は、血管透過性を標的とした新規治療薬となり得る。ARDSでは、血管透過性の過剰亢進により短期的に致死性病態が誘導されるが、本治療薬でこの致死性病態をコントロールできれば、ARDSの本態である炎症細胞の過剰な活性化を抑える時間を確保し治療させることができる。また、本治療薬は、がん組織における血管透過性を抑え、腫瘍血管を正常化することにより、抗がん剤や免疫チェックポイント阻害療法の治療効果を増強できる。

見に、オミクス解析を基盤とした数理モデリングを統合することで、壁細胞分化過程とその制御機構を広範かつ詳細に理解できると考えた。特に、十分に明らかにされていない1) 細胞分化系譜2) 壁細胞分化に関わる転写制御ネットワーク3) 臓器特異性の決定因子の解明に繋がると考えられる。われわれは現在、生体内ライブイメージングとオミクス解析に基づいたモデリングを組み合わせ、多様な前駆細胞から段階的に進行する血管壁細胞分化機構を包括的に紐解くことを目指し研究を進めている。本ゼブラフィッシュモデルの利点を活かし、高い時空間分解能を持って生体内で前駆細胞を含む血管壁細胞への分化をリアルタイムで観察し、標的的分化状態にある血管壁細胞形質を1細胞レ

ベルで解析している。ライブイメージング、オミクス解析、モデリングを基盤とし、実際に生体内で段階的に進行する血管壁細胞分化を捉え、あるがままの血管壁細胞動態と転写制御ネットワークを描写することを目指している。これまで画一的に解析されてきた壁細胞の発生を丁寧に由来・組織・時期に分け、各要素に分解した分化過程・制御機構を再構築し、壁細胞分化の全体像を正確かつ明確に記述することで、血管壁細胞発生異常が原因と考えられている血管性疾患の病態像の深い理解や、これまでに認知されていなかった病因を明らかにすることを目指す。

(2) 血管壁細胞の新たな機能とその破綻がもたらす疾患の病態解明

上記(1)の血管壁細胞発生機構の研究の過程で明らかになる血管壁細胞発現遺伝子から新たな細胞機能の探索・解析を同時に発展させていく。毛細血管を被覆するペリサイトは、血管形態や血液脳関門の形成・安定化に必須の役割を担うことが広く知られており、『脳梗塞⇒ペリサイト消失⇒脳血管障害⇒神経組織障害の増悪』という一つの病態カスケードが予想されている^{35,36}。しかし、如何にペリサイトが脳梗塞時の脳血管障害の緩和に寄与するのか、その分子メカニズムは不明である。そこで、われわれはペリサイトによる血管保護の分子メカニズムの解明と治療標的となり得るペリサイト遺伝子の同定を目指し、脳血管構成細胞集団のトランスクリプトームデータから明らかにしたペリサイト選択的遺伝子群の中から候補遺伝子の抽出を行い、ペリサイト選択的遺伝子XおよびYの機能解析を開始している。脳梗塞後の血管狭窄が酸素・神経栄養不足を引き起こすことや、血液脳関門の破綻による神経障害物質の組織移行が病態の増悪に寄与するとされるものの、血管正常化を標的にした治療薬は開発されていない。本研究が進展すれば、血管正常化薬といった新たな治療戦略の提示に繋がるかもしれない。一方で、脳梗塞の病態時にペリサイトがどのような役割を担うのか、その理解は他のneuro-vascular unitを構成する細胞種に比して格段に乏しい。実際にペリサイトも神経障害を感知するのか、またどのように応答するのかも明らかではない。従って、ペリサイトの機能を他細胞との相互作用を考慮しながら解明することは、病態像の深い理解や、新たな概念の創出に繋がる可能性を秘めている。そこで、これまで詳細が分かっていなかった脳梗塞によって生じるコア領域・ペナンプラ領域・周辺領域における経時的なペリサイトと他細胞種の分子相関ネットワークを明らかにし、得られた炎症関連因子群の発現情報を基に、脳梗塞に対するペリサイトの炎症反応における役割の解明を目指して研究を開始している。ペリサイトは他臓器の毛細血管も被覆するため、本研究の遂行を通して、虚血性心疾患や虚血性大腸炎などの、脳組織以外における過剰炎症による疾患の治療への応用・展開も期待される。興味深いことに、上述の遺伝子X,Yの遺伝子変異は心疾患を誘発することが報告されている。そこで、遺伝子X,Yのマウス心臓における発現を解析したところ成獣マウスでは脳組織と同様にペリサイト特異的に発現することが分かった。従って、ペリサイト機能異常が心疾患を誘発する可能性が示唆され、本仮説を検証することで

これまでにないペリサイト-心筋細胞間コミュニケーションによる心機能調節機構の提唱とその分子基盤の解明を目指している。本研究では、ペリサイトを起点とした全く新しい研究領域の開拓に挑戦することで、これまでにない(見過ごされていた)心疾患の発症機構の解明と治療戦略へと発展する可能性を有するものと期待している。

3. 血管透過性のダイナミックかつ巧妙な制御を司るシグナル伝達系とその破綻がもたらす疾患の病態解明および治療法の開発

血管の内腔面では、血管内皮細胞が互いに接着することでシート構造を形成し、血管透過性を低い状態に維持している。末梢組織の血管では、内皮特異的な接着分子vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin)が、細胞間接着を形成し、血管透過性をダイナミックかつ厳密に制御することで、生体恒常性を維持している³⁷⁻³⁹(図5)。正常組織では、VE-cadherinが安定な内皮細胞間接着を形成し、血管透過性を低い状態に維持しているが、感染や創傷などにより炎症が誘導されると、血管内皮細胞は、生体防御反応としてVE-cadherin接着を弱め、炎症細胞の血管外移出や血漿成分の血管外への漏出を引き起こす。しかし、VE-cadherin接着の制御機構が破綻すると、血管透過性が過剰に亢進し、様々な疾患の病態を悪化させる。例えば、敗血症や重症肺炎では、炎症性メディエーターが多量に産生され、VE-cadherin接着を破壊することで血管透過性を過剰に亢進し、非心原性肺水腫である急性呼吸窮迫症候群(ARDS)を誘導する⁴⁰。現在、世界で猛威を振るうCOVID-19で重症化する患者の多くもARDSを発症し、死に至ることが知られている⁴¹。しかし、これまでARDS病態を直接改善する治療薬は開発されていない。また、がん組織では、腫瘍血管の透過性亢進により組織間質圧が高く、薬物の送達効率や免疫細胞浸潤が抑えられている⁶。そのため、腫瘍血管の透過性を抑えることができれば、がんに対する薬物療法や免疫療法の効率を高めることができる。従って、ARDSやがんなど血管透過性の過剰亢進がかかわる疾患の治療法開発には、血管透過性をダイナミックかつ厳密に制御する分子メカニズムの解明が重要である。

われわれはこれまで、血管透過性を制御するシグナル伝達機構について研究を行ない、Rasファミリーに属する低分子量Gタンパク質Rap1が血管透過性制御の鍵分子であることを明らかにしてきた^{39,42-45}(図6)。ヒスタミンなどの炎症性メディエーターは、Rho低分子量Gタンパク質を介して収縮性アクチン繊維

(stress fiber, SF) を形成し, VE-cadherin 接着を弱め, 血管透過性を亢進する⁴⁶. われわれは, Rap1 は Rho を抑制することで SF の形成を抑え, その一方で, Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の別のメンバーである Cdc42 を活性化し, 細胞間接着に沿ったアクチン繊維 (circumferential actin bundle) を形成することで, VE-cadherin 接着を安定化し, 血管透過性を抑えることを明らかにした^{39, 42}. 即ち, Rap1 は Rho と Cdc 42 のバランス調節により, アクチン細胞骨格を再編し, 血管透過性をダイナミックかつ厳密に制御していると考えられる. 上記研究成果は, 主に血管内皮細胞を用いた *in vitro* 解析により得られたものであるが, 生体内における Rap1 の重要性についても明らかになりつつある. *rap1* 変異体ゼブラフィッシュは頭部出血を呈することから, Rap 1 は頭部血管のバリア機能に関与すると考えられる^{47, 48}. また, 血管内皮細胞特異的 *Rap1* 欠損マウスの解析も進めており, 同マウスは血管透過性亢進により致死となることを確認している (未発表). これら知見は, Rap1 を基軸とした血管透過性制御シグナルが生体内でも機能していることを強く示唆している.

われわれは, Rap1 シグナルが血管透過性の亢進がかわる疾患の創薬ターゲットになると考え, 現存しない血管透過性抑制薬の開発を見据え研究を推進している (図 7). 実際, Rap1 活性化能を有する化合物が, VEGF や炎症に伴う血管透過性亢進を抑えることを, マウスを用いた *in vivo* 実験により確認している⁴³ (未発表). これまで血管透過性を標的とした治療薬は存在せず, Rap1 活性化剤が ARDS やがんなどの疾患の病態を改善する革新的な治療薬となるかもしれない. 例えば, ARDS では, 血管透過性の過剰亢進により短期的に致死性病態が誘導されるが, 本治療薬でこの致死性病態をコントロールできれば, ARDS の本態である炎症細胞の過剰な活性化を抑える時間を確保し治癒させることができる可能性がある. そのため, ARDS 病態の発症が重症化につながる COVID-19 の治療薬としても有効かもしれない. また, 本治療薬は, がん組織における血管透過性を抑え, 腫瘍血管を正常化することにより, 抗がん剤や免疫チェックポイント阻害療法の治療効果を増強する可能性があり, がんの新たな治療戦略として利用できるかもしれない.

おわりに

本稿では, 先端医学研究所 病態解析学部門で行っている血管研究の主なプロジェクトについて紹介した. 今回紹介した研究成果以外にも, メカニカル刺激によ

る血管新生の新たな制御機構 (論文投稿中), 腎臓の糸球体毛細血管網の形成機構 (論文投稿中), 血管による肺胞形成の制御機構に関する重要な発見をしており, 別の機会にこれら研究成果についても紹介したい.

近年, 日本の基礎研究力の低下が問題視されている. 文部科学省が発表した「科学技術指標 2021」によると, 注目度の高い科学論文の数が, 中国が米国を抜いて首位となる一方, 日本は世界 10 位であることが報告された. われわれの使命は, 医学の発展を通して社会に貢献することであるが, そのためには目先の利益だけにとらわれた研究ではなく, 地に足のついたしっかりと基礎医学研究を実践することが重要であると考えている. そのために, 今後も強い探求心をもって研究に取り組み, 生命の要である血管研究を推進することで, 医学の発展に貢献していきたいと考えている.

今回紹介した研究は, 私国立循環器病研究センター研究所在籍時に開始し, 日本医科大学に赴任後, 先端医学研究所病態解析学部門で発展させてきたものです. これまで多大なご支援を賜りました国立循環器病研究センター研究所所長望月直樹先生, このような研究する機会を与えてくださった日本医科大学および先端医学研究所の皆様へ深く御礼申し上げます. また, いつも研究の推進に尽力してれる病態解析学部門のメンバーに感謝致します.

Conflict of Interest : 開示すべき利益相反はなし

文 献

1. Eelen G, Treps L, Li X, Carmeliet P: Basic and therapeutic aspects of angiogenesis updated. *Circ Res* 2020; 127: 310-329.
2. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P: Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 2011; 146: 873-887.
3. Gianni-Barrera R, et al: Therapeutic vascularization in regenerative medicine. *STEM CELLS Trans Med* 2020; 9: 433-444.
4. Folkman J: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.
5. Ferrara N, Hillan K J, Gerber H P, Novotny W: Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 391-400.
6. Jain Rakesh K: Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. *Cancer Cel* 2014; 26: 605-622.
7. Augustin H G, Koh G Y, Thurston G, Alitalo K: Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 165-177.
8. Fukuhara S, et al: Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol* 2008; 10:

- 513–526.
9. Sako K, et al.: Angiopoietin-1 induces Kruppel-like factor 2 expression through a phosphoinositide 3-kinase/AKT-dependent activation of myocyte enhancer factor 2. *J Biol Chem* 2009; 284: 5592–5601.
10. Zhang J; et al.: Angiopoietin-1/Tie2 signal augments basal Notch signal controlling vascular quiescence by inducing delta-like 4 expression through AKT-mediated activation of beta-catenin. *J Biol Chem* 2011; 286: 8055–8066.
11. Fukuhara S, et al.: Tie2 is tied at the cell-cell contacts and to extracellular matrix by angiopoietin-1. *Exp Mol Med* 2009; 41: 133–139.
12. Fukuhara S, et al.: Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis. *Histol Histopathol* 2010; 25: 387–396.
13. Aoki K, Kamioka Y, Matsuda M: Fluorescence resonance energy transfer imaging of cell signaling from in vitro to in vivo: basis of biosensor construction, live imaging, and image processing. *Dev Growth Differ* 2013; 55: 515–522.
14. Miyawaki A, Niino Y: Molecular spies for bioimaging–fluorescent protein-based probes. *Mol Cell* 2015; 58: 632–643.
15. Fukuhara S, et al.: Looking back and moving forward: recent advances in understanding of cardiovascular development by imaging of zebrafish. *Dev Growth Differ* 2015; 57: 333–340.
16. Fukuhara S, et al.: Visualizing the cell-cycle progression of endothelial cells in zebrafish. *Dev Biol* 2014; 393: 10–23.
17. Kashiwada T, et al.: β -catenin-dependent transcription is central to Bmp-mediated formation of venous vessels. *Development* 2015; 142: 497–509.
18. Wakayama Y, Fukuhara S, Ando K, Matsuda M, Mochizuki N: Cdc42 mediates Bmp-induced sprouting angiogenesis through Fmn13-driven assembly of endothelial filopodia in zebrafish. *Dev Cell* 2015; 32: 109–122.
19. Kwon H B, et al.: The parallel growth of motoneuron axons with the dorsal aorta depends on Vegfc/Vegfr3 signaling in zebrafish. *Development* 2013; 140: 4081–4090.
20. Yokota Y, et al.: Endothelial Ca²⁺ oscillations reflect VEGFR signaling-regulated angiogenic capacity in vivo. *Elife* 2015; 4.
21. Vanhollebeke B, et al.: Tip cell-specific requirement for an atypical Gpr124- and Reck-dependent Wnt/ β -catenin pathway during brain angiogenesis. *Elife* 2015; 4.
22. Nakajima H, et al.: Flow-dependent endothelial YAP regulation contributes to vessel maintenance. *Dev Cell* 2017; 40: 523–536 e526.
23. Shin M, et al.: Valves are a conserved feature of the zebrafish lymphatic system. *Dev Cell* 2019; 51: 374–386. e375.
24. Weis S M, Cheresh D A: Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* 2011; 17: 1359–1370.
25. Noishiki C, et al.: Live imaging of angiogenesis during cutaneous wound healing in adult zebrafish. *Angiogenesis* 2019.
26. Carmeliet P, Jain R K: Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; 473: 298–307.
27. Gaengel K, Genov^Å G, Armulik A, Betsholtz C: Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 630–638.
28. Armulik A, Genov^e G, Betsholtz C: Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell* 2011; 21: 193–215.
29. Chistiakov D A, Orekhov A N, Bobryshev Y V: Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol (Oxf)* 2015; 214: 33–50.
30. Ando K, et al.: Clarification of mural cell coverage of vascular endothelial cells by live imaging of zebrafish. *Development* 2016; 143: 1328–1339.
31. Ando K, et al.: Conserved and context-dependent roles for pdgfrb signaling during zebrafish vascular mural cell development. *Dev Biol* 2021; 479: 11–22.
32. Ando K, et al.: Peri-arterial specification of vascular mural cells from naive mesenchyme requires Notch signaling. *Development* 2019; 146.
33. Vanlandewijck M, et al.: A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature* 2018; 554: 475–480.
34. Coupland K, Lendahl U, Karlström H: Role of NOTCH3 mutations in the cerebral small vessel disease cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Stroke* 2018; 49: 2793–2800.
35. Gautam J, Yao Y: Roles of pericytes in stroke pathogenesis. *Cell Transplant* 2018; 27: 1798–1808.
36. Dalkara T: Pericytes. *Stroke* 2019; 50: 2985–2991.
37. Dejana E, Vestweber D: The role of VE-cadherin in vascular morphogenesis and permeability control. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013; 116: 119–144.
38. Giannotta M, Trani M, Dejana E: VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell* 2013; 26: 441–454.
39. Rho S S, Ando K, Fukuhara S: Dynamic regulation of vascular permeability by vascular endothelial cadherin-mediated endothelial cell-cell junctions. *J Nippon Med Sch* 2017; 84: 148–159.
40. Matthay M A, et al.: Acute respiratory distress syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 2019; 5: 18.
41. Grasselli G, et al.: Pathophysiology of COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome: a multicentre prospective observational study. *The Lancet Resp Med* 2020; 8: 1201–1208.
42. Ando K, et al.: Rap1 potentiates endothelial cell junctions by spatially controlling myosin II activity and actin organization. *J Cell Biol* 2013; 202: 901–916.
43. Fukuhara S, et al.: Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 136–146.
44. Noda K, et al.: Vascular endothelial-cadherin stabilizes at cell-cell junctions by anchoring to circumferential actin bundles through α - and β -catenins in cyclic AMP-Epac-Rap1 signal-activated endothelial cells. *Mol Biol Cell* 2010; 21: 584–596.
45. Fukuhara S, et al.: The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J Clin Invest* 2012; 122: 1416–1426.
46. Mikelis C M, et al.: RhoA and ROCK mediate

histamine-induced vascular leakage and anaphylactic shock. *Nat Commun* 2015; 6.

47. Rho S S, et al.: Rap1b promotes Notch-signal-mediated hematopoietic stem cell development by enhancing integrin-mediated cell adhesion. *Dev Cell* 2019; 49: 681-696. e686.
48. Rho S S, et al.: Protocol for analysis of integrin-mediated cell adhesion of lateral plate mesoderm cells isolated from zebrafish embryos. *STAR protocols* 2021; 2: 100428.

(受付：2021 年 8 月 28 日)

(受理：2021 年 9 月 21 日)

日本医科大学医学会雑誌は、本論文に対して、クリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 (CC BY NC ND) ライセンス (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) を採用した。ライセンス採用後も、すべての論文の著作権については、日本医科大学医学会が保持するものとする。ライセンスが付与された論文については、非営利目的で、元の論文のクレジットを表示することを条件に、すべての者が、ダウンロード、二次使用、複製、再印刷、頒布を行うことが出来る。