

## 血管内皮細胞と接着・近接する細胞との相互制御 —血管新生・恒常性の維持—

福原茂朋, 望月直樹

がん・虚血性疾患における血管新生の抑制・促進を明らかにするために接着・解離・分枝などの分子メカニズムの解明が勢力的に行われてきた。また、血管は組織への酸素・栄養の供給に必要な透過性を調節することから、接着と解離に焦点があてられてきた。血管発生からの知見、あるいは既知の分子の新たな機能の検討から血管新生の新たな概念 (tip 細胞・stalk 細胞) も提唱されている。血管は内腔からの増殖因子による刺激だけではなく、機械的刺激も受ける特殊な臓器である。このため、他の臓器細胞にも共通な情報伝達系とともに血管内皮細胞特異的なものもある。このような情報伝達系も血管の維持あるいは新生の根本的なシグナルを担っている。本総説ではここ数年の間に新たに確立されつつある血管維持・新生機構をまとめてみた。

### 1. はじめに

血管内皮細胞は、発生段階で血球・血管に分化できるヘマンジオブラストから発生し、血管内腔を覆う一層の細胞のシートとなる<sup>1-4)</sup>。大血管・筋性血管では内腔を覆うことで血液を円滑に通過させるが、毛細血管では血液内の物質あるいは血球の組織への透過性を制御する細胞集団としての機能を発揮する<sup>5)</sup>。また、接する細胞あるいは間充織に対してもそれらの組織への調節因子を分泌することで、血管外組織との相互調節作用も有している。それ故に血管が単なる生体の構造基盤としてではなく、臓器組織として認識されるようになってきている。内皮細胞は、細胞表面からの刺激を受ける点でも上皮細胞とは受容体系も異なっている。血管内腔の血管内皮細胞は、血液によるずり応力を受け、また、血液中の様々な因子によって受容体が刺激

を受ける。しかし、上皮細胞ではこのような刺激による細胞内情報伝達系の活性化は見られない。血管内皮細胞特異的チロシンキナーゼ受容体、血管内皮細胞特異的接着分子を発現することにより血管ならではの生命維持機構を果たしている<sup>6)</sup>。

チロシンキナーゼ受容体である血管内皮増殖因子 (VEGF) 受容体 (VEGFR), Tie 受容体, Eph 受容体の機能が血管形成には不可欠である<sup>7)</sup>。VEGFR は血中からの VEGF 刺激によって活性化される受容体で、VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (Flk1, KDR) と VEGFR3 (Flt4) からなる<sup>8)</sup>。VEGF には主に血管内皮細胞に作用する VEGF-A, B と、placenta growth factor とリンパ管内皮細胞に作用する VEGF-C, D がある。Tie 受容体は Tie1, Tie2 受容体があり、そのリガンドのアンジオポイエチン (Ang) は Ang1-4 からなるファミリーである。Ang1-Tie2 系による血管内皮細胞の生存にかかわる機能はよく研究されているが、Tie1, Ang2-4 については未だ不明な点が多い。Eph 受容体体系の重要性は ephrinB2, EphB4 の発現がそれぞれ動脈・静脈内皮細胞への分化に必須であることで示された<sup>9,10)</sup>。

血管内皮細胞間の接着分子としてはカドヘリンスーパーファミリーに属する血管内皮 (VE) カドヘリンが重要である。これは VE-カドヘリンノックアウトの ES 細胞が血管構築を示さないことや致死であることから明らか

国立循環器病センター研究所循環器形態部 (〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1)

Vascular endothelial cells and adjoining cells for their mutual adhesion/interaction for stabilization and angiogenesis  
Shigetomo Fukuhara and Naoki Mochizuki (Department of Structural Analysis, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan)

である<sup>11,12)</sup>. platelet and endothelial adhesion molecule-1 (PECAM-1), claudinファミリーの claudin5や junctional adhesion molecule (JAM)ファミリー分子, ネクチンファミリー分子が内皮細胞間接着を調節している<sup>13~16)</sup>(図1). これらの分子群のなかで血球細胞との細胞間接着にもかかわる分子は血球細胞の血管外への浸潤(extravasation)も調節している<sup>17)</sup>. 一度浸潤した血球や, 骨髄・胸腺からの血球の血管内への侵入(intravasation)にも接着分子は重要である<sup>18)</sup>. 血管内皮細胞は周囲の細胞外マトリクスの形成や血管内皮細胞と接する周細胞・血管平滑筋細胞ともN-カドヘリンを介して接する. 血管内皮細胞間接着と血管内皮細胞と隣接する細胞の接着が血管の成熟・安定化をもたらす. 血管が張り巡らされることは栄養組織・臓器への酸素あるいは栄養源の提供のために不可欠であるのは明らかであるが, 血管内皮細胞同士の接着あるいは毛細血管内皮細胞と近接する細胞との相互作用が血管の恒常性にも不可欠である.

細胞間接着と情報伝達機構を調節する受容体と細胞間接着の制御系が, 血管新生あるいは一度構築された血管の恒常性を維持しているか否かを理解することは重要である. 血管新生・恒常性の理解は, 血管だけでなく血管と臓器・組織との相互作用さらには血管の生体での幹細胞のニッチとしての役割まで含めて考えなければならない. 本総説ではこのような局所(血管自身と血管外細胞環境)での情報伝達系と細胞間接着の最近の知見と進歩を紹介したい.

## 2. 血管特異的な情報伝達系: VEGF/VEGFR, Ang/Tie

VEGF-VEGFR系が血管の新生に不可欠であることは, VEGFR1, VEGFR2のノックアウトマウスの解析で明らかである. また, VEGFR受容体(VEGFR2)の活性化はホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3-K)-Aktを介して血管内皮細胞の生存維持を調節していることが示されていた<sup>19)</sup>. 最近 Iruela-Arispeのグループは, 血管内皮細胞から分泌されるVEGFを無くすことにより血管の維持が

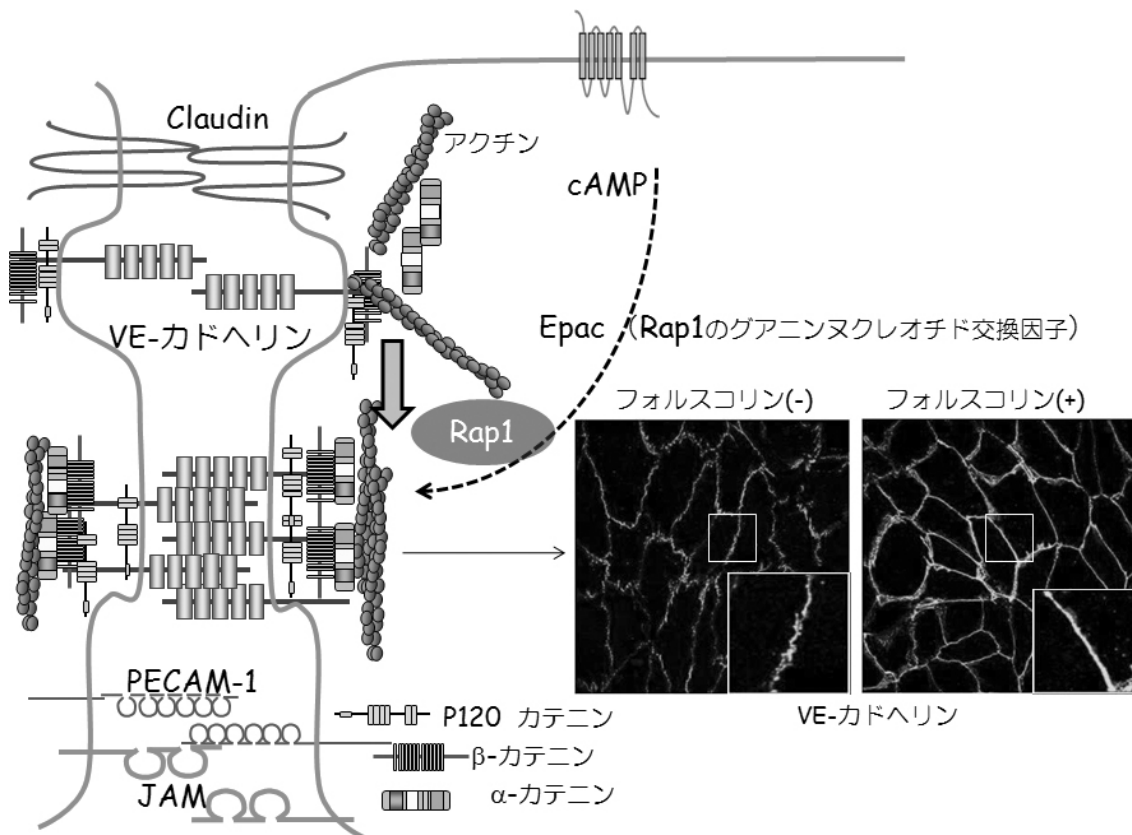


図1 血管内皮細胞接着分子

血管内皮細胞同士は接着分子 claudin, VE-カドヘリン, PECAM-1, JAM がホモフィリックな結合をすることで接着している. VE-カドヘリンの細胞内ドメインは p120 カテニンと β-カテニンに結合し, β-カテニンは α-カテニンを介してアクチンに結合する. このアクチンの裏打ちによって VE-カドヘリンを介した細胞間接着が増強される. cAMP は Epac-Rap1 を介して VE-カドヘリンの細胞間接着部位への集積を促進するが, このメカニズムは VE-カドヘリンの β-カテニン/α-カテニンによるアクチンへの結合である. 右下図は血管内皮細胞をアデニル酸シクラーゼの活性化薬フォスコリンで刺激した細胞を抗 VE-カドヘリン抗体で蛍光染色した結果である. VE-カドヘリンの染色が細胞間接着部位で線状になり, かつ蛍光強度も増加していることがわかる.

できなくなることから、血管内皮細胞における自立的な VEGF-VEGFR2 系の重要性を見出した<sup>20)</sup>。VEGFが血管内皮細胞の生存に不可欠であることは疑問の余地はないが、VEGFR2の活性化は血管内皮細胞の安定な接着を解除するシグナルでもある。血管内皮細胞の安定化は細胞間接着に依存しているため、細胞間接着分子の VEGF 刺激による挙動が検討されてきた。また、血管内皮細胞の解離のメカニズムの解明は、血管新生を VEGF が如何に制御しているかを知るためにも重要である。VEGFR2の活性化は Src キナーゼを介した VE-カドヘリンの Tyr685 のリン酸化により VE-カドヘリン接着を減弱させることが明らかにされている<sup>21)</sup>。さらに、Src キナーゼは Vav (Rac のグアニンヌクレオチド交換因子)-Rac-PAK シグナルにより VE-カドヘリンの Ser665 をリン酸化し、VE-カドヘリンのエンドサイトーシスを促進し接着を弱めることも明らかにされた<sup>22)</sup>。

一方、VE-カドヘリンが VEGF シグナルを抑制する機構も明らかにされてきている。VE-カドヘリンと細胞内ドメインに結合する  $\beta$ -カテニンとの複合体が VE-カドヘリンの接着依存性に VEGFR2 の活性化を抑制することが示された<sup>23)</sup>。さらに、VEGF 刺激により VEGFR2 はエンドサイトーシスされるが、VE-カドヘリンが発現している時には VEGFR2 のエンドサイトーシスが抑制されて VEGFR2 が膜上に残るために、エンドサイトーシスされた VEGFR2 から細胞内に伝わるはずの本来の持続シグナルが見られなくなるが、VE-カドヘリンの VEGF シグナルの抑制機構として報告された<sup>24)</sup>。最近になって、VE-カドヘリンが Rho の活性化とアクチン-ミオシンの収縮を調節し、VEGFR2 による Rac1 の活性化によって起きる血管新生を抑制していることも明らかになった<sup>25)</sup>。

Ang1 は主に血管の安定化シグナルを惹起すると考えら

れている<sup>26,27)</sup>。しかし、Ang1-Tie2 シグナルは血管新生に必要であり、VEGF 同様に Ang1 も血管内皮細胞安定化と血管新生促進という相反するシグナルを調節している。この機構の詳細は明らかになっていなかった。われわれと Alitalo のグループは、血管内皮細胞接着の有無によって Ang1-Tie2 の下流のシグナルが異なることを突き止めた<sup>28,29)</sup>。内皮細胞間の接着が存在する場合には、多量体の Ang1 が隣り合う細胞間の Tie2 を架橋してトランス結合を生じさせる。一方、細胞間接着が存在しない孤立した内皮細胞では、Ang1 は細胞外基質に結合して Tie2 を細胞-基質間接着部位に繫留する。前者は AKT の後者では ERK の活性化が優位となる。後者の ERK の活性化メカニズムとして、Ang1-Tie2 の細胞-基質間接着がきっかけとなって、インテグリンを介した細胞-基質間接着も促進されるためにインテグリンシグナルの下流で focal adhesion kinase (FAK)-ERK の活性化が生じることを明らかにした。細胞間接着による、AKT の活性化に伴い様々な分子が発現してくるが、なかでも転写因子 Krüppel-like factor 2 (KLF2) の発現が Ang1 によって増加する。このメカニズムを検討したところ AKT-MEF2 によって KLF2 の転写誘導が生じることを突き止めた<sup>30)</sup>。KLF2 は、血管内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の転写を増加する一方で vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) の転写を抑制する。前者は血管の弛緩に後者では白血球の接着抑制による抗炎症に働いている<sup>31,32)</sup> (図 2)。

血管における ephrin/Eph のシグナル伝達機構についても新たな知見が蓄積されてきた (ephrin/Eph の双方向性の細胞内情報伝達の詳細については他の総説を参照されたい<sup>33)</sup>)。ephrinB2, EphB4 が内皮細胞の動脈内皮、静脈内皮への分化を決定することは先に述べたが、その詳細な分化機構が明らかにされ、ゼブラフィッシュ、マウスの遺伝学

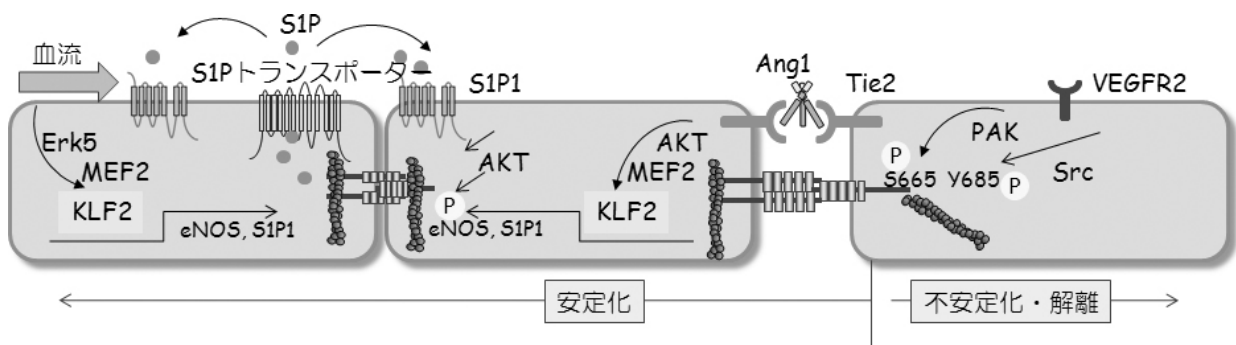


図 2 血管内皮細胞間接着の安定化・解離を調節する細胞内シグナル

血管内腔を覆う血管内皮細胞は、血流 (shear stress) を感知する機構 (本文中に詳述) あるいは血管からの液性因子 (S1P, Ang1, VEGF) などの刺激を受けることで血管の安定化あるいは接着の解離を決定している。血流・Ang1 刺激の両者によって転写因子 KLF2 の発現が増加して KLF2 が制御する eNOS や S1P1 受容体が増加し、安定化がもたらされる。S1P が Spns2 (S1P トランスポーター) によって細胞外に輸送され S1P1 を活性化することも安定化に寄与しているかもしれない。一方 VEGFR2 の活性化により VE-カドヘリンの細胞内ドメインの Ser665, Tyr685 がリン酸化され VE-カドヘリン接着が減弱する。Ang1, アンジオポイエチン-1; KLF2, Krüppel-like factor 2; S1P, スフィンゴシン 1-リン酸; S1P1, S1P 受容体 1

的解析から ephrinB2, EphB4 の発現制御が示された。発生において notocord から sonic hedgehog シグナルを受けた体節の細胞が VEGF を分泌する<sup>34,35</sup>。さらに背側大動脈の血管内皮細胞の VEGFR2 活性化に伴い転写因子 FoxC1, C2 による Delta (Dll4)-Notch 受容体の転写が増加する<sup>36</sup>。Notch 受容体の細胞内ドメインが細胞膜で切断されることによりゼブラフィッシュでは Gridlock, マウスでは Hes1/2 が発現し, ephrinB2 が細胞表面に発現して動脈内皮細胞化が進むことがわかった<sup>37,38</sup>。ここで重要なシグナルとして VEGFR2-Dll4-Notch が働くことで動脈形成が行われる<sup>39</sup>。血管形成と Notch シグナルについては詳しい総説がある<sup>40</sup>。静脈の分化における転写調節系の働きも明らかになってきた。核内受容体の COUP-TFII 転写因子の発現パターンが静脈系だけに限局されていること, また COUP-TFII の欠損により動脈化を生じることから COUP-TFII が静脈内皮細胞のマスター分子として機能することがわかった。COUP-TFII は Notch シグナルを抑制することからも動・静脈への分化調節を担っていると考えられる(図3)。

さらについ最近, あらたな血管発生機構があることがゼブラフィッシュで報告された。発生における血管形成は脈管形成と血管新生からなるのに対して, がん・虚血性血管

新生には脈管形成は殆ど関係がないことがわかってきた<sup>41,42</sup>。これらの発生時, 病態時での血管形成機構とは異なる新たなメカニズムが見つかった。前駆血管(背側大動脈と考えられていた)内にある EphB4 細胞が前駆細胞より遊走して cardinal vein を前駆血管の腹側に平行して形成する。つまりもともとは前駆血管であったものが背側大動脈(dorsal aorta)・後主静脈(posterior cardinal vein)になることをイメージング手法を駆使して明らかにした<sup>43</sup>。血管発生・新生において tip 細胞により接着する stalk 細胞の支配についても VEGFR2-Dll4 (tip 細胞)-Notch シグナル(stalk 細胞)による制御が不可欠であることが次々と個体で証明された<sup>44~47</sup>。さらに Notch リガンドの Dll4 と Jagged1 が血管新生に対して拮抗的に作用することも判明し<sup>48</sup>、Notch シグナルの未解明な点も多いことが予想された。

血管内皮細胞の生存と安定化, 内皮細胞間接着制御に重要な受容体としてスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体が機能している。S1P 受容体は S1P1-S1P5 からなるファミリーを形成し血管内皮細胞には S1P1, S1P3 受容体が主に発現している<sup>49</sup>。S1P1 受容体刺激によって血管内皮細胞の透過性が抑制される<sup>50~52</sup>。Ang1 による血管内皮細胞接着の安定化にスフィンゴシンから S1P への変換酵素であ

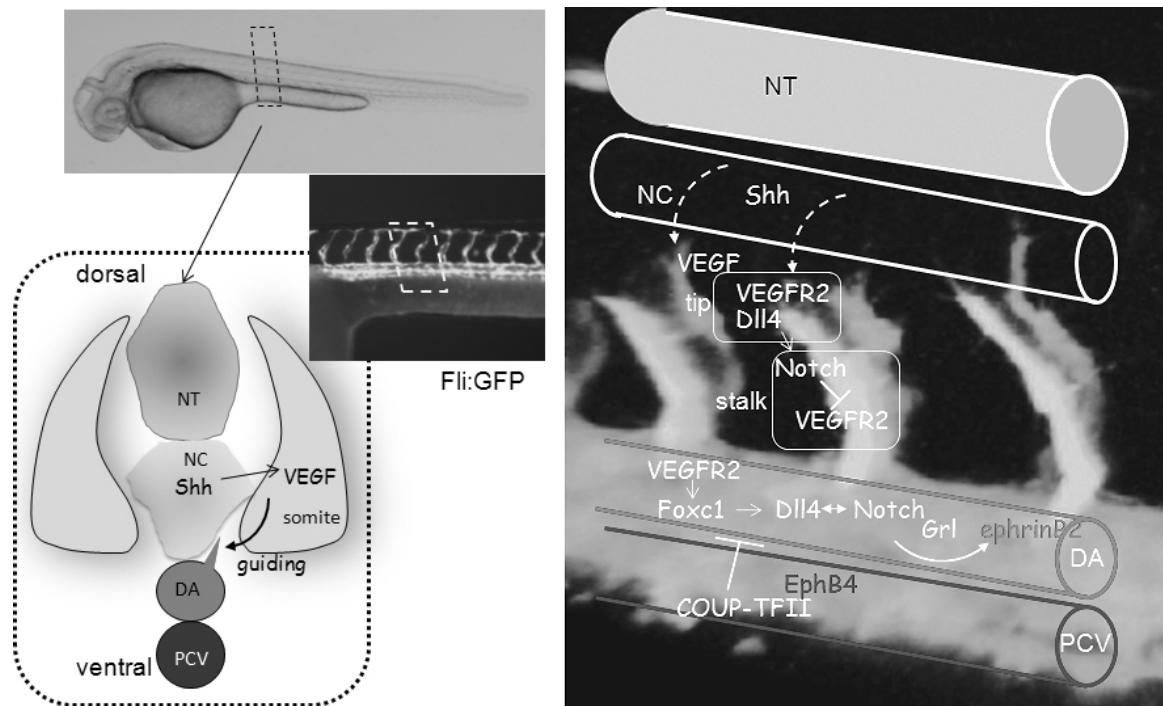


図3 血管発生における新生・安定化シグナル

ゼブラフィッシュの節間血管の発生におけるガイダンスシグナル。脊索は, 体節からの shh の刺激を受けて VEGF を分泌する (左下)。VEGF は背側大動脈からの節間血管の分枝と伸張を促進する (走行調節)。脊索から分泌される VEGF が血管内皮細胞の先端細胞に発現する VEGFR2 を活性化して, Dll4 の発現を誘導する。Notch を発現する血管茎細胞は VEGFR2 の発現が抑制されるために VEGF に対して反応しなくなることで安定化につながる(右)。

Fli: GFP, Fli プロモーターで GFP を発現するゼブラフィッシュ; Shh, sonic hedgehog; Grl, grid lock.

るスフィンゴシンキナーゼが重要であるとの報告もある<sup>53</sup>。S1Pがどの細胞由来であるかは、これまで議論のあるところである。血小板・赤血球が主要なS1P産生細胞であるのかどうかについては決着がついていない<sup>54</sup>。S1Pはスフィンゴシンキナーゼによって細胞内で生成されるために、細胞膜表面にあるS1P受容体に結合して活性化するためには細胞外輸送システムがなくてはならない。ABCトランスポーターがS1Pの細胞外輸送を担うという報告もあったが決定的ではなかった<sup>54</sup>。われわれはゼブラフィッシュの順遺伝学手法によりS1PトランスポーターSpinster2 (Spns2)を同定した<sup>55</sup>。今後Spns2の哺乳類での機能を検討して血漿S1PのうちどれくらいがSpns2のS1P輸送に依存するのかを検討し、S1Pの生理的機能を明らかにしていきたい。

### 3. 血流による血管形成・安定化機構と造血

血管内皮細胞は、上記の分泌性因子からの刺激を受けるだけでなく、機械的な刺激を血流から受けるという特徴をもつ。血管発生に伴って血流が開始され、生体への酸素・栄養源の供給が始まることから血流の重要性は明らかである。血管が血流反応性に弛緩することは臨床的にも認められており、eNOS依存性にこの弛緩反応が生じることが明らかにされてきた<sup>56</sup>。血管内皮細胞が血流の機械的刺激を受けて細胞内情報伝達系を活性化するメカニズムも明らかにされてきた<sup>57,58</sup> (図2)。

Tzima, Schwartzらは、インテグリンが機械的刺激の感知システムとして作用して、低分子量GTP結合タンパク質Rhoファミリー分子のCdc42, Rac, Rhoが活性化することにより細胞の形態変化を起こすことを示してきた<sup>59-61</sup>。血流によりPI3-Kが活性化するが、この活性化に細胞間接着分子のVE-カドヘリンとPECAM-1が必要である。PECAM-1あるいはVE-カドヘリンを欠く内皮細胞では血流によるAKTの活性化が生じないことから、この二つの分子が感知機構に必須であることがわかった。さらにこれだけでは不十分で、VEGFR2も必要であることが証明された<sup>62</sup>。また、p190RhoGAPは転写因子TFII-Iに結合してTFII-Iを核外移行するために、TFII-I依存性のVEGFR2の転写を抑制することが示された。このシグナル系は細胞外基質の弾性に左右されることから、機械的刺激による血管新生に転写因子TFII-Iが重要であることが明らかにされた<sup>63</sup>。PECAM-1の細胞内ドメインにはimmunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)があり、血流依存性にSHP2がSrc homology2 (SH2)を介してITIMに結合することでERKの活性化を起こすことも示されている<sup>64</sup>。

血管の安定化も血流による影響を受けるという事実も積み重ねられてきている。培養細胞を用いた遺伝子発現のプ

ロファイリング実験により、血流に従ってKLF2の発現が増加することが示された<sup>65,66</sup>。Tie2-Creマウスを用いた血管内皮細胞特異的なKLF2欠損マウスが、高拍出性の心不全を呈する(血管抵抗の低下による)ことがわかり、KLF2が血行動態の維持に不可欠な転写因子であることが証明された<sup>67</sup>。KLF2が血管内皮細胞の安定化に必要な様々な分子の転写を促進することも報告されている<sup>68</sup>。動脈硬化症モデルマウスのApoE欠損マウスとKLF2<sup>+/-</sup>マウスを交配したマウスでは脂肪食負荷による動脈硬化症が悪化することからも、KLF2の血管安定化作用が検証された<sup>69</sup>。高コレステロール血症の治療薬として使用されているHMG-CoA還元酵素阻害剤(スタチン)によってもKLF2が誘導されることも示され<sup>70</sup>、KLF2が血管に作用して好影響を及ぼしていることが考えられる。KLF2は胸腺細胞・T細胞のS1P1の転写活性も増加させるので<sup>71</sup>、血管内皮細胞に発現するS1P1の発現上昇に伴う血管透過性の抑制にも貢献している可能性がある(図2)。

血管・血流は造血幹細胞の維持にも必要とされる。ヘマンジオブラストは生後に骨髄内に移行して造血幹細胞となると考えられている。ヘマンジオブラストは発生時のaorta-gonads-mesonephros (AGM)由来であり、自ら血球となって心臓の拍動によって血流を生み出す基となる。ゼブラフィッシュの心拍動のない変異体では、造血幹細胞の減少とさらには血管の静脈化(efrinB2の発現低下)が認められる。また血流による造血幹細胞の維持・発生にはNOSが必要なことも示された<sup>72</sup>。ゼブラフィッシュだけではなく、胚性幹(ES)細胞を用いた実験でも機械的刺激が造血幹細胞の発生に重要であることも判明した<sup>73</sup>。血流によってES細胞の造血幹細胞への分化が促進され、この作用はNOに依存することが示された。造血幹細胞に発現する転写因子Runx1の発現がNOによって増加することが分化を促進する理由であると考えられた。これはマウスのAGM領域由来細胞の赤血球への分化が血流に依存することからも証明された。

### 4. 血管内皮細胞間接着の調節機構

血管内皮細胞の接着の特徴として接着結合と密着結合の境界が上皮細胞とは異なり明瞭に区別できないことが挙げられる<sup>74</sup>。血管内皮細胞間接着分子は多数あるが本稿ではVE-カドヘリンの最新の報告を中心に紹介する。VE-カドヘリンは、血管内皮細胞間接着を制御する血管新生に不可欠な分子であることはVE-カドヘリン欠損マウスの検討で明らかにされた<sup>75</sup>。その後のVE-カドヘリン<sup>-/-</sup>個体の尿膜を用いた*ex vivo*の解析によって、VE-カドヘリン欠損は初期の血管網の形成を阻害することがわかった。また、VE-カドヘリンには血管網の再形成の際の血管内皮細胞の解離を抑制する重要な機能があることがわかった<sup>12</sup>。

VE-カドヘリンは他のカドヘリンと同様に  $\text{Ca}^{2+}$  依存性にホモフィリックな cis, trans 結合のための接着分子として作用する。細胞内ドメインは p120 カテニンと  $\beta$ -カテニン結合部位を有し、 $\beta$ -カテニンは  $\alpha$ -カテニンを介してアクチンとリンクする。細胞内ドメインの Tyr・Ser 残基のリン酸化が内皮細胞の透過性に重要であることは先に述べたが、白血球においても intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) への接着がきっかけとなって Tyr731・Tyr658 のリン酸化が生じて VE-カドヘリンの接着が弱まり、血管外浸潤が可能になる<sup>76,77</sup>。Tyr の脱リン酸化機構の解明も進んでいる。vascular endothelial receptor-type protein tyrosine phosphatase (VE-PTP) が VE-カドヘリンと結合して働く脱リン酸化酵素として同定されて、血管外浸潤抑制機構、VEGF による VE-カドヘリンのリン酸化への拮抗作用によって内皮細胞間接着を増強させることが突き止められた<sup>78,79</sup>。VE-PTP は、VE-カドヘリンだけではなく Tie2 受容体にも結合し、Tie2 の細胞間接着への集積に関与する<sup>29</sup>。さらに Tie2 の脱リン酸化酵素として機能して血管発生を制御する<sup>80</sup>。

低分子量 GTP 結合タンパク質 Rap1 は、血管内皮細胞接着を制御している。われわれのグループを含め数グループが cAMP-Epac (Rap1 グアニンヌクレオチド交換因子)-Rap1 シグナルによる VE-カドヘリンの細胞間接着部位での安定化と透過性の抑制を明らかにした<sup>81~83</sup> (図 1)。Rap1 活性化が VE-カドヘリン接着をどのように調節しているかを検討したところ、まず細胞間接着に平行に生じるアクチンの束化を促進してこれに  $\alpha$ -カテニン/ $\beta$ -カテニンを介して VE-カドヘリンが結合することを突き止めた (Mol. Biol. Cell 掲載予定)。 $\alpha$ -カテニン、アクチン、 $\beta$ -カテニンの 3 者の複合体は静的には生じないと Weis, Nelson のグループが報告し、これまでのカドヘリン接着機構に疑問を投げかけた<sup>84,85</sup>。しかし、われわれのデータは少なくとも血管内皮細胞では静的なモデルで VE-カドヘリン接着が制御されていることを示唆している。cAMP-Epac-Rap1 の活性化が細胞内から VE-カドヘリン接着を制御する一方で、VE-カドヘリン接着依存性に  $\beta$ -ctn/MAGI-1 複合体が PDG-GEF (Rap1 グアニンヌクレオチド交換因子) を細胞間接着部位にリクルートすることで Rap1 の活性化を起こすことも明らかにした<sup>86</sup>。Rap1 は血管内皮細胞間接着だけでなく、インテグリンの活性化により内皮細胞-基質間接着を活性制御し血管新生を調節する<sup>87</sup>。

Rap1 の血管形成における重要性は遺伝性の血管病でも明らかになってきた。脳海綿状血管腫 (cerebral cavernous malformations, CCM) の原因遺伝子として同定されている *CCM1* (*Krit1*) は Rap1 と結合する。Rap1 による血管内皮細胞間接着が *CCM1* のノックダウンにより減弱することから、*CCM1* は Rap1 の標的分子と結論付けられてい

る<sup>88</sup>。*CCM2*, *CCM3* が他に原因遺伝子として同定されている。ゼブラフィッシュで *CCM* とシグナル系を構成する heart of glass1 (*HEG1*) をマウスで欠損させると心血管系の発生異常 (心筋緻密層の構造異常とリンパ管内皮細胞の接着の脆弱化) を来す。*CCM1* が *CCM2* と結合することも明らかにされた<sup>89</sup>。また、*CCM2* ノックアウトマウスは、血管内皮細胞の異常により内腔形成ができず致死となる<sup>90</sup>。これは *CCM2* の消失により Rho 分子の活性化が生じて内皮細胞間接着が弱まるのが原因と想定されている。

VE-カドヘリンの転写についても最近重要な知見が報告された。マウスの *CDH5* (VE-カドヘリン) 遺伝子の -3.5 プロモーターエンハンサー領域に FOX:ETS 結合領域があり転写因子 FoxC1, C2 と Ets ファミリーに属する Etv2 によって厳格な転写調節を受けることが明らかになった<sup>91</sup>。VE-カドヘリンプロモーターで LacZ を発現するマウスのうち、この FOX:ETS 領域を欠損した個体は LacZ 活性が一切ないことも確認されている。さらに興味深いことに血管内皮細胞で発現する *MEF2C*, *VEGFR2*, *TIE2*, *TAL1*, *NOTCH4* 遺伝子の転写調節領域にもこの FOX:ETS 配列が認められることも、この配列と転写因子の重要性を示唆している。別のグループは、転写因子 serum response factor (SRF) が  $\beta$ -アクチンの転写だけではなく VE-カドヘリンの発現にも重要であることを示した<sup>92</sup>。血管内皮細胞特異的に SRF を欠損したマウスは動脈瘤、出血のために胎生致死であり、その原因は  $\beta$ -アクチン減少による伸張突起形成不全と VE-カドヘリン減少による細胞間接着の減弱であると結論している。

血管内皮細胞間接着、内皮細胞-白血球接着を調整する機構として最近報告された研究を紹介する。VE-カドヘリン<sup>+/+</sup>細胞と<sup>-/-</sup>細胞の遺伝子発現を比較したところ、顕著な差が見られたのが密着結合分子の claudin-5 であった。VE-カドヘリン接着の増強が PI3-K を活性化することにより、FoxO を核外移行させてしまう。本来 FoxO は、 $\beta$ -カテニン/Tcf-4 とともに claudin-5 の転写を抑制しているが、FoxO が核外移行することにより claudin-5 の転写抑制解除、結果的に claudin-5 の転写増加に傾く<sup>93</sup>。developmental endothelial locus-1 (Del-1) は、細胞外に分泌される糖タンパク質であるが、本分子を欠損させると白血球の内皮細胞への接着が亢進することから、Del-1 が内因性の抗炎症作用を示すことが明らかになった<sup>94</sup>。Del-1 は、分子の透過性が必要な部位 (腎臓や肝臓) や透過性が極端に抑制されている部位 (血液脳関門) で発現していることは、Del-1 が透過性・接着の調節分子であることを示唆している。分泌された Del-1 は細胞接着分子に作用したり、或いは血管内皮細胞以外の細胞との接着を調節している。白血球と内皮細胞との接着も接着分子の臓器・組織特異的な発

現の差によって調節されている<sup>95)</sup>。したがって血管とその血管を含む組織の接着は、接着分子のみならず分泌因子によっても調節を受けていることが重要である。

血管内腔形成過程にも VE-カドヘリンが機能していることを示す結果が報告された<sup>96)</sup>。マウスの大動脈形成ではまず VE-カドヘリンによる血管内皮細胞接着が生じ、この VE-カドヘリン接着が解離した部分（細胞外）に内腔が形成される。この報告は、ゼブラフィッシュの節間血管において内皮細胞内の空腔が連なることで内腔が作られるという結果とは一致していない<sup>97)</sup>。部位あるいは種によって異なるのか、もしくは両メカニズムが内腔形成に重要であるのか今後ははっきりしてくるであろう。

#### 5. 血管内皮細胞と隣接する細胞間の相互作用 (図4)

個体発生にともなって形成される血管は、血管構築細胞である血管内皮細胞の発芽・分枝、さらに管腔形成に引き続いて、内皮細胞を支持する周細胞・血管平滑筋によって伸張・成熟する<sup>98)</sup>。この血管の成熟過程で重要なのが血管内皮細胞と血管周囲の細胞の相互作用である。血管内皮細胞からは血小板由来増殖因子 (PDGF) が分泌され血管平

滑筋細胞に作用し、逆に血管平滑筋細胞から Ang1 が血管内皮細胞の安定化因子として分泌される<sup>99,100)</sup>。ephrinB シグナルが平滑筋細胞と血管内皮細胞接着による血管の成熟に関わる<sup>101)</sup>。転写因子 KLF2 も同様に血管平滑筋の遊走を起こして血管成熟を担っている<sup>102)</sup>。この相互作用に類似した機構が血管内皮細胞と心筋細胞の関係にもあることをわれわれは明らかにした。血管内皮細胞から分泌されるニューレギュリン 1 (Nrg1) が心筋細胞に作用し、心筋細胞からは Ang1 が分泌されることで毛細血管構築、ならびに内膜内皮細胞による心内膜の形成が行われる<sup>103)</sup>。その他の分子を介しての心筋細胞と心臓毛細血管内皮細胞ならびに心内膜内皮細胞の相互調節作用も詳細にまとめられている<sup>104)</sup>。腎糸球体の有足細胞と毛細血管でも Ang1-Tie2 系が機能している。有足細胞から分泌される Ang1 が内皮細胞の接着を調節してタンパク質の漏出を阻害し、タンパク尿を防いでいる<sup>105)</sup>。Ang1 と拮抗すると考えられている Ang2 を有足細胞で強制発現させるとタンパク尿が見られることは、Ang1-Tie2 系の糸球体での機能を裏付けている<sup>106)</sup>。

脂肪細胞と血管の相互作用についても新たな知見が報告されている。肥満マウスの脂肪組織では炎症が生じてい

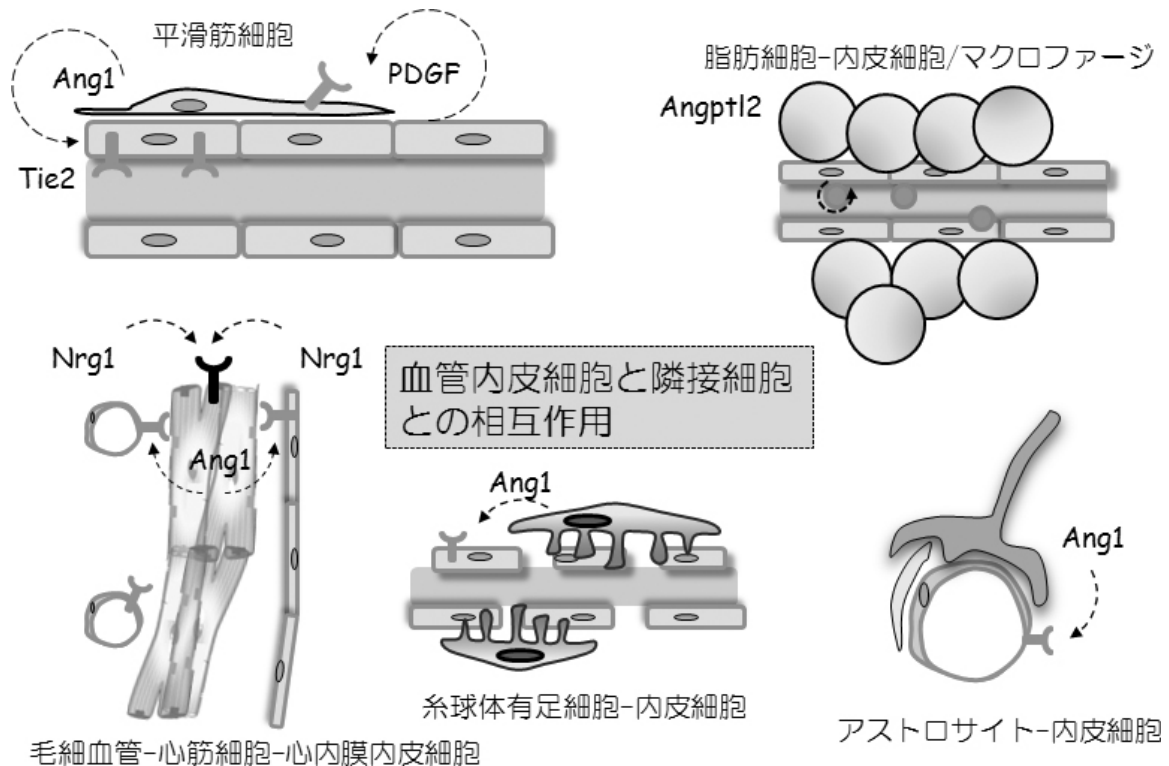


図4 血管内皮細胞と接着・隣接する細胞との相互依存

血管内皮細胞が分泌する PDGF によって PDGF 受容体を発現する血管平滑筋・周細胞は安定化する。また血管平滑筋・周細胞から分泌された Ang1 は血管内皮細胞の Tie2 を活性化して内皮細胞の維持を司る。血管内皮細胞-心筋細胞でも内皮細胞から分泌されるニューレギュリン-1 (Nrg1) が心筋の ErbB 受容体を活性化し、さらに心筋での Ang1 の生成を促進することで、内皮細胞への相互の維持システムを稼働させている。同様な Ang1 を介したシグナルは糸球体有足細胞や、神経系のアストロサイトでも認められている。また、脂肪組織では脂肪からの Angptl2 (angiopoietin-like protein 2) によるマクロファージの血管内皮細胞への接着亢進による炎症惹起作用もある。



る。この炎症はマクロファージと血管内皮細胞の接着が亢進した結果であり、抗-ICAM-1抗体の投与により炎症が減弱することから糖尿病病態における炎症のかかわりが示された<sup>107)</sup>。さらにこの炎症はCD8<sup>+</sup>T細胞が支配していることが明らかにされた<sup>108)</sup>。脂肪組織から分泌されるangiopoietin-like protein 2 (Angptl2)が血管内皮細胞に作用してマクロファージの内皮細胞への接着を増加させることで炎症を増悪させることもわかった<sup>109)</sup>。

神経細胞-血管内皮細胞間の相互作用も両者の生存シグナルのために重要な相互依存関係にある。血液脳関門は脳組織を血液内に存在する物質から防御するためには欠かすことのできないバリアーである。密着結合分子のoccludin, claudin-3, -5, JAMと裏打ちスキヤフォールド分子のZOファミリー分子, MAGIファミリー分子が、より密な内皮細胞間接着を形成している<sup>110)</sup>。また血管内皮細胞の周囲には周細胞だけでなくアストロサイトや神経末端も配置されることでより接着機構を精密に調整していると考えられている<sup>111)</sup>。アストロサイトがAng1を分泌し、内皮細胞が白血球阻害因子(LIF)を分泌することで、お互いに血液脳関門の維持に必須の相互作用を行っていると思われる<sup>112,113)</sup>。嗅球の内部の神経芽細胞が血管を足場にして移動する際や、側脳室由来の神経芽細胞が脳梗塞層へと移動する際にも血管を足場として動いていることがわかった<sup>114,115)</sup>。つまり相互の分泌因子の調節だけでなく物理的な足場としての作用もあることが明らかになってきている。脳神経が自己免疫にさらされるためには、免疫細胞の脳内への移行があるはずである。まず血管腔に沿って移動し、血管反対腔でも血管に沿って移動するTリンパ球が可視化によって捕らえられ、免疫細胞と血管内皮細胞の移動に関しての相互作用も明らかにされた<sup>116)</sup>。

血管ネットワークと神経ネットワークに関する共通ガイドンスメカニズムも注目されている。本総説では血管内皮細胞の維持機構・新生機構の最新の知見をもとにまとめることにしたために血管-神経の走行・配置については他の優れた総説を紹介するにとどめる<sup>117~120)</sup>。神経の走行も血管の走行も反発作用・誘引作用に基づいて決定され、その分子メカニズムが共通であるという視点にたって紹介されている。血管-神経の相互調節系については今後さらなる研究の展開があると期待している。

## 6. 血管によって構成される幹細胞微小環境

幹細胞についても血管は上記5項で挙げた隣接細胞との相互作用の他に重要な微小環境を作ることで幹細胞維持を果たしている。血管がニッチを形成し骨髄幹細胞、神経幹細胞、がん幹細胞などの維持を行っていることが注目されている。細胞の維持に必須の酸素・栄養因子が血管から供給されることを考えれば血管が様々な細胞の維持のために

特殊な構造をとっても不思議ではないが、実際に機能的ニッチの存在が明らかにされたことは、素晴らしい発見である。さらに再生医療を考えた場合の体細胞幹細胞の可能性や、移植可能な幹細胞にも血管からの酸素栄養供給が必要であることを考えると血管が構成する微小環境はとても重要であろう。

血管ニッチの存在は造血幹細胞の骨髄内での局在を調べることでもまず明らかにされた<sup>121)</sup>。signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)ファミリー分子の発現パターンによって造血幹細胞と前駆細胞をわけ、幹細胞が骨髄の類洞血管内皮細胞に接着していることから提唱された。骨髄の骨梁ニッチでも造血幹細胞が静止状態で維持される。これらの細胞は骨芽細胞から分泌されるAng1と造血幹細胞に発現するTie2によって維持され、また骨芽細胞と造血幹細胞の接着はN-カドヘリンによることも報告された<sup>122)</sup>。骨梁ニッチと血管ニッチは両方とも造血に必要とされている<sup>123)</sup>。これらのニッチは造血幹細胞への作用が異なることも示唆されている。骨梁ニッチは血管ニッチとともに骨髄内で形成されるが、血球細胞に関しては接着シグナルが深まる<sup>124)</sup>。

神経幹細胞と血管ニッチの関係についても早くから提唱されている<sup>125)</sup>。海馬での神経再生が活発に行われている顆粒層では盛んに分裂している幹細胞が血管近傍に局在している。詳細な三次元画像解析によって、側脳室領域の神経幹細胞も血管構造の近傍に見つかることから血管ニッチで安定化していると考えられる<sup>126)</sup>。血管内皮細胞との直接の接触により維持されているというよりもむしろ血管周囲の基質との接着に依存している。つまり大きく考えると血管・基質からなる微小環境に局在しているとも言える。血管内皮細胞自身も血管内皮細胞から分泌されるコラーゲンやラミニンが基質となり、細胞と基質がインテグリンを介して接着している<sup>127)</sup>。

がん細胞と血管ニッチについても研究されている。急性骨髄性白血病細胞や慢性骨髄性白血病(BCR-Abl)細胞は、CD44とヒアルロン酸を発現している類洞内皮細胞や骨梁細胞に接触している。この血管においては白血病幹細胞が造血幹細胞と同様に両ニッチで生存していることを示唆している<sup>128)</sup>。脳腫瘍の幹細胞も血管ニッチにおいて自己複製を行っていることが報告された<sup>129)</sup>。血管ニッチを阻害することによって幹細胞由来の脳腫瘍の増大を抑制することも可能である。

## 7. おわりに

血管と血管に隣接する細胞の安定化機構について血管内皮細胞の接着ならびに血管内皮細胞の生存シグナルに焦点をあててまとめた。血管の安定化は血管新生とともに考えなければいけない生理的機能である。血管新生を目指した



治療や血管透過性の亢進した病態の改善を考える際には血管の安定化の問題は不可避である。また、血管の恒常性の維持は、動脈硬化症・肥満・高脂血症・高血圧による血管の破綻による病態とも考えられる生活習慣病に対する治療を考える上でも大事である。

血管の発生でも、まだまだ解明すべき面白い問題として血管-神経の協調的なネットワーク構築の仕組みや、無血管領域での血管退縮の機構などが挙げられる。本研究で触れることのできなかった血管の退縮メカニズムもがんの血管新生の際には必須の現象である。単純に恒常性を維持するための血管内皮細胞-他の細胞との相互依存関係が消失しただけでなく、消失させるための生理的機構を生体は有していると予想できる。

血管は心臓と繋がる大血管から動脈となり末梢組織に行き渡り（毛細血管）、さらに静脈となり上下の大静脈から心臓に戻る、一連のつながった唯一の組織である。この血管の内皮細胞だけでも様々な特徴があり臓器とつながる部位での特徴を示している。このような血管の個々の臓器における役割の解明は今後もさらに進展していくであろう。臓器・組織の再生を考えてもその臓器・組織にあった血管構築が必要である。血管研究は分子メカニズムの解明とイメージング技術を駆使できる研究領域でもある。ますます若い研究者のこの領域への参加を期待したい。

## 文 献

- Vogeli, K.M., Jin, S.W., Martin, G.R., & Stainier, D.Y. (2006) *Nature*, 443, 337-339.
- Peterkin, T., Gibson, A., & Patient, R. (2009) *Development*, 136, 1465-1474.
- Xiong, J.W. (2008) *Dev. Dyn.*, 237, 1218-1231.
- Wang, L., Li, L., Shojaei, F., Levac, K., Cerdan, C., Menendez, P., Martin, T., Rouleau, A., & Bhatia, M. (2004) *Immunity*, 21, 31-41.
- Mehta, D. & Malik, A.B. (2006) *Physiol. Rev.*, 86, 279-367.
- Dejana, E., Tournier-Lasserre, E., & Weinstein, B.M. (2009) *Dev. Cell*, 16, 209-221.
- Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., & Holash, J. (2000) *Nature*, 407, 242-248.
- Olsson, A.K., Dimberg, A., Kreuger, J., & Claesson-Welsh, L. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 359-371.
- Adams, R.H., Wilkinson, G.A., Weiss, C., Diella, F., Gale, N.W., Deutsch, U., Risau, W., & Klein, R. (1999) *Genes Dev.*, 13, 295-306.
- Nyormoi, O., Klein, G., Adams, A., & Dombos, L. (1973) *Int. J. Cancer*, 12, 396-408.
- Vittet, D., Buchou, T., Schweitzer, A., Dejana, E., & Huber, P. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 6273-6278.
- Crosby, C.V., Fleming, P.A., Argraves, W.S., Corada, M., Zanetta, L., Dejana, E., & Drake, C.J. (2005) *Blood*, 105, 2771-2776.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S., & Vestweber, D. (2004) *J. Cell Sci.*, 117, 19-29.
- Ilan, N. & Madri, J.A. (2003) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15, 515-524.
- Lopez, M., Aoubala, M., Jordier, F., Isnardon, D., Gomez, S., & Dubreuil, P. (1998) *Blood*, 92, 4602-4611.
- Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W., & Ogita, H. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 603-615.
- Muller, W.A. (2009) *Circ. Res.*, 105, 223-230.
- Huttenlocher, A. & Poznansky, M.C. (2008) *Trends Cell Biol.*, 18, 298-306.
- Gerber, H.P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V., & Ferrara, N. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 30336-30343.
- Lee, S., Chen, T.T., Barber, C.L., Jordan, M.C., Murdock, J., Desai, S., Ferrara, N., Nagy, A., Roos, K.P., & Iruela-Arispe, M.L. (2007) *Cell*, 130, 691-703.
- Wallez, Y., Cand, F., Cruzalegui, F., Wernstedt, C., Souchelnytskyi, S., Vilgrain, I., & Huber, P. (2007) *Oncogene*, 26, 1067-1077.
- Gavard, J. & Gutkind, J.S. (2006) *Nat. Cell Biol.*, 8, 1223-1234.
- Grazia, L.M., Zanetti, A., Corada, M., Takahashi, T., Balconi, G., Breviaro, F., Orsenigo, F., Cattellino, A., Kemler, R., Daniel, T.O., & Dejana, E. (2003) *J. Cell Biol.*, 161, 793-804.
- Lampugnani, M.G., Orsenigo, F., Gagliani, M.C., Tacchetti, C., & Dejana, E. (2006) *J. Cell Biol.*, 174, 593-604.
- Abraham, S., Yeo, M., Montero-Balaguer, M., Paterson, H., Dejana, E., Marshall, C.J., & Mavria, G. (2009) *Curr. Biol.*, 19, 668-674.
- Thurston, G., Suri, C., Smith, K., McClain, J., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D., & McDonald, D.M. (1999) *Science*, 286, 2511-2514.
- Thurston, G., Rudge, J.S., Ioffe, E., Zhou, H., Ross, L., Croll, S.D., Glazer, N., Holash, J., McDonald, D.M., & Yancopoulos, G.D. (2000) *Nat. Med.*, 6, 460-463.
- Fukuhara, S., Sako, K., Minami, T., Noda, K., Kim, H.Z., Kodama, T., Shibuya, M., Takakura, N., Koh, G.Y., & Mochizuki, N. (2008) *Nat. Cell Biol.*, 10, 513-526.
- Saharinen, P., Eklund, L., Miettinen, J., Wirkkala, R., Anisimov, A., Winderlich, M., Nottebaum, A., Vestweber, D., Deutsch, U., Koh, G.Y., Olsen, B.R., & Alitalo, K. (2008) *Nat. Cell Biol.*, 10, 527-537.
- Sako, K., Fukuhara, S., Minami, T., Hamakubo, T., Song, H., Kodama, T., Fukamizu, A., Gutkind, J.S., Koh, G.Y., & Mochizuki, N. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 5592-5601.
- SenBanerjee, S., Lin, Z., Atkins, G.B., Greif, D.M., Rao, R.M., Kumar, A., Feinberg, M.W., Chen, Z., Simon, D.I., Luscinskas, F.W., Michel, T.M., Gimbrone, M.A., Jr., Garcia-Cardena, G., & Jain, M.K. (2004) *J. Exp. Med.*, 199, 1305-1315.
- Parmar, K.M., Larman, H.B., Dai, G., Zhang, Y., Wang, E.T., Moorthy, S.N., Kratz, J.R., Lin, Z., Jain, M.K., Gimbrone, M.A., Jr., & Garcia-Cardena, G. (2006) *J. Clin. Invest.*, 116, 49-58.
- Pasquale, E.B. (2008) *Cell*, 133, 38-52.
- Pola, R., Ling, L.E., Silver, M., Corbley, M.J., Kearney, M., Blake, P.R., Shapiro, R., Taylor, F.R., Baker, D.P., Asahara, T., & Isner, J.M. (2001) *Nat. Med.*, 7, 706-711.
- Lawson, N.D., Vogel, A.M., & Weinstein, B.M. (2002) *Dev. Cell*, 3, 127-136.
- Seo, S., Fujita, H., Nakano, A., Kang, M., Duarte, A., & Kume, T. (2006) *Dev. Biol.*, 294, 458-470.
- Zhong, T.P., Childs, S., Leu, J.P., & Fishman, M.C. (2001) *Nature*, 414, 216-220.

- 38) Kokubo, H., Miyagawa-Tomita, S., Nakazawa, M., Saga, Y., & Johnson, R.L. (2005) *Dev. Biol.*, **278**, 301–309.
- 39) Gale, N.W., Dominguez, M.G., Noguera, I., Pan, L., Hughes, V., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Adams, N.C., Lin, H.C., Holash, J., Thurston, G., & Yancopoulos, G.D. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 15949–15954.
- 40) Roca, C. & Adams, R.H. (2007) *Genes Dev.*, **21**, 2511–2524.
- 41) De, P.M., Venneri, M.A., Galli, R., Sergi, S.L., Politi, L.S., Sampaolesi, M., & Naldini, L. (2005) *Cancer Cell*, **8**, 211–226.
- 42) Grunewald, M., Avraham, I., Dor, Y., Bachar-Lustig, E., Itin, A., Jung, S., Chimenti, S., Landsman, L., Abramovitch, R., & Keshet, E. (2006) *Cell*, **124**, 175–189.
- 43) Herbert, S.P., Huisken, J., Kim, T.N., Feldman, M.E., Houseman, B.T., Wang, R.A., Shokat, K.M., & Stainier, D.Y. (2009) *Science*, **326**, 294–298.
- 44) Leslie, J.D., Ariza-McNaughton, L., Bermange, A.L., McAdow, R., Johnson, S.L., & Lewis, J. (2007) *Development*, **134**, 839–844.
- 45) Siekmann, A.F. & Lawson, N.D. (2007) *Nature*, **445**, 781–784.
- 46) Suchting, S., Freitas, C., le, N.F., Benedito, R., Breant, C., Duarte, A., & Eichmann, A. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 3225–3230.
- 47) Noguera-Troise, I., Daly, C., Papadopoulos, N.J., Coetzee, S., Boland, P., Gale, N.W., Lin, H.C., Yancopoulos, G.D., & Thurston, G. (2006) *Nature*, **444**, 1032–1037.
- 48) Benedito, R., Roca, C., Sorensen, I., Adams, S., Gossler, A., Fruttiger, M., & Adams, R.H. (2009) *Cell*, **137**, 1124–1135.
- 49) Takuwa, Y., Okamoto, Y., Yoshioka, K., & Takuwa, N. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1781**, 483–488.
- 50) Xu, M., Waters, C.L., Hu, C., Wysolmerski, R.B., Vincent, P. A., & Minnear, F.L. (2007) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **293**, C1309–C1318.
- 51) Komarova, Y.A., Mehta, D., & Malik, A.B. (2007) *Sci. STKE*, **2007**, re8.
- 52) Sanna, M.G., Wang, S.K., Gonzalez-Cabrera, P.J., Don, A., Marsolais, D., Matheu, M.P., Wei, S.H., Parker, I., Jo, E., Cheng, W.C., Cahalan, M.D., Wong, C.H., & Rosen, H. (2006) *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 434–441.
- 53) Li, X., Stankovic, M., Bonder, C.S., Hahn, C.N., Parsons, M., Pitson, S.M., Xia, P., Proia, R.L., Vadas, M.A., & Gamble, J. R. (2008) *Blood*, **111**, 3489–3497.
- 54) Hla, T., Venkataraman, K., & Michaud, J. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1781**, 477–482.
- 55) Kawahara, A., Nishi, T., Hisano, Y., Fukui, H., Yamaguchi, A., & Mochizuki, N. (2009) *Science*, **323**, 524–527.
- 56) Pyke, K.E. & Tschakovsky, M.E. (2005) *J. Physiol.*, **568**, 357–369.
- 57) Li, Y.S., Haga, J.H., & Chien, S. (2005) *J. Biomech.*, **38**, 1949–1971.
- 58) Hahn, C. & Schwartz, M.A. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 53–62.
- 59) Tzima, E., del Pozo, M.A., Shattil, S.J., Chien, S., & Schwartz, M.A. (2001) *EMBO J.*, **20**, 4639–4647.
- 60) Tzima, E., del Pozo, M.A., Kiosses, W.B., Mohamed, S.A., Li, S., Chien, S., & Schwartz, M.A. (2002) *EMBO J.*, **21**, 6791–6800.
- 61) Tzima, E., Kiosses, W.B., del Pozo, M.A., & Schwartz, M.A. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 31020–31023.
- 62) Tzima, E., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W.B., Dejana, E., Schultz, D.A., Engelhardt, B., Cao, G., DeLisser, H., & Schwartz, M.A. (2005) *Nature*, **437**, 426–431.
- 63) Mammoto, A., Connor, K.M., Mammoto, T., Yung, C.W., Huh, D., Aderman, C.M., Mostoslavsky, G., Smith, L.E., & Ingber, D.E. (2009) *Nature*, **457**, 1103–1108.
- 64) Osawa, M., Masuda, M., Kusano, K., & Fujiwara, K. (2002) *J. Cell Biol.*, **158**, 773–785.
- 65) Dekker, R.J., van, S.S., Fontijn, R.D., Salamanca, S., de Groot, P.G., VanBavel, E., Pannekoek, H., & Horrevoets, A.J. (2002) *Blood*, **100**, 1689–1698.
- 66) Huddleson, J.P., Srinivasan, S., Ahmad, N., & Lingrel, J.B. (2004) *Biol. Chem.*, **385**, 723–729.
- 67) Lee, J.S., Yu, Q., Shin, J.T., Sebzda, E., Bertozzi, C., Chen, M., Mericko, P., Stadtfeld, M., Zhou, D., Cheng, L., Graf, T., MacRae, C.A., Lepore, J.J., Lo, C.W., & Kahn, M.L. (2006) *Dev. Cell*, **11**, 845–857.
- 68) Dekker, R.J., Boon, R.A., Rondaij, M.G., Kragt, A., Volger, O. L., Elderkamp, Y.W., Meijers, J.C., Voorberg, J., Pannekoek, H., & Horrevoets, A.J. (2006) *Blood*, **107**, 4354–4363.
- 69) Atkins, G.B., Wang, Y., Mahabeleshwar, G.H., Shi, H., Gao, H., Kawanami, D., Natesan, V., Lin, Z., Simon, D.I., & Jain, M.K. (2008) *Circ. Res.*, **103**, 690–693.
- 70) Parmar, K.M., Nambudiri, V., Dai, G., Larman, H.B., Gimbrone, M.A., Jr., & Garcia-Cardena, G. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 26714–26719.
- 71) Carlson, C.M., Endrizzi, B.T., Wu, J., Ding, X., Weinreich, M. A., Walsh, E.R., Wani, M.A., Lingrel, J.B., Hogquist, K.A., & Jameson, S.C. (2006) *Nature*, **442**, 299–302.
- 72) North, T.E., Goessling, W., Peeters, M., Li, P., Ceol, C., Lord, A.M., Weber, G.J., Harris, J., Cutting, C.C., Huang, P., Dzierzak, E., & Zon, L.I. (2009) *Cell*, **137**, 736–748.
- 73) Adamo, L., Naveiras, O., Wenzel, P.L., McKinney-Freeman, S., Mack, P.J., Gracia-Sancho, J., Suchy-Dacey, A., Yoshimoto, M., Lensch, M.W., Yoder, M.C., Garcia-Cardena, G., & Daley, G.Q. (2009) *Nature*, **459**, 1131–1135.
- 74) Dejana, E. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 261–270.
- 75) Carmeliet, P., Lampugnani, M.G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuysse, B., Dewerchin, M., Zanetti, A., Angellilo, A., Mattot, V., Nuyens, D., Lutgens, E., Clotman, F., de Ruiter, M.C., Gittenberger-de, G.A., Poelmann, R., Lupu, F., Herbert, J.M., Collen, D., & Dejana, E. (1999) *Cell*, **98**, 147–157.
- 76) Allingham, M.J., van Buul, J.D., & Burridge, K. (2007) *J. Immunol.*, **179**, 4053–4064.
- 77) Turowski, P., Martinelli, R., Crawford, R., Wateridge, D., Pappageorgiou, A.P., Lampugnani, M.G., Gamp, A.C., Vestweber, D., Adamson, P., Dejana, E., & Greenwood, J. (2008) *J. Cell Sci.*, **121**, 29–37.
- 78) Nawroth, R., Poell, G., Ranft, A., Kloep, S., Samulowitz, U., Fachinger, G., Golding, M., Shima, D.T., Deutsch, U., & Vestweber, D. (2002) *EMBO J.*, **21**, 4885–4895.
- 79) Nottebaum, A.F., Cagna, G., Winderlich, M., Gamp, A.C., Linnepe, R., Polaschegg, C., Filippova, K., Lyck, R., Engelhardt, B., Kamenyeva, O., Bixel, M.G., Butz, S., & Vestweber, D. (2008) *J. Exp. Med.*, **205**, 2929–2945.
- 80) Winderlich, M., Keller, L., Cagna, G., Broermann, A., Kamenyeva, O., Kiefer, F., Deutsch, U., Nottebaum, A.F., & Vestweber, D. (2009) *J. Cell Biol.*, **185**, 657–671.
- 81) Kooistra, M.R., Corada, M., Dejana, E., & Bos, J.L. (2005) *FEBS Lett.*, **579**, 4966–4972.
- 82) Fukuhara, S., Sakurai, A., Sano, H., Yamagishi, A., Somekawa, S., Takakura, N., Saito, Y., Kangawa, K., & Mochizuki, N. (2005) *Mol. Cell Biol.*, **25**, 136–146.

- 83) Cullere, X., Shaw, S.K., Andersson, L., Hirahashi, J., Luscin-skas, F.W., & Mayadas, T.N. (2005) *Blood* **105**, 1950–1955.
- 84) Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W.J., & Weis, W.I. (2005) *Cell*, **123**, 903–915.
- 85) Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W.I., & Nelson, W.J. (2005) *Cell*, **123**, 889–901.
- 86) Sakurai, A., Fukuhara, S., Yamagishi, A., Sako, K., Kamioka, Y., Masuda, M., Nakaoka, Y., & Mochizuki, N. (2006) *Mol. Biol. Cell*, **17**, 966–976.
- 87) Carmona, G., Gottig, S., Orlandi, A., Scheele, J., Bauerle, T., Jugold, M., Kiessling, F., Henschler, R., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., & Chavakis, E. (2009) *Blood*, **113**, 488–497.
- 88) Glading, A., Han, J., Stockton, R.A., & Ginsberg, M.H. (2007) *J. Cell Biol.*, **179**, 247–254.
- 89) Kleaveland, B., Zheng, X., Liu, J.J., Blum, Y., Tung, J.J., Zou, Z., Sweeney, S.M., Chen, M., Guo, L., Lu, M.M., Zhou, D., Kitajewski, J., Affolter, M., Ginsberg, M.H., & Kahn, M.L. (2009) *Nat. Med.*, **15**, 169–176.
- 90) Whitehead, K.J., Chan, A.C., Navankasattusas, S., Koh, W., London, N.R., Ling, J., Mayo, A.H., Drakos, S.G., Jones, C.A., Zhu, W., Marchuk, D.A., Davis, G.E., & Li, D.Y. (2009) *Nat. Med.*, **15**, 177–184.
- 91) De, V.S., Chi, N.C., Meadows, S.M., Minovitsky, S., Anderson, J.P., Harris, I.S., Ehlers, M.L., Agarwal, P., Visel, A., Xu, S.M., Pennacchio, L.A., Dubchak, I., Krieg, P.A., Stainier, D. Y., & Black, B.L. (2008) *Cell*, **135**, 1053–1064.
- 92) Franco, C.A., Mericskay, M., Parlakian, A., Gary-Bobo, G., Gao-Li, J., Paulin, D., Gustafsson, E., & Li, Z. (2008) *Dev. Cell*, **15**, 448–461.
- 93) Taddei, A., Giampietro, C., Conti, A., Orsenigo, F., Breviario, F., Pirazzoli, V., Potente, M., Daly, C., Dimmeler, S., & Dejana, E. (2008) *Nat. Cell Biol.*, **10**, 923–934.
- 94) Choi, E.Y., Chavakis, E., Czabanka, M.A., Langer, H.F., Fraemohs, L., Economopoulou, M., Kundu, R.K., Orlandi, A., Zheng, Y.Y., Prieto, D.A., Ballantyne, C.M., Constant, S.L., Aird, W.C., Papayannopoulou, T., Gahmberg, C.G., Udey, M. C., Vajkoczy, P., Quertermous, T., Dimmeler, S., Weber, C., & Chavakis, T. (2008) *Science*, **322**, 1101–1104.
- 95) Hickey, M.J. & Kubes, P. (2009) *Nat. Rev. Immunol.*, **9** 364–375.
- 96) Strilic, B., Kucera, T., Eglinger, J., Hughes, M.R., McNagny, K.M., Tsukita, S., Dejana, E., Ferrara, N., & Lammert, E. (2009) *Dev. Cell*, **17**, 505–515.
- 97) Kamei, M., Saunders, W.B., Bayless, K.J., Dye, L., Davis, G. E., & Weinstein, B.M. (2006) *Nature*, **442**, 453–456.
- 98) Adams, R.H. & Alitalo, K. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 464–478.
- 99) Takakura, N., Huang, X.L., Naruse, T., Hamaguchi, I., Dumont, D.J., Yancopoulos, G.D., & Suda, T. (1998) *Immunity*, **9**, 677–686.
- 100) Lindblom, P., Gerhardt, H., Liebner, S., Abramsson, A., Enge, M., Hellstrom, M., Backstrom, G., Fredriksson, S., Landegren, U., Nystrom, H.C., Bergstrom, G., Dejana, E., Ostman, A., Lindahl, P., & Betsholtz, C. (2003) *Genes Dev.*, **17**, 1835–1840.
- 101) Salvucci, O., Maric, D., Economopoulou, M., Sakakibara, S., Merlin, S., Follenzi, A., & Tosato, G. (2009) *Blood*, **114**, 1707–1716.
- 102) Wu, J., Bohanan, C.S., Neumann, J.C., & Lingrel, J.B. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 3942–3950.
- 103) Nakaoka, Y., Nishida, K., Narimatsu, M., Kamiya, A., Minami, T., Sawa, H., Okawa, K., Fujio, Y., Koyama, T., Maeda, M., Sone, M., Yamasaki, S., Arai, Y., Koh, G.Y., Kodama, T., Hirota, H., Otsu, K., Hirano, T., & Mochizuki, N. (2007) *J. Clin. Invest.*, **117**, 1771–1781.
- 104) Aird, W.C. (2007) *Circ. Res.*, **100**, 174–190.
- 105) Woolf, A.S., Gnudi, L., & Long, D.A. (2009) *J. Am. Soc. Nephrol.*, **20**, 239–244.
- 106) Davis, B., Dei, C.A., Long, D.A., White, K.E., Hayward, A., Ku, C.H., Woolf, A.S., Bilous, R., Viberti, G., & Gnudi, L. (2007) *J. Am. Soc. Nephrol.*, **18**, 2320–2329.
- 107) Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Seo, K., Yamashita, H., Hosoya, Y., Ohsugi, M., Tobe, K., Kadowaki, T., Nagai, R., & Sugiura, S. (2008) *J. Clin. Invest.*, **118**, 710–721.
- 108) Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T., & Nagai, R. (2009) *Nat. Med.*, **15**, 914–920.
- 109) Tabata, M., Kadomatsu, T., Fukuhara, S., Miyata, K., Ito, Y., Endo, M., Urano, T., Zhu, H.J., Tsukano, H., Tazume, H., Kaikita, K., Miyashita, K., Iwawaki, T., Shimabukuro, M., Sakaguchi, K., Ito, T., Nakagata, N., Yamada, T., Katagiri, H., Kasuga, M., ando, Y., Ogawa, H., Mochizuki, N., Itoh, H., Suda, T., & Oike, Y. (2009) *Cell Metab.*, **10**, 178–188.
- 110) Hawkins, B.T. & Davis, T.P. (2005) *Pharmacol. Rev.*, **57**, 173–185.
- 111) Abbott, N.J., Ronnback, L., & Hansson, E. (2006) *Nat. Rev. Neurosci.*, **7**, 41–53.
- 112) Mi, H., Haerberle, H., & Barres, B.A. (2001) *J. Neurosci.*, **21**, 1538–1547.
- 113) Lee, S.W., Kim, W.J., Choi, Y.K., Song, H.S., Son, M.J., Gelman, I.H., Kim, Y.J., & Kim, K.W. (2003) *Nat. Med.*, **9**, 900–906.
- 114) Bovetti, S., Hsieh, Y.C., Bovolín, P., Perroteau, I., Kazunori, T., & Puche, A.C. (2007) *J. Neurosci.*, **27**, 5976–5980.
- 115) Yamashita, T., Ninomiya, M., Hernandez, A.P., Garcia-Verdugo, J.M., Sunabori, T., Sakaguchi, M., Adachi, K., Kojima, T., Hirota, Y., Kawase, T., Araki, N., Abe, K., Okano, H., & Sawamoto, K. (2006) *J. Neurosci.*, **26**, 6627–6636.
- 116) Bartholomaeus, I., Kawakami, N., Odoardi, F., Schlager, C., Miljkovic, D., Ellwart, J.W., Klinkert, W.E., Flugel-Koch, C., Issekutz, T.B., Wekerle, H., & Flugel, A. (2009) *Nature*, **462**, 94–98.
- 117) Carmeliet, P. & Tessier-Lavigne, M. (2005) *Nature*, **436**, 193–200.
- 118) Klagsbrun, M. & Eichmann, A. (2005) *Cytokine Growth Factor Rev.*, **16**, 535–548.
- 119) Guan, K.L. & Rao, Y. (2003) *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**, 941–956.
- 120) Larrivee, B., Freitas, C., Suchting, S., Brunet, I., & Eichmann, A. (2009) *Circ. Res.*, **104**, 428–441.
- 121) Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., & Morrison, S.J. (2005) *Cell*, **121**, 1109–1121.
- 122) Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., & Suda, T. (2004) *Cell*, **118**, 149–161.
- 123) Wilson, A. & Trumpp, A. (2006) *Nat. Rev. Immunol.*, **6**, 93–106.
- 124) Xie, Y., Yin, T., Wiegraebe, W., He, X.C., Miller, D., Stark, D., Perko, K., Alexander, R., Schwartz, J., Grindley, J.C., Park, J., Haug, J.S., Wunderlich, J.P., Li, H., Zhang, S., Johnson, T., Feldman, R.A., & Li, L. (2009) *Nature*, **457**, 97–101.
- 125) Palmer, T.D., Willhoite, A.R., & Gage, F.H. (2000) *J. Comp. Neurol.*, **425**, 479–494.

- 126) Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S.M., Goderie, S.K., Roysam, B., & Temple, S. (2008) *Cell Stem Cell*, **3**, 289–300.
- 127) Davis, G.E. & Senger, D.R. (2005) *Circ. Res.*, **97**, 1093–1107
- 128) Krause, D.S., Lazarides, K., von Andrian, U.H., & Van Etten, R.A. (2006) *Nat. Med.*, **12**, 1175–1180.
- 129) Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T.L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E.Y., Gaber, M.W., Finklestein, D., Allen, M., Frank, A., Bayazitov, I.T., Zakharenko, S.S., Gajjar, A., Davidoff, A., & Gilbertson, R.J. (2007) *Cancer Cell*, **11**, 69–82.
-