

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18976

研究課題名(和文) 血管新生および血管安定化における血管内皮細胞の4D カルシウムイメージング解析

研究課題名(英文) In vivo calcium imaging analyses during angiogenesis and vessel stabilization

研究代表者

中嶋 洋行 (Nakajima, Hiroyuki)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：10467657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体の血管内皮細胞におけるカルシウム動態を生きのまま1細胞レベルで観察した結果、血管新生過程でVEGF-A/VEGFR2依存性のカルシウム振動を捉えた。これにより血管新生の各段階でVEGF-A/VEGFR2シグナルがいつ、どの細胞で活性化することで、血管新生を調節しているのかを明らかにすることができた。さらに血流依存的なカルシウム上昇の解析にも成功し、血流に対する内皮細胞応答の解析から、Hippo pathwayの標的因子であるYAPが血流による機械的刺激に応答することを新たに見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we visualized endothelial Ca²⁺ dynamics at single-cell resolution in zebrafish and found that endothelial Ca²⁺ oscillations completely depended upon VEGF-A/VEGFR2 signaling during intersomitic vessel (ISV) formation. Thus, visualizing Ca²⁺ oscillations allowed us to monitor indirectly how VEGF-A/VEGFR2 signaling is spatio-temporally regulated at single cell level. We also observed blood flow-dependent Ca²⁺ oscillations in perfused vessels. By analyzing endothelial responses to blood flow, we newly found that YAP, a final effector of the Hippo pathway, responds to flow-mediated mechanical stimuli.

研究分野：血管生物学

キーワード：細胞内カルシウム 血管新生 メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

細胞内 Ca^{2+} は、様々な外的刺激に応答して濃度上昇することで、血管内皮細胞の増殖や遊走、血管形成、血管の弛緩、透過性の亢進など多岐にわたる血管機能に関与することが報告されている。成熟血管では、シアストレスやギャップ結合を介した細胞間 Ca^{2+} 伝播が細胞内 Ca^{2+} 上昇に寄与する一方で、*in vitro* の培養細胞では VEGFA-VEGFR2 シグナルが細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を強く誘導し、 Ca^{2+} が VEGFR2 シグナルの情報伝達物質として機能することがわかっている。しかしながら、生体での血管新生の過程で、細胞内 Ca^{2+} がいつどこで上昇するのかを高感度で捉えた例はこれまで報告されておらず、そこでの細胞内 Ca^{2+} 上昇がどのような刺激に応答して起こるのかについてはほとんどわかっていなかった。本研究では、細胞内 Ca^{2+} 上昇を、細胞外からの刺激による細胞内応答の指標として捉えることで、血管新生における個々の細胞の挙動や形状変化が、どのような外的刺激によって制御され、それらがどのような出力をもたらすのかを動的に理解することができるのではないかと考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究では、ゼブラフィッシュを用いて血管新生および安定化した血管で生体カルシウムイメージングを行い、カルシウム上昇を外的刺激の入力の指標とすることで、細胞外刺激とそれに起因する細胞応答の関係性を動的に捉えることを目指した。

3. 研究の方法

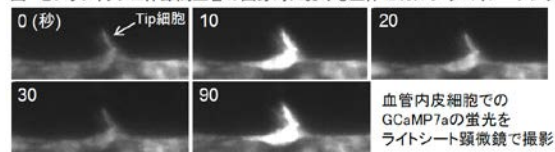
Ca^{2+} の濃度変化は種々の蛍光プローブによる検出が可能である。ここ数年で蛋白性の蛍光カルシウムプローブについて大幅な改良が為されており、従来と比べて極めて高い感度で Ca^{2+} の濃度変化を検出することが可能となってきていた。本研究で使用した GCaMP7a は GCaMP (GFP-based Ca calmodulin probe) をベースとして改良された蛋白性の蛍光カルシウムプローブである。シグナル依存的な細胞内 Ca^{2+} 上昇は早い場合には数秒のオーダーで起こるため、これを生きたまま高解像度の三次元像として検出するために、近年実用化されたライトシート顕微鏡を用いて観察を行った。本研究では、ライトシート顕微鏡の使用に適したモデル生物であるゼブラフィッシュ (以下 ZF と略す) を用い、血管新生過程における血管内皮細胞の Ca^{2+} 上昇を三次元で高い時空間分解能で測定することを試みた。

4. 研究成果

本研究では、生体の血管新生および安定化した血管で細胞内カルシウムを解析するため、ゼブラフィッシュの血管内皮細胞特異的に GCaMP7a を発現させ、同時に個々の血管内皮細胞の核を H2B-mCherry でラベルすることで、血管内皮細胞におけるカルシウム動態を生きたまま 1 細胞レベルで観察し、カルシウム上昇の定量解析を行った。本研究では

主に、大動脈から節間血管が出芽・分枝する血管新生の過程でのカルシウム動態を解析した。その結果、VEGF-A/VEGFR2 依存的なカルシウム振動が起こることを見出した。このことから、カルシウム振動を検出することで、個々の内皮細胞における VEGFR2 の活性化を間接的に可視化することが可能となった。カルシウム振動の観察により、VEGF-A/VEGFR2 シグナルが、出芽する Tip 細胞に加え、それに続く Stalk 細胞においても活性化することを明らかにし、さらに Stalk 細胞で VEGFR2 が活性化することの重要性を新たに見出した。また、出芽する Tip 細胞が、Dll4-Notch シグナルによる側方抑制機構によって 1 つに選ばれる過程を動的に捉えることに成功した。加えて、Notch シグナルが Tip 細胞のみならず Stalk 細胞の選別にも関与することを新たに見出した。このように、生体カルシウムイメージングによって VEGFR2 の活性化を間接的に捉えることによって、血管新生の各段階で VEGF-A/VEGFR2 シグナルがいつ、どの細胞で活性化することで、血管新生を調節しているのかを明らかにすることができた(*Yokota and *Nakajima et al, (*equal first authors) Elife 4: e08817 (2015)。

図 2. ゼブラフィッシュ体節間血管の出芽時における生体4Dカルシウムイメージング



次に、血流による機械的刺激に対する内皮細胞応答を可視化する目的で、血流のある血管でのカルシウムイメージングを行った。その結果、血流のある節間血管や背側大動脈などの血管内皮細胞において、細胞内カルシウム振動が起こることを見出した。この細胞内カルシウム振動は、薬剤処理によって心拍を停止させ、血流を止めることで完全に消失し、薬剤除去により血流を再開させると再び観察されたことから、血流に依存して起こることがわかった。さらにこの血流依存的なカルシウム上昇の上昇パターンを解析したところ、VEGF-A/VEGFR2 依存的なカルシウム上昇とは異なるパターンで起こることを見出しており、両者が異なるメカニズムで起きていることが明らかになった。また、血流に対する内皮細胞応答の解析から、Hippo pathway の標的因子である YAP が血流による機械的刺激に応答することを新たに見出し、流れによる YAP の応答がアクチン細胞骨格の形成に依存し、血管の安定化に寄与することを明らかにした(Nakajima et al, Dev. Cell 40: 523-536 (2017))。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

*Yokota Y., *Nakajima H.(co-first authors),
Wakayama Y., Muto A., Kawakami K., Fukuhara
S., Mochizuki N.
Endothelial Ca²⁺ oscillations reflects VEGFR
signaling-regulated angiogenic capacity in vivo.
Elife 4:e08817 (2015)

Ando K., Fukuhara S., Izumi N., Nakajima H.,
Fukui H., Kelsh RN., Mochizuki N.
Clarification of mural cell coverage of vascular
endothelial cells by live imaging of zebrafish.
Development 143:1328-1339 (2016)

Jiménez-Amilburu V., Rasouli S.J., Staudt D.W.,
Nakajima H., Chiba A., Mochizuki N., Stainier
D.Y.
In vivo visualization of cardiomyocyte
apicobasal polarity reveals epithelial to
mesenchymal-like transition during cardiac
trabeculation. **Cell Reports** 17:2687-2699 (2016)

Nakajima H., Yamamoto K., Agarwara S., Terai
K., Fukui H., Fukuhara S., Ando K., Miyazaki T.,
Yokota Y., Schmelzer E., Belting H.G., Affolter
M., Lecaudey V., Mochizuki N.
Flow-dependent endothelial YAP regulation
contributes to vessel maintenance.
Developmental Cell 40:523-536 (2017)

Morooka N., Futaki S., Sato-Nishiuchi R.,
Nishino M., Totani Y., Shimono C., Nakano I.,
Nakajima H., Mochizuki N., Sekiguchi K.
Polydom is an extracellular matrix protein
involved in lymphatic vessel remodeling.
Circulation Research 120:1276-1288 (2017)

[学会発表] (計 8 件)

中嶋洋行, 山本希美子, 福井一, 福原茂朋,
望月直樹
『血流による機械的刺激に対する YAP1 の応
答機構/Flow-dependent mechanical stress
induces nuclear translocation of YAP1 by
regulating actin cytoskeleton』
第 67 回日本細胞生物学会、東京、2015 年 6
月 30 日～7 月 2 日 (ワークショップ)

中嶋洋行, 横田泰宏、若山勇紀、福原茂朋、

望月直樹

『血管内皮細胞特異的な生体カルシウムイ
メージングによる VEGF-A/VEGFR2 シグナ
ルの時空間的入力制御の解析』
Research PlaNet 2015、大阪、2015 年 6 月
20 日～21 日 (ポスター・口頭発表)

中嶋洋行, 山本希美子, 福井一, 福原茂朋,
望月直樹

『Flow-dependent mechanical stress
induces nuclear translocation of YAP1 by
regulating actin cytoskeleton』
Gordon Research Seminar on Angiogenesis,
ニューポート、アメリカ、2015 年 8 月 1 日
～2 日 (口頭発表)

中嶋洋行, 山本希美子, 福井一, 福原茂朋,
望月直樹

『Flow-dependent mechanical stress
induces nuclear translocation of YAP1 by
regulating actin cytoskeleton』
Gordon Research Conference on
Angiogenesis、ニューポート、アメリカ、
2015 年 8 月 2 日～7 日 (ポスター発表)

中嶋洋行, 横田泰宏、福原茂朋、望月直樹
『VEGFR2 活性化の間接的可視化による血
管新生メカニズムの解明/Analysis of
sprouting angiogenesis by indirectly
visualizing VEGFR2 activity in vivo』
第 68 回日本細胞生物学会、京都、2016 年 6
月 15 日～17 日 (口頭発表)

中嶋洋行, 横田泰宏、福原茂朋、望月直樹
『Visualization of endothelial
VEGFR2-dependent Ca²⁺ dynamics
during sprouting angiogenesis.』
9th International Kloster Seeon Meeting,
Kloster Seeon、ドイツ、2016 年 9 月 17 日
～20 日 (ポスター発表)

中嶋洋行, 横田泰宏、望月直樹
『血管新生過程における内皮細胞応答の in
vivo イメージング解析/ In vivo imaging
analyses of endothelial responses to
signaling inputs during angiogenesis』
第 15 回日本心臓血管発生研究会、大阪、2016
年 10 月 14 日～15 日 (若手招聘講演)

中嶋洋行

『Flow-dependent endothelial YAP
regulation contributes to vessel
stabilization.』
First Chilean-German Workshop on mural

cell biology、サンティアゴ、チリ、 2017 年
3 月 20 日～22 日（口頭発表）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 洋行 (Nakajima Hiroyuki)
国立循環器病研究センター研究所・
細胞機能研究室 室長
研究者番号：10467657

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()