

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：84404

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07499

研究課題名(和文) 蛍光イメージングによる血管新生での先端端内皮細胞の一方向性移動の制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of a regulatory mechanism of directional migration of endothelial tip cells during angiogenesis by bioimaging

研究代表者

若山 勇紀 (Wakayama, Yuki)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：70782853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：血管新生は、既存の血管から血管枝が出芽し、新たな血管を構築するプロセスである。本研究課題では、血管新生過程の内皮細胞の移動がどのようにして制御されているのか検討するために、培養細胞およびゼブラフィッシュを用いて蛍光生体イメージング技術により解析を行なった。その結果、先端端に位置する内皮細胞においてVascular endothelial growth factor receptor2 (VEGFR2)がゴルジ装置からモータータンパク質KIF13Bを介して前方に輸送されていることが示唆された。また、内皮細胞の移動には隣り合う細胞同士の接着が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Angiogenesis is the process to form new blood vessels. In this study, I investigated the regulatory mechanism of endothelial cell migration by bioimaging technique. It is suggested that Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) is transported by KIF13B, a molecular motor, to the leading edge in leader cells. And I found that cell adhesion is important for endothelial cell migration.

研究分野：細胞生物学

キーワード：血管新生 VEGFR2 ゼブラフィッシュ

## 1. 研究開始当初の背景

全身に張り巡らされている血管は、血管新生により構築され、生体恒常性を維持している。血管新生は、既存の血管から血管枝が出芽し、新たな血管を構築するプロセスである (Adams R. H. et al. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007)。血管新生過程で、伸長する血管枝の先端に位置する先端端内皮細胞を Tip 細胞、その後方に位置する細胞を Stalk 細胞という。Tip 細胞は、後方で Stalk 細胞と細胞間接着を形成し、先端端では主に直線状のアクチン繊維によって構成される糸状仮足を活発に伸ばしながら一方向性に移動することで血管枝を伸長させる (図 1)。これまで、血管新生過程での内皮細胞の形態・運動を制御する分子メカニズムは、主に培養内皮細胞を用いた *in vitro* 実験系により解析されてきた。しかし、血管新生は、生体という 3 次元環境下で起こる現象であり、これまで生体内の細胞動態を分子レベルで解析する手法が無かったことから、血管新生での内皮細胞の形態・運動を制御するメカニズムについては不明な点が多く残されている。この問題を解決するには、ゼブラフィッシュをモデル動物として用いた蛍光生体イメージング技術が有効と考える。ゼブラフィッシュは、臓器の発生や構造がヒトと類似した脊椎動物であり、胚が透明なことから、生きたまま形態形成を解析することができる。これまで、分子や細胞の機能情報を可視化する蛍光タンパク質 (蛍光バイオセンサーという) を内皮細胞で発現するゼブラフィッシュを樹立し、蛍光生体イメージングを行うことで、血管新生過程の内皮細胞の形態・運動の制御機構を解析してきた。その結果、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質のひとつ Cdc42 によるアクチン調節タンパク質 Formin-like 3 の活性化が、血管新生過程の Tip 細胞の糸状仮足形成及び移動を制御することを明らかにした (Wakayama Y. et al. Dev. Cell 2015)。さらに、血管新生過程で Tip 細胞が一方向性に移動する機構を解析した。レーザー照射により Stalk 細胞を死滅させると、Tip 細胞は前後極性を失い、細胞移動を停止することが示された。これらの結果から、Tip 細胞は後方で Stalk 細胞と接着することにより、移動方向に対して前後極性を獲得すること、また、この前後極性が Tip 細胞の一方向性移動に重要であることを明らかにした (未発表)。また、Tip 細胞の一方向性移動に対する血管新生因子シグナルの役割を知るため、Vascular endothelial growth factor (VEGF) シグナルに着目し、移動する内皮細胞での VEGF 受容体 2 (VEGFR2) の動態を *in vitro* 実験系を用いて解析した。その結果、興味深いことに、VEGFR2 は前後極性を有する内皮細胞の先端端に集積していることを発見した (図 2)。また、他のグループの報告から、培養内皮細胞で VEGFR2 は細胞膜とゴルジ装置に集積しており、VEGF 刺激によってゴルジ装置に局在する VEGFR2 が細胞膜へ輸送されることが

示唆されている (Yamada H. K. et al. J. Cell Sci. 2014)。これらの知見は、血管新生での Tip 細胞の一方向性移動に、細胞外の VEGF のみならず、刺激を受ける内皮細胞内での VEGFR2 シグナルの時空間的制御が重要である可能性を示している。

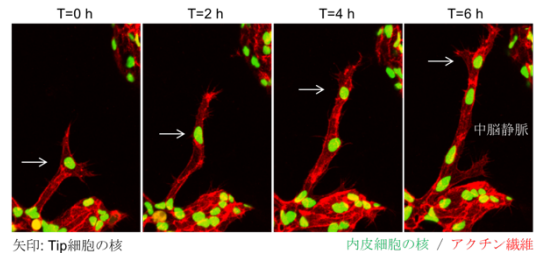


図 1. 血管新生過程の Tip 細胞と Stalk 細胞の移動

中脳静脈の形成過程を共焦点顕微鏡を使ってタイプラプス観察した。

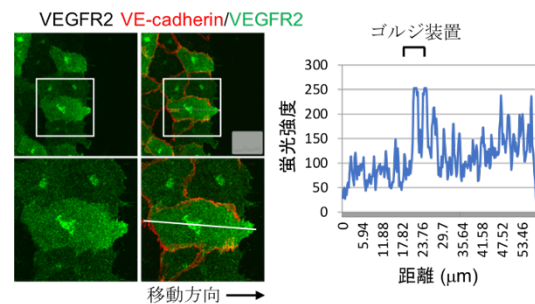


図 2. 方向性を持って移動している内皮細胞での VEGFR2 の局在

HUVEC を用いて創傷治癒アッセイを行い、VEGFR2 と VE-cadherin の免疫染色を行なった (左)。先端端に位置する内皮細胞の線上の VEGFR2 の蛍光強度を数値化した (右)。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、蛍光生体イメージング技術を駆使して、血管新生過程の Tip 細胞の一方向性移動を制御する分子機構の解明を目指す。

この研究目標を達成するため、Tip 細胞の一方向性移動における VEGF/VEGFR2 シグナルの時空間的制御機構とその血管新生への役割を解明する。特に、上の項で述べたこれまでの知見から、以下の仮説を立て、それについて検証する。「血管新生過程の内皮細胞では、ゴルジ装置に局在する VEGFR2 が先端端に選択的に輸送される仕組みがあり、それにより VEGF/VEGFR2 シグナルが先端端で強く活性化し、内皮細胞の一方向性移動を促進している。」具体的には、以下の項目について解析を行う。

- (1) VEGFR2 がゴルジ装置から先端端に輸送されているか検討する
- (2) VEGFR2 がゴルジ装置から先端端へ輸送されている機構および意義について検討する

(3) Tip 細胞、Stalk 細胞の接着による移動の制御機構について検討する

### 3. 研究の方法

本研究課題では、細胞生物学的手法を用いて、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell: HUVEC) を使った *in vitro* 解析、ゼブラフィッシュを用いた *in vivo* 解析を行った。

#### ・創傷治癒アッセイ

移動過程の内皮細胞での VEGFR2 の局在を調べるために、単層培養した HUVEC を用いて創傷治癒アッセイを行い、抗 VEGFR2 抗体を用いて免疫染色をした。観察のために、共焦点顕微鏡を用いた。目的の遺伝子の発現抑制のために、siRNA を用いた。タンパク質の翻訳を阻害するためにシクロヘキシミドを処理する際は、スクラッチ 2 時間前に処理し、創傷治癒アッセイを行った。

#### ・VEGFR2-FP の作成

VEGFR2 の局在を可視化するために、シグナル配列の下流もしくは C 末端に蛍光タンパク質を挿入した変異体 VEGFR2-FP を作成した。HUVEC にトランスフェクションし、内在性の VEGFR2 との局在を比較した。

#### ・VEGF-mCherry、-Myc の作成

VEGF の C 末端に mCherry もしくは Myc を挿入した。タグを付加した VEGF が work するか検討するために、HEK293T 細胞に目的の遺伝子をトランスフェクション後、培養上清を回収し、HUVEC の内在性の VEGFR2 が活性化されるか WB を行い検討した。

#### ・Tg ゼブラフィッシュの樹立

内皮細胞特異的に目的の遺伝子を発現する Tg フィッシュを樹立するために、To12 システムを用いて内皮細胞特異的に目的の遺伝子を発現させた。内皮細胞の核を可視化するために H2B-mCherry を、微小管を可視化するために EGFP-Tubulin、エンドソームを可視化するために、EGFP-Rab4a を発現させ、共焦点顕微鏡を用いて観察した。MTOC (microtubule organizing center) を前後極性を解析する際のマーカーにした。

#### ・Tip 細胞、Stalk 細胞の移動の可視化

Tip 細胞と Stalk 細胞の移動を数値化するために、内皮細胞の核の中心の単位時間あたり (15 分あたり) の移動距離を数値化した。また、内皮細胞の前後極性形成について数値解析す

るために、微小管を観察し、伸長方向を軸として核に対する MTOC の位置を数値化した。進行方向を軸にし、MTOC が核の前方に局在している時を  $180^\circ$  として、MTOC が  $135^\circ$  から  $180^\circ$  に局在している時その細胞が前後極性を形成しているとした。

#### ・ノックダウンおよびノックアウトフィッシュの樹立

目的の遺伝子をノックダウンするために、モルフォリノオリゴヌクレオチドをゼブラフィッシュの 1 細胞期にインジェクションし、解析を行なった。モルフォリノオリゴヌクレオチドが work することは RT-PCR を行い確認した。目的の遺伝子のノックアウトフィッシュを樹立するために、TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) を用いた。

### 4. 研究成果

(1) VEGFR2 がゴルジ装置から先導端に輸送されているかの検討

#### ① VEGFR2 の局在およびゴルジ装置からの輸送の検討

移動している内皮細胞では、ゴルジ装置に集積する VEGFR2 が方向性を持って輸送されているのか検討した。まず、VEGFR2 のターンオーバーを調べるために、HUVEC を翻訳阻害剤シクロヘキシミドで処理した。ゴルジ装置に局在する VEGFR2 の量が減少し、その後細胞膜に局在する VEGFR2 が減少した。処理後 30 分で VEGFR2 の発現量の顕著な減少が見られたことから、VEGFR2 のターンオーバーは早いことが示唆される。次に、方向性を持って移動する内皮細胞ではゴルジ装置からどこに VEGFR2 が輸送されるのか検討するために、シクロヘキシミドで前処理した後に、創傷治癒アッセイを行なった。内皮細胞の移動中にシクロヘキシミドを除去し、30 分後の先導端に位置する内皮細胞の VEGFR2 の局在を観察すると VEGFR2 は核の前方に多く局在していた。一方、同じく受容体型チロシンキナーゼである Tie2 では、シクロヘキシミドで処理しても短時間での発現量の顕著な減少は見られなかった。また、創傷治癒アッセイを行っても、先導端に位置する内皮細胞での局在は均一であった。この結果から、先導端に位置する内皮細胞で VEGFR2 は選択的に前方に多く局在することが示唆された。この結果から、VEGFR2 はゴルジ装置に多く局在することで必要な場所に応じて VEGFR2 を輸送することで移動の効率を制御していることが予想された。

#### ② 生細胞内での VEGFR2 の可視化の検討

VEGFR2 は受容体型チロシンキナーゼで、N 末端にシグナル配列があり、それに続き、IgG ド

メイン、膜貫通ドメイン、キナーゼドメインを持つ。生きた細胞内で VEGFR2 の局在を解析するために、VEGFR2 の C 末端、N 末端のシグナル配列の下流に蛍光タンパク質を挿入した変異体 VEGFR2-FP を作成した。HUVEC を用いて VEGFR2-FP の局在を解析すると、VEGFR2-FP ではゴルジ装置への集積が見られず、VEGF 刺激をしてもエンドソームへの集積は見られなかった。この結果から、蛍光タンパク質の付加により、VEGFR2 の局在に異常が起ったと考えられる。挿入する蛍光タンパク質の種類を検討したが、GFP、mCherry、EOS を使っても VEGFR2-FP の局在の改善は見られなかった。

### ③ VEGFR2 の活性化場所の検討

VEGF 刺激により VEGFR2 が活性化されると、細胞内ドメインのチロシンがリン酸化される。細胞内のどこで VEGFR2 が活性化しているか、VEGFR2 の局在と活性化場所は相関するのか検討するために、VEGFR2 のリン酸化チロシンの免疫染色を試みた。Human の VEGFR2 の 1175 番目のチロシンは VEGF 刺激によりリン酸化される。ゼブラフィッシュでもこのチロシンは保存されている。1175 番目のチロシンのリン酸化を認識する抗体を用いて HUVEC の免疫染色を行なった。WB では VEGF 刺激により、5 分後には VEGFR2 の 1175 番目のチロシンのリン酸化が亢進するが、免疫染色では VEGF 刺激的依存的なシグナルの亢進は見られなかった。

### ④ VEGF の取り込みの可視化による VEGFR2 の局在の可視化の検討

VEGFR2 は VEGF と結合すると、VEGF/VEGFR2 がエンドサイトーシスされることから、VEGF の取り込みを可視化することで細胞膜に局在する VEGFR2 の局在を間接的に観察することができると考え、in vivo で解析を行った。

Vegfr2 の局在を調べるために、Vegf の C 末端に mCherry を付加し、内皮細胞のどこで Vegf-mCherry が集積されるのか検討した。タグを付加した VEGF が work するのかを調べるために、HEK293T 細胞に Myc タグを付加した VEGF を発現させ、その培養上清を HUVEC に添加し、内在性の VEGFR2 を活性化するか検討した。VEGF の添加により、内在性の VEGFR2 のリン酸化が亢進した。また、VEGF が VEGFR2 依存的に内皮細胞に取り込まれるか検討するため、siRNA により VEGFR2 を発現抑制し、免疫染色を行ったところ、VEGFR2 の発現抑制により、タグを付加した VEGF の取り込みが抑制された。この結果から、タグを付加した VEGF は VEGFR2 活性化能を有しており、VEGFR2 依存的に内皮細胞に取り込まれることがわかった。血管新生過程の Tip 細胞のどこで Vegf が取り込まれるか検討するために、heat shock promoter を用いて、全身で Vegf-mCherry を発現させた。Vegf-mCherry は内皮細胞に多く集積しており、モルフォリノを用いた vegfr2 のノックダウ

ンにより、内皮細胞への集積は抑制されたことから、Vegf-mCherry は in vivo においても Vegfr2 依存的にエンドサイトーシスされていることが示唆される。内皮細胞のどこで取り込まれているか、共焦点顕微鏡を用いて観察すると、Vegf-mCherry は血管新生過程の内皮細胞において、先端の部分にシグナルが多く見られた。内皮細胞のエンドソームを観察するために、EGFP-Rab4 を発現する Tg を樹立し、内皮細胞内の Vegf-mCherry 陽性な vesicle との挙動を観察した。光シート顕微鏡を用いて時間分解能を高めて Vegf-mCherry 陽性の vesicle が形成される様子を観察すると、Vegf-mCherry 陽性細胞は、内皮細胞の中で素早く移動しており、先端の部分で Vegf-mCherry 陽性の vesicle が多く局在するからといって、そこに Vegfr2 が多く局在することを反映する訳ではないことが示唆された。これらの結果から、生体内で Vegfr2 の発現細胞を調べることはできるが、このシステムでは、Vegfr2 の局在を調べることはできないことが示唆された。

### (2) VEGFR2 がゴルジ装置から先端端へ輸送されている機構および意義の解析

#### ① KIF13B による VEGFR2 の輸送の検討

これまでに、培養細胞において VEGFR2 がモータータンパク質 KIF13B に結合し、ゴルジ装置から細胞膜に輸送されることが報告されている (Yamada H. K. et al. J. Cell Sci. 2014)。そこで VEGFR2 が KIF13B によって、ゴルジ装置から先端端に輸送されることで、Tip 細胞の効率的な移動を促進していると考え検討した。まず in vitro において、VEGF 刺激依存的に VEGFR2 と KIF13B の相互作用が亢進することが免疫沈降実験により確認できた。移動している内皮細胞で、KIF13B により VEGFR2 が前方に輸送されているか検討するために、siRNA を用いて KIF13B の発現抑制をし、創傷治癒アッセイを行なった。KIF13B の発現抑制をしても、先端端に位置する内皮細胞の前後極性形成に影響は見られなかった。スクラッチ前の移動していない状態では、Control と比べて VEGFR2 の発現量、局在に変化は見られなかった。スクラッチ後、KIF13B の発現抑制をした先端端の内皮細胞では VEGFR2 の発現が減少していた (図 3)。根元の移動していない細胞では VEGFR2 の発現量は Control と比べて顕著な差は見られなかった。この結果から、移動している内皮細胞において KIF13B は VEGFR2 の正常な輸送に重要で、KIF13B がない状態では、VEGFR2 の輸送が異常になり分解されやすくなると考えられる。



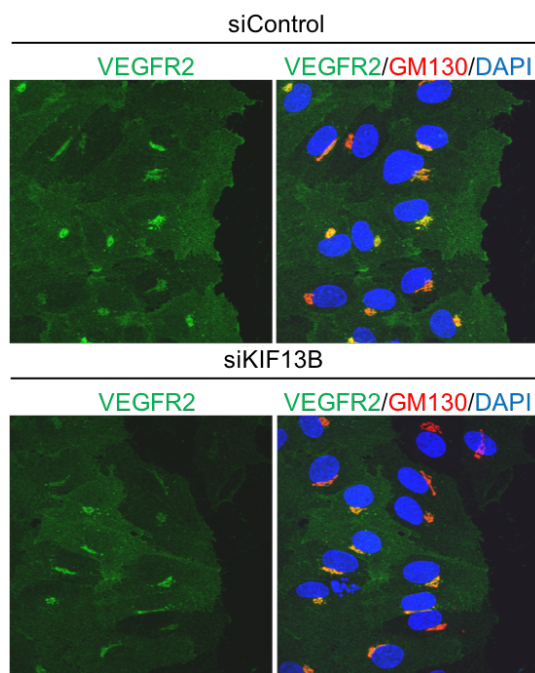


図 3. KIF13B 発現抑制細胞での VEGFR2 の局在 HUVEC に Control もしくは KIF13B の siRNA をトランスフェクションし、創傷治癒アッセイを行ない、VEGFR2、GM130(ゴルジ装置マーカー)、核の免疫染色を行なった。

## ② VEGFR2 の方向性を持った移動の検討

先端端に位置する内皮細胞で VEGFR2 がどのようにして前方に局在するのか検討するために、創傷治癒アッセイを行なった。微小管重合阻害剤を処理すると、細胞膜に局在する VEGFR2 の量が減少する。微小管重合阻害剤で処理し、創傷治癒アッセイを行うと、先端端に局在する内皮細胞で VEGFR2 の前方への局在は阻害された。Golgin160 の発現抑制をすると、ゴルジ装置からの方向性を持った輸送が阻害される。siRNA を用いて Golgin160 の発現抑制をし、創傷治癒アッセイを行うと、VEGFR2 の前方への局在が抑制された。また、細胞の移動も抑制された。これらの結果から、移動している内皮細胞では、VEGFR2 がゴルジ装置から前方に向かって輸送されている可能性が示唆された。

## ③ kif13ba KO フィッシュの解析

ゼブラフィッシュでは kif13ba, kif13bb が存在する。in situ ハイブリダイゼーションを行いそれぞれの発現パターンを観察すると、kif13ba は血管に多く発現していたため、kif13ba に注目して解析をした。in vivo において、kif13ba が血管新生に重要な検討するために、TALEN により、kif13ba KO フィッシュの樹立をした。Kif13ba KO フィッシュでは、中脳静脈の形成が遅延した(図 4)。Kif13ba KO フィッシュは致死にはならなかった。この結

果から、in vivo において Kif13ba が VEGFR2 の輸送を介した血管新生に重要であることが示唆された。Kif13ba KO フィッシュでは発生過程の血管新生で重篤な表現形が得られなかった理由として、redundancy もしくは gene compensation が考えられる。kif13ba, kif13bb DKO フィッシュでは発生過程の血管新生において重篤な表現系を示す可能も考えられる。

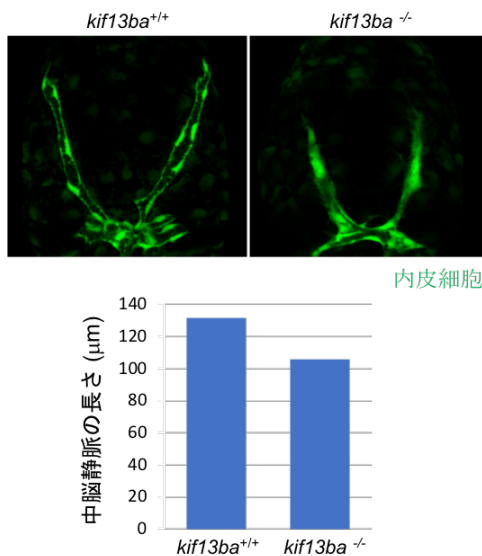


図 4. Kif13ba KO フィッシュの中脳静脈での血管新生 WT(左)および Kif13ba KO(右)の中脳静脈(上)。中脳静脈の長さ(下)。

## (3) Tip 細胞、Stalk 細胞の接着による移動の制御機構

### ① Tip 細胞、Stalk 細胞の移動の解析

Vegf/Vegfr2 シグナルにより、内皮細胞の移動が亢進し、血管が伸長する。Tip 細胞と Stalk 細胞の移動パターンを数値化し、解析することで、Tip 細胞と Stalk 細胞の移動がどのように制御されているのか解明を試みた。そのために、内皮細胞の核と微小管を蛍光タンパク質でそれぞれラベルし、中脳静脈の形成過程における移動を共焦点顕微鏡を用いて解析した。その結果、Tip 細胞、Stalk 細胞共に血管新生過程において前後極性を形成していることが示唆された。さらに解析を行うと、Tip 細胞と Stalk 細胞の距離が近い時ほど Tip 細胞は移動しやすく、離れている時ほど Stalk 細胞が移動しやすい傾向にあった。この結果から、Tip 細胞と Stalk 細胞の 2 点間の距離の変化は、前後極性形成、移動に重要であることが示唆された。内皮細胞の移動は、血管新生因子によるシグナルだけでなく、接着している細胞同士の距離が重要であると考えられる。

### ② VE-cadherin による Tip 細胞の移動制御の解析

これまでに、レーザーによる Stalk 細胞の焼却実験から、Stalk 細胞との接着が Tip 細胞の前後極性形成および移動に重要であることがわかった。Stalk 細胞との接着により、どのようにして Tip 細胞の前後極性、移動が制御されているのか明らかにするために、細胞間接着分子 VE-cadherin に注目した。モルフォリンによる VE-cadherin のノックダウンにより、中脳静脈の内皮細胞の移動が遅延した。また、Tip 細胞の前後極性形成も異常が見られた。この結果から、VE-cadherin を介した細胞間接着が Tip 細胞の前後極性、移動に重要であることが示唆された。VE-cadherin を介した細胞間接着によって、どのようにして Tip 細胞の前後極性形成および移動が制御されているのか解析する必要がある。

#### まとめ

VEGF/VEGFR2 シグナルは、血管新生に重要なシグナルであり、発生過程だけでなく、病的な血管新生にも重要である。これまで、VEGFR2 のシグナル伝達経路について明らかにされているが、生体内での血管新生過程での VEGFR2 の局在制御については不明な点が多い。本研究課題の遂行により、血管新生過程の Tip 細胞の一方方向性移動に Kif13ba を介した Vegfr2 の先端端への輸送が重要であることが示唆された。また、Tip 細胞とそれに続く Stalk 細胞の位置関係が一方方向移動に重要であることが示唆された。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

1. Yuki Wakayama, Regulatory mechanism of front-rear polarity polarization and directional migration of endothelial tip cells during angiogenesis in zebrafish., 12 years SFB/Transregion23, 2017

2. 若山勇紀、生体蛍光イメージングによる内皮細胞の形態制御機構の解析、第三回血管生物若手の会、2017 年

3. 若山勇紀、Regulatory mechanism of front-rear polarity polarization and directional migration of endothelial tip cells during angiogenesis in zebrafish., 血管生物医学会、2016 年

4. Yuki Wakayama, Regulatory mechanism of front-rear polarity polarization and directional migration of endothelial tip cells during angiogenesis in zebrafish., Closter seeon, 2016

[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 若山 勇紀 (Wakayama Yuki)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号 : 70782853