

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08560

研究課題名(和文)血管新生・リモデリング過程での流れ刺激に対する内皮細胞応答の可視化と機能解析

研究課題名(英文) Visualization and analyses of endothelial response to flow during vascular formation and remodeling

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ゼブラフィッシュ頭部の血管形成において血流依存的に血管新生および血管リモデリングが起こることを見出した。同部位では、血流依存的にカルシウム応答が起こっており、この応答にVEGFA/VEGFR2シグナルが関与することも明らかにした。本研究では、高時間分解能かつ高精細なカルシウムイメージングにより、血流に対する内皮細胞応答および応答の強さをリアルタイムに検出することで、血流依存的な血管新生の一端を解明した。さらに、蛍光ライブイメージング観察により、血流依存的な血管形成過程にケモカインやマクロファージが関与することを見出しており、血流依存的な血管形成メカニズムの解明へと繋がる成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血流による機械的刺激が生体の血管形成をどのように制御しているのかについては未解明な部分が多い。本研究では血流に対する応答を生きたまま観察することに成功しており、血流依存的な血管新生および血管リモデリングに際して、内皮細胞がいつ、どこで、血流に応答しているのかを明らかにした点で、高い学術的意義を有する。また、血流によるメカニカルファクターは、動脈硬化をはじめとする成人病の種々の病態とも深く関わることから、様々なパターンの血流に対する血管内皮細胞の応答を理解することは、血管を主因とする様々な疾患機序の解明や治療に繋がる社会的意義のある研究と言える。

研究成果の概要(英文)：We examined where and how blood flow controls vascular formation and found that blood flow regulates angiogenesis and vascular remodeling especially in the head region of zebrafish. We found that intracellular Ca²⁺ oscillations occur in endothelial cells in response to flow. These Ca²⁺ responses are also regulated by VEGFA/VEGFR2 signaling. Our time-lapse Ca²⁺ imaging in high spatial and time resolution has succeeded in visualizing endothelial responses to blood flow thereby revealed the mode of angiogenesis regulated by blood flow. In addition, we have visualized the involvement of chemokine signaling and macrophages in vascular development in the brain central arteries. Thus, our results will lead to understanding the mechanisms how blood flow regulates vascular formation in vivo.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管の主要な役割は、管として酸素や栄養分をくまなく組織に送り届け、廃棄物を回収することである。このための血管ネットワークの形成は、主に既存の血管から新たな血管が出芽する血管新生と至適構造形成のためのリモデリングにより担われている。後者は、できるだけ最小限の血管で酸素や栄養の供給を行うため、形成後の余剰な血管が剪定され、血管内腔の増減まで調節する機構である (Lucitti et al, *Development* 134: 3317-3326 (2007), Chen et al, *PLoS. Biol.* 10: e1001374 (2012))。これらの血管新生やリモデリングには、血流による機械的刺激に内皮細胞が応答することが重要であると考えられている。血流による機械的刺激は、流れと平行の向きに働く摩擦力であるシアストレス'と、心臓の拍動に応じて法線方向に働く力である'進展刺激'に大別される。これらの力のうちシアストレスについては、主に培養細胞を使った研究により分子メカニズムまで詳細に調べられているが(Ando and Yamamoto, *Cardiovasc. Res.* 99: 260-268 (2013))、生体の血管で流れ刺激がどのように血管新生やリモデリングを制御しているのかについては、未解明な点が多かった。

血管新生やリモデリングの制御機構として血管内皮増殖因子 VEGFA (vascular endothelial growth factor A)と、その受容体である VEGFR2 を介したシグナルが重要であることがよく知られている。特に血管新生では、VEGFA に応答した VEGFR2 シグナルは血管内皮細胞の出芽や移動、増殖などの生体反応を惹起することで、血管新生で中心的な役割を果たすことがわかっている(Gerhardt et al, *J. Cell Biol.* 161: 1163-1177 (2003))。一方で、血管形成後の血管では、VEGFA が細胞間接着の弛緩などを介して血管透過性の亢進を引き起こすことが知られていることから、リモデリングでも同シグナルが機能していることが考えられる(Olsson et al, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 359-371 (2006))。しかし、管化した血管での血流による機械的刺激と VEGFR2 シグナルの関係性については、あまりよくわかっていない。加えて、血流依存的な生体応答(血管新生・リモデリングなど)において VEGFR2 がどのような役割を持つのかについては、ほとんど理解が進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、ゼブラフィッシュをモデルとした生体蛍光イメージング技術を用いることで、血流によるメカニカルストレスが、血管新生や血管のリモデリングをどのように制御しているのかを明らかにすることを目的としている。特に、血流によるメカニカルストレスが、VEGF/VEGFR2 シグナルとどのように協調して細胞動態を制御するのかに着目して研究を進めている。

3. 研究の方法

血流依存的な血管新生・リモデリングを動的なまま捉えるためには高い時空間分解能での観察が必要となる。そのために、血管動態や血行動態を生きたまま可視化することができるゼブラフィッシュをモデル動物として用いた。血管の観察には、内皮細胞を EGFP でラベルするトランスジェニックゼブラフィッシュ(TG)である Tg(kdrl:EGFP)を、血行動態の観察には赤血球をラベルできる Tg(gata1:DsRed)を用い、スピニングディスク型およびライトシート型共焦点顕微鏡を用いた高速度でのタイムラプス解析を行った。さらに必要に応じて内皮細胞特異的に細胞内構造・細胞応答を可視化できるトランスジェニックゼブラフィッシュを適宜樹立している。本研究では、最先端のプロープ技術と顕微鏡を用いた高い時空間分解能での観察を行うことにより、血流、内皮細胞応答(細胞内 Ca^{2+} 変動)、内皮細胞の形態変化の三者を生きた状態で観察している。そのために、蛍光 Ca^{2+} プロープである GCaMP7a(GFP-based Ca calmodulin probe)を内皮細胞特異的に発現するトランスジェ

ニックフィッシュを新たに樹立し、細胞内シグナル伝達のセカンドメッセンジャーでもある細胞内 Ca^{2+} 上昇を機械的刺激の入力を検出するための手段として用いた。

4. 研究成果

本研究ではまず、血流依存的な血管新生・血管リモデリング過程が再現的に観察される部位の同定を試みた。ゼブラフィッシュ胚は、心拍および血流が停止している状態でも、外から酸素を取り込むことで長時間生存できるという特徴を持っている。そこで、この特徴を生かして発生途中で薬剤処理により心拍を停止させ、血流を止めた際の影響を解析したところ、頭部の血管形成過程において血流依存的に血管新生およびリモデリングが起こることを見出した。

ここで観察された血流依存的な血管新生は、VEGF受容体の阻害剤によって抑制されたことから、この過程がVEGF受容体の活性に依存することが明らかになった。以前我々は、細胞内カルシウムの上昇が、血管新生過程でのVEGFR2活性化の間接的な指標となることを見出した (*Yokota and *[Nakajima](#) et al, (*equal first author) *Elife* 4: e08817 (2015))。そこで、GCaMP7aを内皮細胞特異的に発現させ、低ノイズで内皮細胞内の細胞内 Ca^{2+} 変動を可視化できるトランスジェニックゼブラフィッシュであるTg(kdrl:GCaMP7a)を新たに樹立し、スピニングディスク型共焦点顕微鏡およびライトシート顕微鏡もちいた高時間分解能での観察を行ったところ、血流依存的な血管新生部位で細胞内カルシウム（濃度）の持続的なオシレーションが起こることが分かった。このカルシウム応答は、血流を停止させると起きなくなったことから、血管新生部位における内皮細胞が実際に血流に応答していることを突き止めた。さらに、検出されたカルシウムのオシレーションがVEGFR2の活性化を反映しているのかどうかを検討するために、VEGFR2の阻害剤で処理したところ、細胞内カルシウムの上昇が顕著に抑制されることから、カルシウム濃度の上昇がVEGFR2の活性化を反映している可能性が強く示唆された。現在、TALENによるゲノム編集を用いてVEGFR2を内皮細胞特異的に任意の時期に機能阻害するためのコンディショナルノックアウト(cKO)フィッシュの作製や、光によって部位特異的かつ時期特異的にVEGFR2を活性化できるトランスジェニックゼブラフィッシュの作製に着手しており、それらを用いて今後、VEGFR2の役割をさらに詳細に検討する。さらに、血流依存的な血管新生・血管リモデリング過程をVEGFA/VEGFR2シグナルがどのように時空間的に制御するのか解析するため、VEGFAの発現細胞を生きのまま可視化できるBACトランスジェニックTgBAC(vegfaa:dEGFP)の作製に成功した。それにより血管内皮細胞の近傍に存在する極性上皮細胞がVEGFAを発現していることを新たに見出した。これらの結果は、VEGFAと血流による機械的刺激が、協調的に血管新生を制御することを示唆しており、細胞内カルシウムの上昇がその制御下で働くことが明らかになった。さらに、血管内皮細胞と極性上皮細胞の同時イメージングを実施したところ、両細胞の協調的作用によって、血管新生と組織構築が連動して起こるという新たな現象を見出しており、今後のさらなる解析により、血管研究の新たなブレイクスルーに繋がる研究へと発展することが期待される。

血管のリモデリングについては、ゼブラフィッシュ脳底動脈の血管ネットワーク形成に着目した。同血管のネットワーク形成時には、血管新生と血管剪定が共に観察されており、血流に応じた血管リモデリングの検出に適していることがわかった。本研究では、血流依存的な血管リモデリングに重要なファクターを探索するために、阻害剤処理を網羅的に行ったところ、VEGFR2シグナルに加え、ケモカインシグナルが関与することを新たに見出した。さらに、血管リモデリングにおけるカルシウムイメージングを行うことで、血管リモデリングの際にマクロファージを介して特徴的なカルシウム応答が起きることを新たに見出しており、血流に応答してマクロ

ファージが血管内皮細胞動態を制御する可能性が示唆された。

このように本研究では、血流依存的な血管新生と血管リモデリングを血管内皮細胞の応答と共に生きのまま動的に捉えることで、これまで明らかにされていなかった新たな現象やメカニズムの解明に至っており、更に新たな展開に繋がる新規知見も得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Grimm L, Nakajima H, Chaudhury S, Bower NI, Okuda KS, Cox AG, Harvey NL, Koltowska K, Mochizuki N, Hogan BM.	4. 巻 8
2. 論文標題 Yap1 promotes sprouting and proliferation of lymphatic progenitors downstream of Vegfc in the zebrafish trunk.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 e42881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.42881.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Fukui H, Miyazaki T, Chow RW, Ishikawa H, Nakajima H, Vermot J, Mochizuki N.	4. 巻 7
2. 論文標題 Hippo signaling determines the number of venous pole cells that originate from the anterior lateral plate mesoderm in zebrafish.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 e29106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.29106.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Pauty J, Usuba R, Cheng IG, Hespel L, Takahashi H, Kato K, Kobayashi M, Nakajima H, Lee E, Yger F, Sincin F, Matsunaga YT.	4. 巻 27
2. 論文標題 A Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent Sprouting Angiogenesis Assay Based on an In Vitro Human Blood Vessel Model for the Study of Anti-Angiogenic Drugs.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ebiom.2017.12.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakajima H, Mochizuki N.	4. 巻 16
2. 論文標題 Flow pattern-dependent endothelial cell responses through transcriptional regulation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Cycle	6. 最初と最後の頁 1893
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15384101.2017.1364324.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Morooka N, Futaki S, Sato-Nishiuchi R, Nishino M, Totani Y, Shimono C, Nakano I, Nakajima H, Mochizuki N, Sekiguchi K.	4. 巻 120
2. 論文標題 Polydom is an extracellular matrix protein involved in lymphatic vessel remodeling.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Circulation Research	6. 最初と最後の頁 1276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCRESAHA.116.308825.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Bornhorst Dorothee, Xia Peng, Nakajima Hiroyuki, Dingare Chaitanya, Herzog Wiebke, Lecaudey Virginie, Mochizuki Naoki, Heisenberg Carl-Philipp, Yelon Deborah, Abdelilah-Seyfried Salim	4. 巻 10
2. 論文標題 Biomechanical signaling within the developing zebrafish heart attunes endocardial growth to myocardial chamber dimensions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-12068-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Uribe Veronica, Ramadass Radhan, Dogra Deepika, Rasouli S. Javad, Gunawan Felix, Nakajima Hiroyuki, Chiba Ayano, Reischauer Sven, Mochizuki Naoki, Stainier Didier Y. R.	4. 巻 145
2. 論文標題 In vivo analysis of cardiomyocyte proliferation during trabeculation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev164194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.164194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Hiroyuki Nakajima, Naoki Mochizuki
2. 発表標題 A novel type of flow-dependent angiogenesis in zebrafish
3. 学会等名 Weinstein2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Nakajima, Naoki Mochizuki
2. 発表標題 A novel type of flow-dependent angiogenesis in zebrafish
3. 学会等名 IVBM2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Nakajima
2. 発表標題 Imaging-based analyses of vascular development using zebrafish
3. 学会等名 iCeMS Seminar (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Nakajima, Naoki Mochizuki
2. 発表標題 Analysis of novel flow-dependent angiogenesis in zebrafish
3. 学会等名 11th Kloster Seeon Meeting "Angiogenesis" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Nakajima
2. 発表標題 Imaging-based analyses of vascular development mediated by angiogenic and mechanical cues
3. 学会等名 Max Planck Institute for Molecular Biomedicine Seminar (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Nakajima
2. 発表標題 Imaging-based Analyses of Vascular Development Mediated by Angiogenic and Mechanical Cues
3. 学会等名 University BaseI BIOZENTRUM Seminar (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中嶋洋行、 望月直樹
2. 発表標題 血流によるメカニカルストレスに依存した新規血管新生機構の解析
3. 学会等名 第26回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中嶋洋行
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いた血管形成の生体イメージング解析
3. 学会等名 第12回若手研究フォーラム【大阪大学医学系研究フォーラム】(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋洋行
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ初期胚における血管内皮細胞の新たな起源細胞の同定
3. 学会等名 第5回血管生物若手研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Nakajima, Naoki Mochizuki
2. 発表標題 A novel type of flow-dependent angiogenesis in zebrafish
3. 学会等名 IVBM2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Nakajima, Naoki Mochizuki
2. 発表標題 A novel type of flow-dependent angiogenesis in zebrafish
3. 学会等名 Weinstein2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中嶋洋行、望月直樹
2. 発表標題 血管内皮細胞のYAPは流れによる機械的刺激に应答してゼブラフィッシュの血管安定化に寄与する/Endothelial YAP responds to flow-mediated mechanical stimuli and contributes to vessel stabilization in zebrafish
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中嶋洋行
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ血管形成過程における内皮細胞応答のライブイメージング解析
3. 学会等名 国立循環器病研究センター・産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門若手会合同セミナー2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中嶋洋行、福原茂朋、望月直樹
2. 発表標題 血流による機械的刺激に対する新たな内皮細胞応答機構の解明
3. 学会等名 Molecular Cardiovascular Metabolic Conference
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中嶋洋行、望月直樹
2. 発表標題 YAPは流れ刺激に反応してゼブラフィッシュの血管安定化に寄与する/Endothelial YAP is regulated by flow-mediated mechanical stimuli and contributes to vessel stabilization in zebrafish
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroyuki Nakajima, Naoki Mochizuki
2. 発表標題 Analyses of flow-dependent angiogenesis in zebrafish
3. 学会等名 Inaugural Joint Scientific Meeting of AVBS ANZMS AAVBM (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋洋行、福本萌、望月直樹
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ血管新生におけるVEGFA/VEGFR2シグナルのイメージング解析/Imaging-based analyses of VEGFA/VEGFR2 signaling during angiogenesis in zebrafish
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会(ワークショップ)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋 洋行、石川 博之、望月 直樹
2. 発表標題 体節形成期に尾側の血管内皮細胞を供給する新たな起源細胞の同定
3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋 洋行、福井 一、宮崎 敬大、石川 博之、望月 直樹
2. 発表標題 YAP/TAZによる循環臓器構築制御/Regulation and roles of YAP/TAZ in the cardiovascular development
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会（シンポジウム）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中嶋 洋行、望月直樹
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ血管新生における血流の力学作用について/Roles of blood flow-mediated mechanical stimuli in zebrafish angiogenesis
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（シンポジウム）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中嶋 洋行、望月直樹
2. 発表標題 血管・リンパ管発生における細胞間接着・細胞死と力学（仮）
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（ワークショップ）（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 中嶋洋行	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本生物物理学会	5. 総ページ数 3
3. 書名 生物物理	

1. 著者名 福井一、千葉綾乃、宮崎敬大、石川博之、島本恵子、中嶋洋行、望月直樹	4. 発行年 2017年
2. 出版社 協和企画	5. 総ページ数 9
3. 書名 循環器病研究の進歩	

1. 著者名 中嶋洋行	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 7
3. 書名 血管新生-基礎と臨床(医学のあゆみ)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考