

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06817

研究課題名(和文) 内皮細胞の運動特性を基盤とする血管新生のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms underlying endothelial cell behaviors as a fundamental process of angiogenesis

研究代表者

礪波 一夫 (Tonami, Kazuo)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：70511393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：血管新生では、内皮細胞同士が追い越しやすれ違いにより、互いに位置関係を変えながら血管を伸長する様子が明らかとなっている。本研究では、これを制御するメカニズムを明らかにする目的で、マウス腓ラ氏島微小血管由来内皮細胞株MS-1細胞を用いた細胞動態の解析を行った。その結果、血管新生を可能にする内皮細胞固有の細胞動態として、細胞接触により亢進する、VE-カドヘリン依存性の協調的直線運動とVE-カドヘリン非依存性の回転運動を見出した。さらに、回転運動の分子機構として、CD31による細胞接着とアクチンフィラメントによるラフリング現象、Focal Adhesion Kinaseの活性化の関与が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における内皮細胞固有の協調動態としての回転運動の発見は、血管新生を可能にする細胞運動の素過程として、これまでの研究でも報告のない全く新しい知見である。その妥当性は、数理モデルに基づくシミュレーションにおいても、回転運動が血管に特徴的な枝状構造を効率よく再現したことで示されている。本研究の成果を足掛かりとし、内皮細胞固有の細胞動態を生み出す責任分子の同定、さらには遺伝子の再構成実験により非血管細胞から血管構造あるいはその一部でも作ることが出来れば、血管誘導による臓器機能の再建や細胞移植による再生医療に新しい可能性を拓くことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Angiogenesis is the process by which endothelial cells (ECs) form dendrite structures through sprouting, elongation, branching and lumenization. By analyzing single cell behaviors of MS-1 cells, we identified directional migration and unique fast rotational movement potentiated by cell-cell contact as a fundamental process of angiogenesis. Knockout (KO) of VE-cadherin attenuated the directional movement, whereas enhanced the rotational movement of MS-1 cells. These results suggested that VE-cadherin confers coordinated linear motility to ECs, which facilitates sprout elongation, whereas it is dispensable for the characteristic rotational movement. The rotational movement caused by VE-cadherin KO was driven by PECAM1 mediated cell adhesions and activated lamellipodial membrane ruffling and FAK activity involving the cell-cell interface, suggesting distinctive pFAK-Rac1 signal activation elicited from cell-cell interface as a possible mechanism for the rotational movement of ECs.

研究分野：発生医学、血管生物学、細胞生物学

キーワード：血管新生 血管内皮細胞 集団的細胞運動 VE-カドヘリン 回転運動 数理モデル 細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

血管新生では、内皮細胞が出芽・伸長・分岐・管腔形成を行い新しい血管網が構築される。応募者の所属研究室では、血管新生において内皮細胞同士が追い越しや入れ替わり、すれ違いを繰り返し、互いの位置関係を入れ替えながら、血管を伸長させている(図1)ことを明らかとてきた(参考文献1, 2)。この内皮細胞の複雑な運動パターンは血管伸長を担う集団的細胞運動と考えられたが、その役割や制御機構については不明な点が多く残されていた。申請者は、これまで細胞運動や細胞骨格の制御機構に関する研究を行ってきており、本申請においてその技術や知見を活かし、血管新生の新しい仕組みを、内皮細胞動態の視点から明らかにしようと考えた。

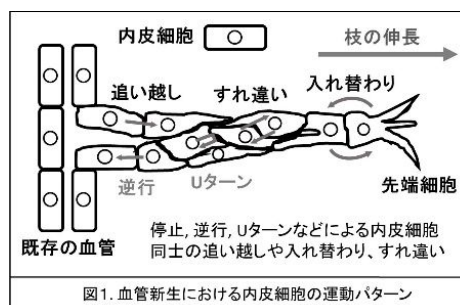


図1. 血管新生における内皮細胞の運動パターン

参考文献

- (1) Arima et al., Development 138:4763, 2011
- (2) Sugihara et al., Cell Reports 13:1814, 2015

2. 研究の目的

本研究では、血管新生における複雑な内皮細胞動態が血管の伸長において、どのような役割を持ち、またどの様に制御されているのかを明らかにすることから、血管新生の仕組みを解明することを目的とした。この目的を達成するため、本研究では次の目標を設定した。

- (1) 細胞トラッキングにより内皮細胞の1細胞および集団運動時の運動特性を抽出し、数理解析を用いながら血管新生の素過程としての内皮細胞動態を同定する。
- (2) (1)で見出した内皮細胞の特徴的動態を生み出す分子機構を、内皮細胞特異的接着分子 VE-カドヘリンとアクチン骨格、低分子量 G タンパク質活性の相互調節に着目して明らかとする。
- (3) (2)までで同定する内皮細胞の運動特性とその分子機構が、血管網の形成においてどの様に寄与しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 血管新生を可能にする素過程としての内皮細胞動態の抽出

細胞トラッキングを用いた単一細胞動態の追跡から、マウス睪ラ氏島微小血管由来内皮細胞株 MS-1 細胞と対照細胞群(間葉系の NIH3T3 細胞や上皮系の MDCK 細胞など)の統計的性質(速度、角速度、運動の方向性の指標である Persistence、運動の広がりを表す MSD など)を比較し、MS-1 細胞に特徴的な細胞運動を抽出した。細胞運動は、透過像および核染色(MS-1 細胞では SYTO16 を、内皮細胞以外の細胞種では Hoechst33342 を用いた)の共焦点タイムラプス撮影装置を用いたライブイメージングから取得した。さらに、画像解析ソフト Image-Pro Premier を用い核染色像の重心を検出し、同ソフトウェアのトラッキング機能によりこれを座標に変換し、細胞動態の軌跡として統計処理指標の算出に用いた。さらに、同定する細胞動態の血管新生の素過程としての妥当性を、数理モデルによるシミュレーションを用いて検証した。

(2) 血管新生を可能にする内皮細胞の特徴的運動を生み出す分子機構の解析

内皮細胞固有の細胞動態を生み出す分子の1つとして着目した VE-カドヘリン-GFP 融合タンパク質およびその欠失変異体のライブイメージングから、VE-カドヘリンの細胞内動態と内皮細胞の協調動態の関連を解析した。また、ライフアクトを用いたアクチン骨格のライブイメージングや細胞接着分子群の免疫細胞染色により、内皮細胞特有の動態に関わる細胞骨格や細胞接着分子の制御について解析を行った。また、各種阻害剤を用いることで活性化を伴う分子の機能阻害を行った。

4. 研究成果

(1) 血管新生を可能にする内皮細胞固有の細胞動態の同定

本研究では細胞外基質(ECM)中で発芽・伸長現象を示す MS-1 細胞(図2)と間葉系由来の NIH3T3 細胞や上皮系由来の MDCK 細胞などの単一細胞レベルでの動態を、それらの統計的性質により比較した。その結果、MS-1 細胞は細胞分裂前の1細胞状態から分裂後の2細胞状態になると、細胞接触を保ちながら運動性が亢進し、2細胞で軸を揃えながら運動の方向性が維持されるようになること。一方で、血管新生のすれ違い運動に相当するような回転運動が出現するようになり、回転運動では運動速度が増加すること(図3)を明らかとした。これらの運動は、上皮系の MDCK 細胞で見られた細胞接触に伴う運動抑

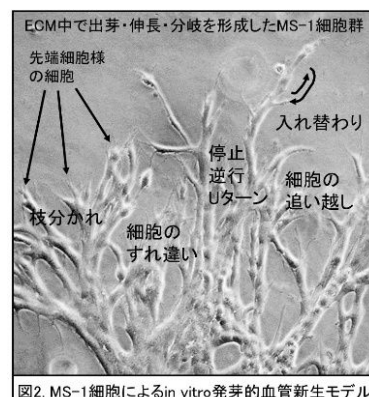


図2. MS-1細胞によるin vitro発芽的血管新生モデル

制や間葉系の NIH3T3 細胞での反発的運動で示された細胞運動の接触阻害 (Contact inhibition of locomotion; CIL) とは異なり、細胞接触により運動性が亢進することを示し、HUVEC でも同様の現象が見られたことから、血管の樹状構造形成の基本となる協調動態である可能性が示唆された。また、回転運動に象徴される内皮細胞特有の動態が血管新生時のすれ違い現象として血管伸長の推進力となる可能性が考えられた。以上の結果から、血管新生を可能にする素過程と考えられる内皮細胞固有の協調動態として、細胞接触により亢進する方向性のある運動と回転運動を同定した。

次に、上記 MS-1 細胞の協調動態に関わる分子として内皮細胞特異的の接着分子 VE-カドヘリンに着目した。CRISPR-Cas9 システムを用いて VE-カドヘリンノックアウト (KO) MS-1 細胞を作成し、その表現型を解析したところ、ECM 中で細胞運動の方向性が低下し、効率的な発芽・伸長が起らなかった。一方、細胞同士の追越しやすれ違いの性質は保たれ、運動性は亢進した。また、単一細胞動態解析では VE-カドヘリンの欠損によっても分裂後 2 細胞での接着は保持され (内皮細胞接着分子 PECAM1 の免疫染色による)、回転運動は寧ろ亢進した。また、VE-カドヘリン KO 細胞とコントロール細胞の 2 細胞の動態を詳細に解析したところ、回転運動する VE-カドヘリン KO MS-1 細胞では、2 細胞の運動に同期的な性質が認められた一方、コントロール細胞では反同期的な性質を示す部分が見出された (図 4)。以上の結果から、血管新生の基本となる内皮細胞に特徴的な細胞動態として、細胞接触により亢進する VE-カドヘリン依存性の協調的直線運動と VE-カドヘリン非依存性の回転運動を明らかとした。さらに、VE-カドヘリン非依存性の回転運動では接触細胞間における運動の同期的な性質が見出され、これに VE-カドヘリン依存性の反同期的な性質が加わることで内皮細胞特有の方向性を維持する運動が生み出されていることが示唆された (図 5)。

本研究では、数理学の研究者との共同研究により、先行研究で行われていた血管新生の数理モデル【参考文献 1】に、接触細胞間に生じる回転運動を回転の方程式で、運動の同期的または反同期的な性質を位相方程式によってそれぞれ導入した新しい数理モデルシミュレーションを構築した。その結果、2 細胞で MS-1 細胞の直線的運動と VE-カドヘリン KO MS-1 細胞の回転運動を再現することができた。また、これを多細胞に適用したところ、MS-1 細胞で見られた血管新生様の枝状構造の形成と VE-カドヘリン KO による枝状構造の退縮を *in silico* でそれぞれ再構築することに成功した。

参考文献

【1】 K. Matsuya et al., SIAM J. APPL. MATH. 76(6):2243-2259, 2016

(2) 血管新生を可能にする内皮細胞の特徴的運動を生み出す分子機構の解析

本研究では、(1)で明らかとした内皮細胞に特徴的な協調動態である、細胞接触により亢進する方向性のある運動と回転運動を生み出す分子機構についての解析に取り組んだ。

VE-カドヘリンの機能変化による内皮細胞の協調動態の制御

内皮細胞特有の協調動態における VE-カドヘリンの役割を解析するため、VE-カドヘリン-GFP 融合タンパク質を用いて MS-1 細胞の協調運動と VE-カドヘリン-GFP の細胞内動態を観察した。その結果、VE-カドヘリン-GFP が細胞の移動方向前方の接着面で細胞内に取り込まれる様子が観察され、エンドサイトーシス阻害剤 (ダイナミン依存性エンドサイトーシス阻害剤である Dynasore および Pitstop-2) により VE-カドヘリン-GFP の細胞内取り込みが抑制されると共に、MS-1 細胞の協調運動も抑制された (図 6)。また、VE-カドヘリンのエンドサイトーシス抑制型

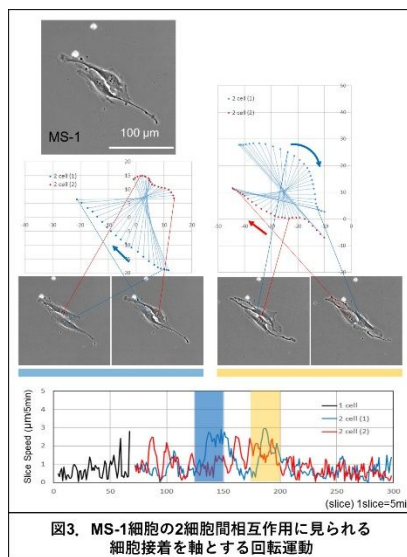


図3. MS-1細胞の2細胞間相互作用に見られる細胞接着を軸とする回転運動

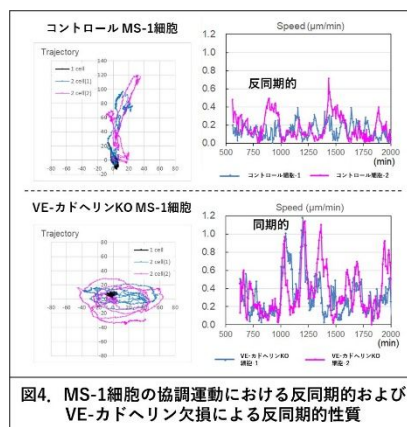


図4. MS-1細胞の協調運動における反同期的およびVE-カドヘリン欠損による反同期的性質

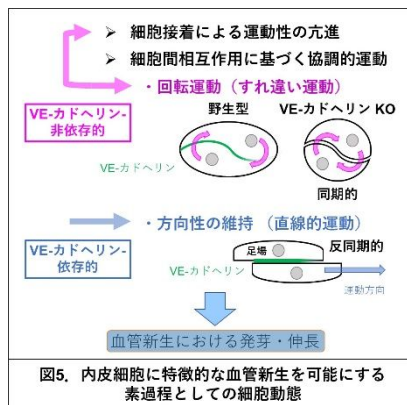


図5. 内皮細胞に特徴的な血管新生を可能にする素過程としての細胞動態

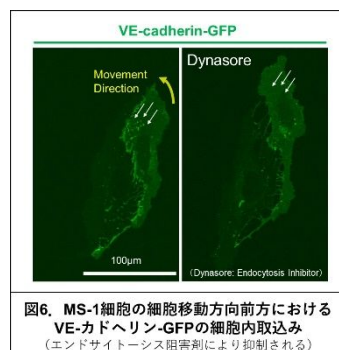


図6. MS-1細胞の細胞移動方向前方におけるVE-カドヘリン-GFPの細胞内取込み (エンドサイトーシス阻害剤により抑制される)

変異体の過剰発現によっても MS-1 細胞の細胞接触依存性の運動は抑制された。以上の結果から、細胞接着面における VE-カドヘリンのエンドサイトーシスが、内皮細胞の細胞接着を介した運動性の亢進に寄与していることが示唆された。また、回転運動時には VE-カドヘリンの鋸歯状の分布が認められ、カドヘリンの構造がエンドサイトーシスを伴わず帯状に安定化している時は MS-1 細胞の協調動態は停止する傾向が認められた。以上の結果から、VE-カドヘリンの局在や機能の変化が内皮細胞の運動パターンを制御している可能性が示され、今後さらに VE-カドヘリンの機能変化と内皮細胞の協調運動の対応を解析していく予定である。

細胞接触による運動性の亢進を基盤とした回転運動を生み出す分子機構の解析

細胞接触による運動性の亢進を基盤とした回転運動は VE-カドヘリン機能に依存しない動態であり、VE-カドヘリン KO MS-1 細胞で顕著になることから、その分子機構の解析では VE-カドヘリン KO MS-1 細胞の細胞接着（細胞間接着および細胞-基質間接着）と細胞骨格の動態に着目した解析を行った。興味深いことに VE-カドヘリン KO MS-1 細胞では VE-カドヘリンが欠損しているにも拘わらず、PECAM1 の免疫染色によって確認される細胞接着が保持されていることが明らかとなった。一方、生細胞で F-アクチンを蛍光標識するライファクトを用いた観察から、回転する VE-カドヘリン KO MS-1 細胞においては、細胞辺縁部においてアクチン線維による葉状仮足のラフリング現象が亢進しており、細胞接着面でも持続的なラフリング現象の活発化が認められた（図7）。このことは CIL では活性あるいは極性の転換によって抑制される低分子量 G タンパク質 Rac1 の活性が、内皮細胞では細胞接着面において持続的に活性化されている可能性を示唆しており、CIL とは異なる内皮細胞固有の協調運動を生み出す分子基盤として解析を継続している。

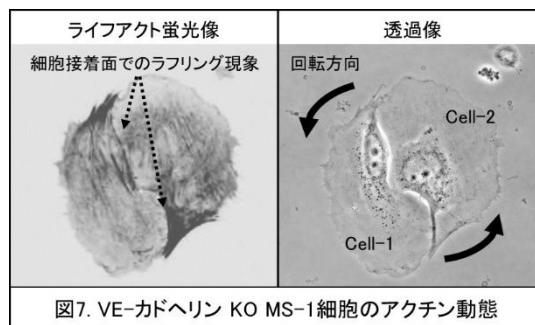


図7. VE-カドヘリン KO MS-1細胞のアクチン動態

さらに、VE-カドヘリン KO MS-1 細胞では、細胞接着面を含む細胞質領域において接着斑キナーゼ(FAK)のリン酸化亢進が認められた。また FAK の活性化阻害剤により回転運動が減弱した。このことから、内皮細胞の回転運動には FAK の活性化が関与している可能性が示されたが、リン酸化 FAK (pFAK) は Rac1 の活性を亢進するという報告があることから、細胞接着面を含む pFAK を引き金とした Rac1 の活性化が、内皮細胞に特徴的な回転運動を駆動するというユニークな分子機構が示唆された。細胞接着面を含めた pFAK の活性化がどのような内皮細胞にユニークな分子機構で誘導されているのか、を明らかにしていくことが今後の課題である。

間葉系細胞や上皮系細胞で認められる一般的な接触阻害 (Contact inhibition of locomotion; CIL) では、細胞は接触により運動を減弱させるか、反発するかして互いの衝突を避けようとする運動の性質を示す。一方、本研究で明らかとした内皮細胞固有の協調動態では、一般的な CIL とは異なり、細胞接触により運動性が亢進する固有の細胞運動様式が示された。また、本研究で同定した内皮細胞固有の協調動態としての回転運動は、血管新生を可能にする細胞運動の素過程として、これまでの研究でも報告のない全く新しい知見である。その妥当性は、数理モデルに基づくシミュレーションにおいて、回転運動が血管に特徴的な枝状構造を効率よく再現したことで示された。また、その駆動力として細胞接着面におけるアクチンフィラメントによるラフリング現象の存在が示され、その引き金として FAK の活性化が示唆された。FAK は細胞と基質間の接着機構として良く知られているが、近年細胞間接着分子との相互作用においてアクチン骨格を制御する役割も報告されており、内皮細胞にユニークな分子の使い方として注目される。本研究の成果は、内皮細胞固有の細胞動態を生み出す責任分子を同定し、これらの遺伝子の再構築により非血管細胞から血管構造あるいはその一部でも作ることに繋げることが出来れば、血管誘導による臓器機能の再建や細胞移植による再生医療に新しい可能性を拓くことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Arima Y, Nakagawa Y, Takeo T, Ishida T, Yamada T, Hino S, Nakao M, Hanada S, Umemoto T, Suda T, Sakuma T, Yamamoto T, Watanabe T, Nagaoka K, Tanaka Y, Kawamura Y, Tonami K, Kurihara H, Sato Y, Yamagata K, Nakamura T, Araki S, Yamamoto E, Izumiya Y, Sakamoto K, Kaikita K, Matsushita K, Nishiyama K, Nakagata N, Tsujita K	4. 巻 3
2. 論文標題 Murine neonatal ketogenesis preserves mitochondrial energetics by preventing protein hyperacetylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 196 ~ 210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42255-021-00342-6	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 -

1. 著者名 酒井一馬, 林達也, 時弘哲治, 礪波一夫, 栗原裕基	4. 巻 42
2. 論文標題 血管内皮細胞の動態モデルの3次元への拡張について	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 津田塾大学 数学・計算機科学研究所報	6. 最初と最後の頁 141-147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 酒井一馬, 林達也, 時弘哲治, 礪波一夫, 栗原裕基
2. 発表標題 血管内皮細胞の動態モデルの3次元への拡張について
3. 学会等名 津田塾大学 数学・計算機科学研究所 オンライン研究集会「非線形波動から可積分系へ」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 礪波一夫, 劉瀟瀟, 牛島俊征, 内島泰信, 栗原由紀子, 栗原裕基
2. 発表標題 血管新生に関わる内皮細胞の特徴的回転運動における分子動態の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 酒井 一馬, 林 達也, 間田 潤, 時弘 哲治, 礪波 一夫, 栗原 裕基
2. 発表標題 血管新生の数理モデル-3次元への拡張-
3. 学会等名 日本応用数学会2021年研究部会連合発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 礪波 一夫, 林 達也, 劉 瀟瀟, 牛島 俊征, 内島 泰信, 栗原 由紀子, 時弘 哲治, 栗原 裕基
2. 発表標題 Analysis of molecular mechanisms underlying contact-dependent rotational movement of endothelial cells
3. 学会等名 第28回日本血管生物医学会学術集会 (CVMW2020)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsuya Hayashi, Fumitaka Yura, Yuri Kominami, Jun Mada, Tetsuji Tokihiro, Kazuo Tonami, Hiroki Kurihara
2. 発表標題 Mathematical modeling for endothelial cell migration during sprouting angiogenesis
3. 学会等名 The 20th International Conference on Systems Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 礪波一夫, 林達也, 金井政宏, 由良文孝, 間田潤, 須賀原啓, 劉瀟瀟, 内島泰信, 時弘哲治, 栗原裕基
2. 発表標題 血管新生における内皮細胞のパターン形成機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内島泰信, 戸澤英人, 岩瀬晃康, 礪波一夫, 田久保直子, 栗原由紀子, 田口明系, 椎名香織, 小林美佳, 山本尚吾, 仲木竜, 興梠貴英, 油谷浩幸, 和田洋一郎, 栗原裕基
2. 発表標題 単一細胞遺伝子発現ネットワークの分析による血管新生調節機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 礪波一夫, 林達也, 金井政宏, 由良文孝, 間田潤, 劉瀟瀟, 須賀原啓, 内島泰信, 時弘哲治, 栗原裕基
2. 発表標題 血管新生の基盤となる血管内皮細胞に特有な細胞間相互作用の同定とその制御機構の解析
3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会学術集会(心血管代謝週間2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 礪波一夫, 金井政宏, 牛島俊征, 内島泰信, 栗原裕基
2. 発表標題 Analysis of single endothelial cell behaviors as a fundamental process of sprouting angiogenesis
3. 学会等名 Weinstein Cardiovascular Development and Regeneration Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林達也, 由良文孝, 間田潤, 時弘哲治, 礪波一夫, 栗原裕基
2. 発表標題 血管新生における血管内皮細胞の基本動態に関する数理モデル
3. 学会等名 日本応用数理学会2018年 年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 磯波一夫、金井政宏、牛島俊征、須賀原啓、内島泰信、栗原裕基
2. 発表標題 血管新生の素過程としての内皮細胞動態とその分子基盤の解析
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 磯波一夫、金井政宏、牛島俊征、須賀原啓、内島泰信、栗原裕基
2. 発表標題 血管新生を可能にする内皮細胞の協調動態とその分子基盤の解析
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学大学院医学系研究科代謝生理化学分野ホームページ http://bio.m.u-tokyo.ac.jp/index.html</p>

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
連携研究者	栗原 裕基 (Kurihara Hiroki) (20221947)	東京大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	反町 洋之 (Sorimachi Hiroyuki) (10211327)	公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・分野長 (82609)	
連携研究者	金井 政宏 (Kanai Masahiro) (40515821)	久留米工業大学・工学部・教授 (37115)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関