

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06867

研究課題名(和文)カルシウムシグナルを介した内皮機能・血管形成制御機構の研究

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of angiogenesis mediated by calcium signaling

研究代表者

西谷 友重(Nishitani, Tomoe)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50393244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血管形成は臓器形成や創傷治癒に不可欠な過程である。近年、血管形成過程に細胞内Ca²⁺シグナルの重要性が示唆されている。申請者らは心血管形成に必須の膜タンパク質としてTmem100を同定し、その機能にCa²⁺シグナルが関与することを見出した。本研究ではTmem100と種々のCa²⁺シグナル調節因子との関連を検討した。その結果、内皮機能に重要な役割を担うTRPV4チャネルはTmem100と結合し血管内皮細胞で共局在すること、一方、血管平滑筋に重要なTRPC6チャネルはTmem100と結合しないことを明らかにした。現在、TRPチャネル以外のTmem100結合因子についても探索中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心血管形成機構に関しては、これまで転写因子活性化シグナルの解明に焦点が絞られてきたが、細胞内Ca²⁺シグナルの重要性を示す研究は未だ新規である。今回、Tmem100とメカノセンサーとして働くTRPチャネルとの機能関連および心血管形成における寄与を証明できれば、Tmem100のイオンチャネル分子内制御因子としての新規分子機能、TRPチャネルの心血管形成における重要性、他の関連因子も含めたCa²⁺シグナルを介した心血管形成機構の重要性が明らかになり、薬物開発の新たなターゲット探索になる。総じて、ヒト疾患の病因解明・治療法の開発に向けた基礎研究として現代社会に大いに役立つことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Angiogenesis is an essential process for organogenesis and wound healing. Recently, the importance of intracellular Ca²⁺ signaling in the process of angiogenesis has been suggested. We have identified Tmem100 as an essential factor for cardiovascular angiogenesis and found that intracellular Ca²⁺ signaling is involved in its function. In the present study, we investigated the relationship between Tmem100 and various intracellular Ca²⁺ signal regulators. We found that TRPV4 channels, which play an important role in endothelial functions, physically interact with Tmem100 and co-localize with it in vascular endothelial cells, whereas TRPC6 channels, which are important for vascular smooth muscle, do not bind

研究分野：循環器系の細胞生理

キーワード：血管形成 カルシウムシグナル Tmem100 TRP チャネル

1. 研究開始当初の背景

(1) 血管形成は、胎生期の臓器形成や生後の創傷治癒などに不可欠の過程であり、その異常は胎生致死や癌などの原因となることから制御機構の解明は必須である。血管形成機構に関しては、これまで転写因子活性化シグナルの解明に焦点が絞られてきたが、近年、様々なシグナル伝達のキー因子である細胞内カルシウム (Ca^{2+}) の重要性が示唆されている^{1) 2)}。例えば、血流 (shear stress) によりメカノセンサーが活性化され細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することが報告されており²⁾、これらは胎児期心臓拍動開始により血管新生が爆発的に進む機構の1つである可能性を示唆している。血管のメカノセンサーとしては、非選択的 Ca^{2+} 透過チャネルである TRP チャネルが1つの候補となっているが、血管新生を導く経路にどのメカノセンサーや関連因子が関与し Ca^{2+} シグナルが惹起されるのか、その分子実体およびシグナル経路は明らかでない。

(2) 我々の研究グループは心血管形成に必須の膜タンパク質として Transmembrane protein No.100 (Tmem100) を同定し³⁾、その機能に Ca^{2+} シグナルが関与することを見出した⁴⁾。しかし、どのようなシグナル経路に Tmem100 が関与して血管形成に寄与しているのか詳細な分子機構は不明である。

2. 研究の目的

本研究では Tmem100 とカルシウムシグナルの関連性に着目し、新規血管形成シグナルを明らかにすることを目的とした。具体的には Tmem100 と TRP チャネルとの物理的・機能的相互作用および細胞内 Ca^{2+} シグナルとの関連を明らかにし、他の関連因子同定も含めて未知なる血管形成機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) メカノセンサーとして機能することが報告されている TRP チャネル (TRPV4)⁵⁾ および TRPC6 と Tmem100 との直節結合の有無および細胞内局在を、それぞれ免疫沈降法および免疫蛍光法を用いて検討を行った。

免疫沈降法: HEK293 細胞に mTmem100 x3FLAG-HA (マウス Tmem100 に 3FLAG および HA 標識したもの) + 2myc-mTRPV4 (2myc 標識したマウス TRPV4)、あるいは hTmem100-myc (ヒト Tmem100 に myc 標識したもの) + hTRPC6-HA (ヒト TRPC6 に HA 標識したもの) を遺伝子導入し、control IgG 抗体、mouse anti-myc 抗体または rat anti-HA 抗体にて免疫沈降した後、rabbit anti-myc 抗体、rabbit anti-FLAG 抗体、または rabbit anti-HA 抗体にてイムノブロットを行った。

免疫蛍光法: ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に mTmem100 x3FLAG-HA および 2myc-mTRPV4 をエレクトロポレーションにより遺伝子導入を行い、ガラスシャーレに撒きなおしたのち 12 時間後に免疫蛍光法を行った。すなわち、細胞を 4%ホルムアルデヒドで固定した後 (4、15分) 0.2% TritonX-100 で透過処理 (室温、5分) を行い、5% BSA/PBS でブロッキング (室温、30分の後)、一次抗体 (mouse anti-Flag or rabbit anti-myc 抗体) (室温、1時間) 引き続き蛍光標識された 2次抗体 (Alexa488 conjugated anti-rabbit IgG, Alexa546-conjugated anti-mouse IgG) (室温、45分) で処理し、洗浄の後、共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス FV1000) にて蛍光観察を行った。

(2) Tmem100 の有無で TRPV4 活性に影響があるか否か、パッチクランプ法による TRPV4 電流量測定および蛍光測定法による細胞内 Ca²⁺レベル測定により検討できる系を立ち上げた。

Myc-TRPV4 を恒常的に発現した HEK 細胞の作製: HEK293A 細胞に Myc-TRPV4 (ネオマイシン耐性) をトランスフェクションし、ジェネティシン (G418) 存在下で培養して TRPV4 を恒常的に発現する細胞を作製した。

パッチクランプ法による TRPV4 電流量測定: TRPV4 発現 HEK 細胞をホールセルパッチクランプにて膜電位 40mV で保持し、アゴニストである 4α-PDD を加えて TRPV4 チャネルを活性化した。

蛍光測定法による細胞内 Ca²⁺レベル測定: TRPV4 発現 HEK 細胞および非発現細胞に Ca²⁺ 指示薬である Fura-2 を導入し (4μM, 30 分) 4α-PDD 添加による細胞内 Ca²⁺ の増加をレシオイメージングした。

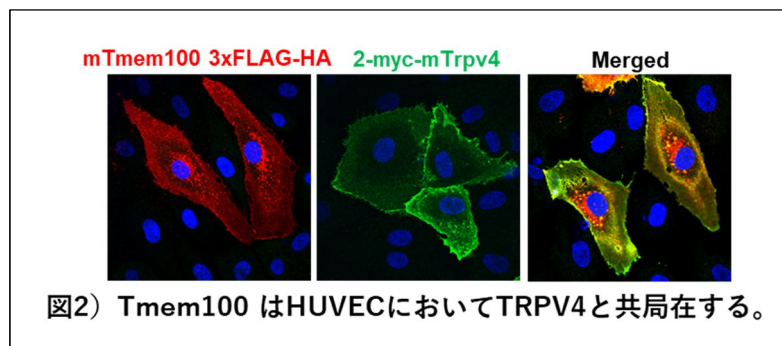
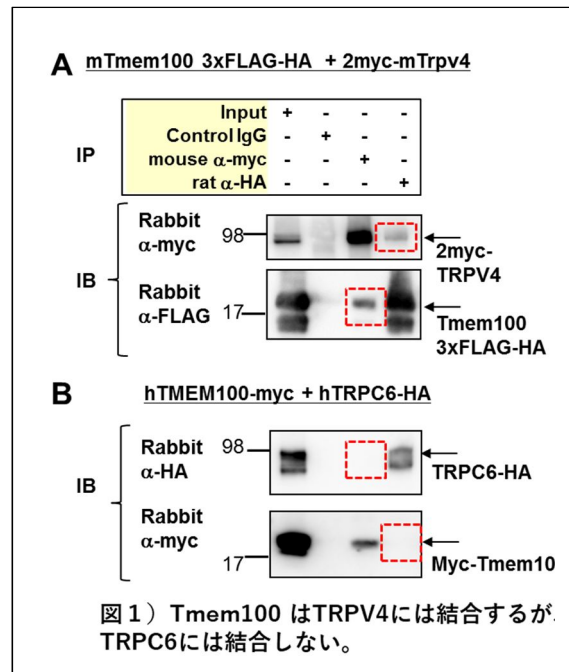
(3) Tmem100 結合因子の網羅的探索

HUVEC に Tmem100 x3FLAG-HA をコードするアデノウイルスあるいはコントロールアデノウイルス (LacZ) をインフェクションし、抗 HA 抗体結合セファロースにより免疫沈降後、ペプチド溶出を行った。その後、銀染色にて Tmem100 x3FLAG-HA 群とコントロール群を比較し、Tmem100 x3FLAG-HA 群にのみ認められたバンドを見出した。

4. 研究成果

(1) 発現系での実験により、Tmem100 (mTmem100 x3FLAG-HA) は内皮で重要な役割を担う TRPV4 (2myc-mTRPV4) との結合が認められた (図 1A)。一方、Tmem100 (hTMEM100-myc) は、血管平滑筋に重要な役割を担う TRPC6 (hTRPC6-HA) には結合は認められなかった (図 1B)。この物理的相互作用は、Tmem100, TRPV4, TRPC6 いずれを先に免疫沈降しても同じ結果が得られた。

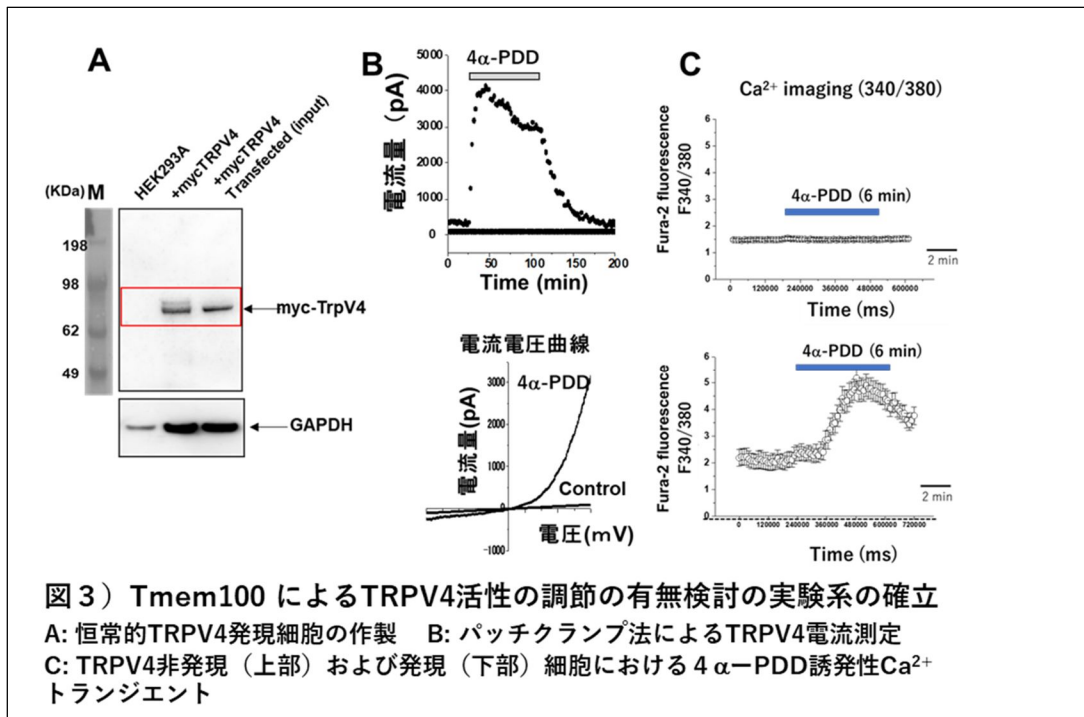
(2) また Tmem100 は HUVEC において単独発現の際には主に小胞体 (ER) 膜に、一方 TRPV4 は形質膜に主に局在していたが、共発現させると Tmem100 も小胞体近傍のみならず形質膜において共局在していた (図 2)。図 1、図 2



の結果から、Tmem100 が TRPV4 と相互作用して血管形成過程に寄与する可能性がある。

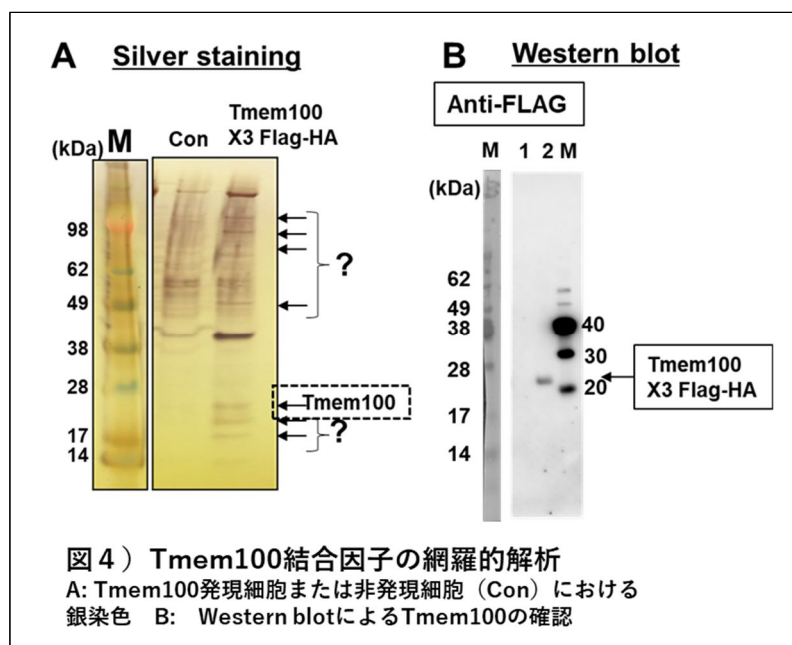
(3) Tmem100 が TRPV4 の機能に影響するか確認するための実験系の確立。

上記方法により、TRPV4 を恒常的に発現する HEK293A 細胞を作製したところ、一過的に TRPV4 を発現する細胞と同程度の発現が認められた (図 3A)。これら細胞を用いてホールセルパッチクランプ法にて TRPV4 のアゴニストである 4 α -PDD を添加したところ、図 3B のように外向き整流性の TRPV4 電流が測定できた。さらに Fura-2 を用いた細胞内 Ca²⁺ 蛍光測定を行った結果、図 3C に示すように、TRPV4 を発現した細胞においてのみ Ca²⁺ トランジエントが認められた。今後はこの実験系を用いて Tmem100 をアデノウイルスにてインフェクションし、Tmem100 の有無で TRPV4 活性が変化するか、電気生理学的手法および蛍光イメージング法により明らかにする予定である。こういった測定はこれまでに何度も行ってきている^{6, 7)}。



(4) Tmem100 結合因子の網羅的探索に関して、

図 4A の銀染色に示すように、Tmem100 以外に既にいくつかの結合候補因子のバンドが認められている。今後はこれらのバンドを切り出し、質量分析にかけて Tmem100 の結合因子を同定する予定である。こういったプロテオーム的手法による結合タンパク



質の同定は、これまでも行ってきた⁸⁾。

<引用文献>

Yokota Y, Nakajima H, Wakayama Y, Muto A, Kawakami K, Fukuhara S, Mochizuki N. Endothelial Ca²⁺ oscillations reflect VEGFR signaling-regulated angiogenic capacity in vivo. *Elife*, 4, 2015.

Ando J, Yamamoto K. Flow detection and calcium signalling in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*, 99, 2013, 260-8.

Somekawa S, Imagawa K, Hayashi H, Sakabe M, Ioka T, Sato GE, Inada K, Iwamoto T, Mori T, Uemura S, Nakagawa O, Saito Y. Tmem100, an ALK1 receptor signaling-dependent gene essential for arterial endothelium differentiation and vascular morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 2012, 12064-9.

Mizuta K, Sakabe M, Hashimoto A, Ioka T, Sakai C, Okumura K, Hattamaru M, Fujita M, Araki M, Somekawa S, Saito Y, Nakagawa O. Impairment of endothelial-mesenchymal transformation during atrioventricular cushion formation in Tmem100 null embryos. *Dev Dyn*, 244, 2015, 31-42.

Shibasaki K. TRPV4 ion channel as important cell sensors. *J Anesth*, 30, 2016, 1014-1019.

Nakamura TY, Pountney DJ, Ozaita A, Nandi S, Ueda S, Rudy B, Coetzee WA. A role for frequenin, a Ca²⁺-binding protein, as a regulator of Kv4 K⁺-currents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 2001, 12808-13.

Nakamura TY, Jeromin A, Mikoshiba K, Wakabayashi S. Neuronal calcium sensor-1 promotes immature heart function and hypertrophy by enhancing Ca²⁺ signals. *Circ Res*, 109, 2011, 512-23.

Hisamitsu T, Nakamura TY, Wakabayashi S. Na(+)/H(+) exchanger 1 directly binds to calcineurin A and activates downstream NFAT signaling, leading to cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biol*, 32, 2012, 3265-80.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kiguchi Norikazu, Fukazawa Yohji, Saika Ayano, Uta Daisuke, Saika Fumihiro, Nakamura Tomoe Y., Ko Mei Chuan, Kishioka Shiroh	4. 巻 9
2. 論文標題 Chemogenetic activation of central gastrin releasing peptide expressing neurons elicits itch related scratching behavior in male and female mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacology Research & Perspectives	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/prp2.790	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 -
1. 著者名 Nakamura-Nishitani Tomoe Y.	4. 巻 156
2. 論文標題 A novel Ca^{2+} regulatory mechanism specific for immature hearts and its potential as a therapeutic target	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 346 ~ 350
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.21056	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 -
1. 著者名 西谷(中村)友重	4. 巻 72
2. 論文標題 興奮性細胞における新規Ca ²⁺ シグナル制御因子NCS-1の多彩な生理機能と各種疾患との関連	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 和歌山医学	6. 最初と最後の頁 192-197
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 -
1. 著者名 Saika Fumihiro, Matsuzaki Shinsuke, Kobayashi Daichi, Ideguchi Yuya, Nakamura Tomoe Y., Kishioka Shiroh, Kiguchi Norikazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Chemogenetic Regulation of CX3CR1-Expressing Microglia Using Gi-DREADD Exerts Sex-Dependent Anti-Allodynic Effects in Mouse Models of Neuropathic Pain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2020.00925	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 -

1. 著者名 Nakamura TY, Nakao S, Wakabayashi S	4. 巻 12
2. 論文標題 Emerging Roles of Neuronal Ca ²⁺ Sensor-1 in Cardiac and Neuronal Tissues	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Mol Neurosci.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2019.00056	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 -

[学会発表] 計17件(うち招待講演 2件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 西谷(中村)友重
2. 発表標題 細胞内Ca ²⁺ 調節因子NCS-1の興奮性組織における多彩な生理機能
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田純平, 松村早季子, 石村洋輝, 長洲弘真, 西谷(中村)友重
2. 発表標題 タバコ煙抽出液が成熟および新生子心筋細胞の収縮、自動拍動および細胞内Ca ²⁺ 動態に及ぼす影響
3. 学会等名 第95回日本薬理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 陳以珊, 西谷友重
2. 発表標題 GIRKチャネルとその疾患関連変異体への新規作用薬の同定
3. 学会等名 第95回日本薬理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoe Nishitani
2. 発表標題 A novel Ca ²⁺ regulatory mechanism specific for immature heart function, and its potential as a therapeutic target
3. 学会等名 The 1st International Symposium for Postgraduates on Basic Medical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 雑賀 彩乃, 木口 倫一, 深澤 洋滋, 雑賀 史浩, 西谷 友重
2. 発表標題 痒みの発現におけるGRP産生ニューロンの役割
3. 学会等名 第138回 日本薬理学会近畿支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoe Y. Nakamura-Nishitani
2. 発表標題 Novel therapeutic targets for heart diseases that regulate the immature heart-specific intracellular Ca ²⁺ signaling pathways
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 雑賀 史浩, 木口 倫一, 松崎 伸介, 西谷-中村 友重
2. 発表標題 Gi/Gq DREADDを用いた脊髄ミクログリアの操作による性依存的な疼痛制御機構
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中尾 周, 松村 早奇子, 若林 繁夫1, 中村 (西谷) 友重
2. 発表標題 細胞内Ca ²⁺ シグナルを介した新規エネルギー代謝制御機構
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西谷(中村)友重
2. 発表標題 小児特有の細胞内Ca ²⁺ シグナル調節を介した新規心疾患治療標的
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoe Nakamura-Nishitani, Shu Nakao, Hirotsugu Tsuchimochi, James Pearson, Shigeo Wakabayashi
2. 発表標題 A novel regulatory mechanism of energy metabolism mediated by Neuronal calcium sensor-1 and its relation to exercise therapies
3. 学会等名 第97回 日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoe Y. Nakamura-Nishitani, Shu Nakao, Shigeo Wakabayashi
2. 発表標題 Regulation of mitochondrial respiration, energy metabolism, and obesity by Neuronal Ca ²⁺ Sensor-1
3. 学会等名 9thFAOPS congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村(西谷)友重, 中尾 周, 土持 裕胤, ピアソン ジェームス, 若林繁夫
2. 発表標題 カルシウムシグナル調節因子NCS-1欠損によるエネルギー代謝異常と運動療法の効果
3. 学会等名 第112回近畿生理学談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke WATANABE, Shuhei ISHII, Taiki UEMOTO, Tomoe NAKAMURA-NISHITANI, Daiki SEYA, Dai IHARA, Teruhisa KAWAMURA, Osamu NAKAGAWA
2. 発表標題 Significance of the Hey family of transcription factors during cardiovascular development
3. 学会等名 International Vascular Biology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke WATANABE, Tomoe NAKAMURA-NISHITANI, Daiki SEYA, Dai IHARA, Teruhisa KAWAMURA, Osamu NAKAGAWA
2. 発表標題 Significance of Hey transcriptional factors in endothelial cells during cardiovascular development
3. 学会等名 日本血管生物医学会 第16回Korea-Japan Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke WATANABE, Tomoe NAKAMURA-NISHITANI, Daiki SEYA, Dai IHARA, Teruhisa KAWAMURA, Osamu NAKAGAWA
2. 発表標題 Significance of Hey transcriptional factors in endothelial cells during cardiovascular development
3. 学会等名 日本循環器学会第2回 Basic Cardiovascular Research Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Osamu NAKAGAWA, Yusuke WATANABE, Yumi KINUGASA-KATAYAMA, Tomoe NAKAMURA-NISHITANI, Yukihiko HARADA, Norika Liu, Toru TANAKA, Daiki SEYA, Dai IHARA, Teruhisa KAWAMURA
2. 発表標題 Transcriptional regulation and physiological significance of BMP-ALK1 signal target genes in embryonic vascular endothelial cell
3. 学会等名 12th International BMP Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西谷-中村友重、渡邊裕介、瀬谷大貴、田中亨、中川修
2. 発表標題 Hey転写調節因子ファミリーの胎生期血管形成における細胞特異的意義の解析
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〕

-

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
研究分担者	中川 修 (Nakagawa Osmu) (40283593)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長 (84404)	

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
---------	---------