

機関番号：84404

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20370083

研究課題名（和文） 血管新生のための血管内皮細胞特異的な乖離・接着調節機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of adhesion and deadhesion of endothelial cells required for angiogenesis

研究代表者

望月 直樹（ MOCHIZUKI NAOKI ）

独立行政法人国立循環器病研究センター・細胞生物学部・部長

研究者番号：30311426

研究成果の概要（和文）：アンジオポエチン 1-Tie2 は転写因子の調節を行うことが重要であることを突き止めた。AKT は MEF 2 のリン酸化を介して Kruppel-like factor2 の転写を亢進させ eNOS の転写増加と VCAM-1 の転写抑制を誘導することがわかった。さらに、AKT は GSK3 β をリン酸化することにより β -カテニンの分解を抑制し、接着依存性に活性化される Dll4/Notch 系の NICD(Notch 細胞内ドメイン)と結合することで、さらに Dll4 の転写を増加させて VEGFR2 の発現を抑制することがわかった。この二つの経路により血管の安定化が調節されていることを明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：Angiopopoetin-1(Ang1)-Tie2 signal promotes the expression of Kruppel-like factor 2 that is known to be a transcription factor essential for vascular quiescence. In addition, Ang1/Tie2 induces Dll4 expression by inhibiting degradation of beta-catenin in a manner dependent on AKT. Dll4/Notch signal upon cell-cell contacts is believed to inhibit VEGF-VEGFR2 signal. Collectively, Ang1/Tie2 signal stabilizes endothelial cells by inhibiting VEGF-VEGFR2 signal.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2009 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	16,000,000	4,800,000	20,800,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：シグナル伝達、細胞間接着、血管新生

1. 研究開始当初の背景

血管新生の中心的な機能を果たす細胞である血管内皮細胞の特徴として

・上皮細胞と異なり細胞間接着分子が Tight Junction (TJ), Adherens Junction (AJ) に別れて局在せず VE-cadherin, PECAM-1 が接着部

位に混在して密に発現している点

・内皮細胞特異的なチロシンキナーゼ受容体 Vascular Endothelial Growth Factor 受容体 (VEGF-R), angiopoietin (Ang) 受容体 である Tie ファミリー受容体が発現していること

・反発(repulsion)や誘導 (attraction) を調節する Ephrin-Eph 系, Delta-Notch, Semaphorin-Plexin, が神経系と同様に発現していること をあげることができる。

以上の特徴を考えると空間的・空間的に如何にこれらの分子が機能しているかを調べることで乖離から再接着までの血管新生を理解できると考えている。血管から分枝をおこすには先ず安定化している血管接着を乖離させること不可欠であり、Ang-2 がかわることが予想されている。しかし如何なるメカニズムで Ang2 が既存の細胞間接着を弛緩あるいは乖離させるのかは不明である。虚血・癌組織から分泌される VEGF-VEGFR 系のシグナルが細胞間接着を緩めると報告されているがその機序も明確ではない。また一度、乖離した血管から伸張した新生血管が安定な接着を取り戻す時間軸を含めた 4 次元の生命現象を論理的に説明できてはいない。

内皮細胞の増殖・遊走は VEGF-VEGFR2、Ang1-Tie2 のいずれでも報告されているが Ang1-Tie2 系は接着の安定化も誘導する。この相反する情報伝達の制御を如何にして細胞は使い分けているのかはまったく理解されていない。VEGF-VEGFR2 も Ang1-Tie2 も増殖や遊走の指標となる ERK キナーゼもあるいは抗アポトーシスに機能する AKT キナーゼも顕著に活性化する。しかし、「何故 VEGFR2, Tie2 活性化では増殖・遊走と細胞接着の安定化のシグナルが同時におきるのに乖離から分枝と接着の増強にわかれるのか？」という疑問が残る。血管内皮細胞は、細胞間の接着と乖離を見事にコントロールすることによって、発生あるいは臓器形成の際に円滑な血管新生を成立させている。一方、癌・虚血での病的血管新でも血管構築に不可欠である。本申請研究では、いまだに全貌が解明されていない血管内皮細胞の乖離・接着のメカニズムを接着因子 Vascular endothelial cadherin (VE-cadherin)、platelet and endothelial adhesion molecule-1 (PECAM-1) と、血管内皮細胞特異的なチロシンキナーゼ調節系 (angiopoietin (Ang)-Tie 受容体系・ Vascular endothelial growth factor

(VEGF)-VEGF-R 受容体系) のシグナルを明らかにすることで理解することを目的とする。我々は、“細胞間接着の有無によって受容体チロシンキナーゼの下流の相違が生じる” のではないかという仮説をたてている。安定化した血管では接着を乖離させるリガンド刺激があり、その後にある程度弛緩した接着では別のリガンド刺激を受け、増殖・遊走に働き、まったく接着のない細胞では増殖・遊走のみ活性化され、最後に接着を増強させるリガンド刺激で血管内皮細胞の接着が完成して安定化した血管が構築される。この過程は、内皮細胞特異的なチロシンキナーゼ受容体と内皮細胞特異的な接着分子に焦点をあてることで詳らかにすることができると考えている。

2. 研究の目的

血管内皮細胞は、細胞間の接着と乖離を見事にコントロールすることによって、発生あるいは臓器形成の際に円滑な血管新生を成立させている。一方、癌・虚血での病的血管新でも血管構築に不可欠である。本申請研究では、いまだに全貌が解明されていない血管内皮細胞の乖離・接着のメカニズムを接着因子 Vascular endothelial cadherin (VE-cadherin)、platelet and endothelial adhesion molecule-1 (PECAM-1) と、血管内皮細胞特異的なチロシンキナーゼ調節系 (angiopoietin (Ang)-Tie 受容体系・ Vascular endothelial growth factor (VEGF)-VEGF-R 受容体系) のシグナルを明らかにすることで理解することを目的とする。我々は、“細胞間接着の有無によって受容体チロシンキナーゼの下流の相違が生じる” のではないかという仮説をたてている。安定化した血管では接着を乖離させるリガンド刺激があり、その後にある程度弛緩した接着では別のリガンド刺激を受け、増殖・遊走に働き、まったく接着のない細胞では増殖・遊走のみ活性化され、最後に接着を増強させるリガンド刺激で血管内皮細胞の接着が完成して安定化した血管が構築される。この過程は、内皮細胞特異的なチロシンキナーゼ受容体と内皮細胞特異的な接着分子に焦点をあてることで詳らかにすることができると考えている。

3. 研究の方法

細胞間接着分子と受容体系のシグナルへの影響の検討

同数の HUVECs を confluent あるいは, sparse に培養して VEGF で刺激したときの ERK, AKT の活性化の違いの有無を調べる。Confluent と Sparse で ERK, AKT の活性化の違いが見られた時には microarray 解析を行い転写誘導される遺伝子を調べて、angiogenesis にかかわる因子を明かにする。生理的な血管新生でも、癌による血管新生でも VEGF が Notch1, Delta4 の転写を増加させることが報告されており、血管新生調節分子群間でも転写制御により、新生の停止あるいは促進を調節するフィードバック、フィードフォワード機構が存在すると予想されるので、これを接着の有無によって検討する（下図上段参照）。

細胞間接着分子 VE-cadherin あるいは PECAM-1 の有無による Ang1-Tie2 系シグナル、VEGF-VEGFR2 系シグナルへの影響の検討。すでにこれまでの検討で Ang1-Tie2 系は少なくとも接着の有無により ERK, AKT の活性化に軽重が生じることが判明している。したがって接着の有無が VE-cadherin, PECAM-1 を介した調節系によるものであるかを確認するために、VE-cadherin, PECAM-1 のそれぞれのノックダウン細胞で ERK, AKT の活性化を調べる。これまでに、HUVECs では VE-cadherin, PECAM-1 の 90%以上のノックダウン効率がえられることも確認済みである。

Ephrin-Eph による VEGF-VEGFR, Ang1-Tie2 系への影響を調べる。血管内皮細胞 HUVECs には EphB 受容体のうちで EpnB1, B2, B3, B4 が発現している (FASEB J 16; 1126-1128, 2002)。いずれも、ephrin-B2 の受容体として作用するので、HUVECs に発現しているリガンド、Ephrin-B2 をノックダウンすることで内因性の ephrinB2-Eph B シグナルを抑制することができる。この条件で VEGF, Ang1 で HUVECs を刺激した場合の細胞内情報伝達 ERK, AKT の活性化を野生型細胞と比較することで細胞間接着 ephrin-Eph 系の血管内皮細胞特異的チロシンキナーゼ受容体シグナルへの影響を調べることになる（下図 下段参照）。

VE-cadherin, PECAM-1 の初期接着による細胞の増殖・遊走抑制と接着安定化機構の解明

血管新生のために分枝、あるいは遊走した血管内皮細胞の増殖や遊走を停止させるメカニズムとして再接着による細胞間接着がも

たら細胞内情報伝達系は重要であると予想される。これまでに VE-cadherin 接着依存性に低分子量 GTPase Rap1 が活性化して、cortical actin の束化を促進して接着の安定化が起きることを証明したが (Mol. Biol. Cell 2006)、増殖シグナルへの影響は調べていない。本計画では、① Vascular endothelial protein tyrosine phosphatase (VE-PTP) の機能について接着依存性のチロシンフォスファターゼ活性化が増加するか、あるいは VE-PTP の集積によってチロシンの脱リン酸化が促進されるのかを調べる。② 初期接着時の VEGFR2, Tie2 のシグナルも検討する。HUVECs を subconfluent に捲いて、接着が緩いときの Ang1, VEGF 刺激で ERK の抑制に働く Dual Specificity phosphatase の誘導がおきるのかを調べる。

接着分子のsheddingについての検討

delta-Notch のシグナルでは Notch が γ -secretase によって切断された細胞内ドメイン (NICD) が血管新生に重要であることが示されている (reviewed in Cancer Cell 8; 1-3, 2005 and Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8; 464-478, 2007)。我々もすでに VE-cadherin が Protein kinase C の活性化により protease で shedding されることを突き止めている。この shedding された VE-cadherin の細胞内ドメインの血管新生における生理的意義が不明である。したがって、本申請では

- ✓ VEGF-VEGFR2 刺激により VE-cadherin の shedding がおきるのか？
- ✓ Ang1-Tie2 系により VE-cadherin の shedding が誘導されるのか？
- ✓ VEGF, Ang1 刺激により PECAM-1 の shedding は誘導されるのか？
- ✓ L-細胞に shedding 不可の VE-cadherin と VEGFR2 あるいは、Tie2 を発現させてリガンド刺激した際の遺伝子発現の違いをみることによって shedding による転写の相違を探して、shed された VE-cadherin の転写因子としての機能を探る。

4. 研究成果

Ang1-Tie2系が細胞—細胞間接着に依存して局在を変化させ、Tie2の下流の細胞内情報伝達系を変化させていることを突き止めた。Tie2は細胞間接着(+)では細胞—細胞間接着部位に集積

するのに対して、細胞間接着(-)細胞では細胞-基質間接着部位にAng1とともに局在することがわかった。この結果は、細胞間接着部位ではAng1によるトランス結合によりTie2を局在化して、基質にAng1がTie2を繋ぎ止めることで同部位への集積を誘導していることを証明した。さらに、Ang-Tie2の細胞間接着部位あるいは細胞-基質間接着部位への集積にはVE-cadherin, PECAM-1は関係がまったくないことを二つの分子のノックダウンによって明らかにした。

血管形成とくに発生における血管新生でのAng1, Ang2, Tie1, Tie2の機能を明らかにするためにZebrafishを用いた血管の可視化による機能の検討を開始した。ZebrafishはMyr-GFPを血管内皮細胞特異的に発現する系をトランスポゾンを用いてゲノム内に組み込むシステムで構築を始めた。野生型のZebrafishでAng1, Ang2, Tie1, Tie2のノックダウンをモルフォリノにより行い形態変化を観察したが、著明な血管構築の異常を認めなかったことから哺乳類とは異なるAng-Tieシステムが血管新生を調節している可能性が示唆された。

血管内皮細胞の細胞間接着の状態での血管内皮細胞の安定化にAng1-Tie2受容体系が重要であることを示していたが、本年はAng1-Tie2によって増加するD114-Notch系の細胞間接着安定化機構について調べた。Ang1によってD114の発現が増加するが、このメカニズムを検討した。D114-NotchシグナルはVEGFR2の発現を抑制することにより、VEGF依存性の透過性亢進や、filopodia形成すなわち細胞運動を抑制することが知られている。したがって、安定化機構についてこのシグナルを検討した。

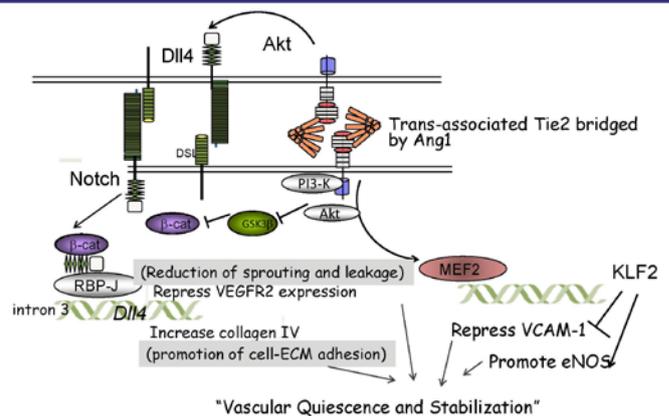
D114のプロモーターとLuciferaseを繋いだ転写アッセイ系では、Notch intracellular domain (NICD)の相加的作用によりD114の転写が増加した。またAng1によるD114の発現増加が、g-secretaseの抑制薬により阻害されることから、D114の発現増加には、Notchのsheddingが重要であることを明らかにすることができた。Ang1刺激によってもNICDの増加がみられることから、シグナル調節機構としてD114-NotchシグナルによってさらにD114の発現を増加させて、安定化を調節していることが予想される。

血管内皮細胞の細胞間接着の状態での血管内皮細胞の安定化における

Angiopoietin-1 (Ang1)-Tie2受容体系シグナルの解析を進めた。Ang1-Tie2によって増加するD114-Notch系の細胞間接着安定化機構について調べたところD114-Notch系シグナルは細胞間接着(+)の時のみ活性化するので、Tie2の下流シグナルAktと強制的にD11-Notch系が機能して、さらにD114の発現を亢進させる結果となった。Aktによって、GSK3betaのリン酸化が生じ、betaカテニンによる転写活性が増加することが重要であることを突き止めた。このD114の転写増加は、D114プロモーターのイントロン3に存在するRBP-J結合配列に結合したNotch細胞内ドメイン(NICD)とbetaカテニンが相乗的にD114の転写活性を増加するメカニズムがあることがわかった。さらにD114の転写が増加することによるNICDの増加が起こる。NICDの増加による血管安定化メカニズムを検討した。血管内皮細胞でNICDの増加に伴いコラーゲンTypeIVの転写が増加した。3Dの血管内皮細胞のイメージングによってもコラーゲンの増加がAng1依存性に生じることもわかった。以上、Ang1による血管安定化機構にD114-Notchさらに、コラーゲンの増加による血管内皮細胞の基質接着への増加が示唆された。

以上、本研究では主に、Ang1-Tie2系のシグナルによって血管安定化が誘導されるメカニズムの詳細を明らかにすることができた(まとめの図を下記に示す)。

アンジオポエチン-Tie2シグナルによる血管安定化機構



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 10 件）

- ① Fukuhara S. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat. Cell Biol.*10 : 513-526,2008 査読有
- ② Koyama T. Interaction of scaffolding adaptor protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 negatively regulates IGF-I-dependent myogenic differentiation via the ERK1/2 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 283: 24234-24244, 2008 査読有
- ③ Kidoya H. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J.*27:522-534,2008 査読有
- ④ Yasuda N. Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation. *EMBO Rep* 9:179-186,2008 査読有
- ⑤ Mochizuki N. 15-lipoxygenase-1 in the vasculature: expanding roles in angiogenesis. *102:143-145*,2008 査読有
- ⑥ Makita N. Single Common Mutation in the Cardiac Sodium Channel Gene *SCN5A* with Diverse Clinical Phenotypes. *J. Clin. Invest.* 118:2219-2229,2008 査読有
- ⑦ Noda K, Zhang J, Fukuhara S., Kunimoto S, Yoshimura M, Mochizuki N. Vascular Endothelial-Cadherin Stabilizes at Cell-Cell Junctions by Anchoring to Circumferential Actin Bundles through α - and β -Catenins in Cyclic AMP-Epac-Rap1 Signal-activated Endothelial Cells. *Mol. Biol. Cell* 21: 584-596, 2010 査読有
- ⑧ Nagahama Y, Ueno M, Miyamoto S, Morii E, Minami T, Mochizuki N. Saya H, Takakura N. PSF1, a DNA replication factor expressed widely in stem and progenitor cells, drives tumorigenic and metastatic properties. *Cancer Res.*70:1215-1224,2010 査読有
- ⑨ Zhang J. Angiopoietin-1/Tie2 Signal Augments Basal Notch Signal Controlling Vascular Quiescence by Inducing Delta-Like 4 Expression through AKT-mediated Activation of β -Catenin. *J. Biol. Chem.* 286: 8055-8066. 2011 査読有
- ⑩ Shioyama W, Docking Protein Gab1 Is an Essential Component of Postnatal Angiogenesis

After Ischemia via HGF/c-Met Signaling. *Circ. Res.*108:664-675,2011 査読有

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① Mochizuki N. A Sphingosine-1 phosphate transporter in zebrafish. European School of haematology Interdisciplinary conference. June 7, 2009 Helsinki
- ② Naoki Mochizuki Angiopoietin-1/ Tie2-mediated vascular maturation and quiescence are reregulate by Dll4-Notch signaling. Kloster Seeon Angiogenesis Meeting 2010, Sep18-20, 2010Kloster Seeon, Germany

〔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

望月 直樹 (MOCHIZUKI NAOKI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・
細胞生物学部・部長

研究者番号：30311426

(2) 研究分担者

福原 茂朋 (FUKUHARA SHIGETOMO)
独立行政法人国立循環器病研究センター・
細胞生物学部・室長
研究者番号：70332880

(3) 連携研究者

増田 道隆 (MASUDA MICHITAKA)
独立行政法人国立循環器病研究センター・
細胞生物学部・室長
研究者番号：00190364

川原 敦雄 (KAWAHARA ATSUO)
独立行政法人国立循環器病研究センター・
細胞生物学部・室長
研究者番号：10362519

三浦 浩一 (MIURA KOICHI)
独立行政法人国立循環器病研究センター・
細胞生物学部・研究員
研究者番号：20360349