

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590878

研究課題名(和文) 血管新生における転写制御因子 Id の役割に関する研究

研究課題名(英文) Role of transcriptional factor Id in angiogenesis

研究代表者

西山 功一 (NISHIYAMA KOICHI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80398221

研究成果の概要(和文)：

本研究では、血管が新生される際の helix-loop-helix (HLH) 型転写因子 Id1 の役割に関して検討した。組織学的解析から、血管新生過程における Id1 発現強度は、血管を構成する血管内皮細胞全てに一律でない、モザイク状パターンを示した。培養細胞における検討から、Id1 発現のゆらぎが組織での発現パターンを一部説明する可能性があること、Id1 は Dll4-Notch シグナル経路を時空間的に制御している可能性があることが示唆された。さらに、Id1 がいかに経時的に血管形成に関わっているか細胞レベルで解析しうる血管新生評価・解析方法を確立した。

研究成果の概要(英文)：

The study aimed to investigate the role of helix-loop-helix (HLH) transcriptional factor Id1 in angiogenesis. Histological analysis showed that Id1 exhibited a mosaic pattern, mixed with strongly or weakly Id1-expressing ECs during ex vivo and in vivo angiogenesis. Analyses using cultured cells showed that Id1 regulated Dll4-Notch signaling pathway, and that Id1 expression appeared to oscillate periodically, suggesting a possible spatiotemporal regulation of the Notch signaling by Id1 in vascular endothelial cells. Furthermore, we have established a time-lapse imaging and computer-assisted analyzing system, which quantitatively characterizes the cell behavior in angiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：血管新生、転写因子、シグナルクロストーク、ライブイメージング、コンピューター解析

1. 研究開始当初の背景

近年、虚血性疾患に対し遺伝子導入や細胞移植を用いた血管再生治療が開始され、難治

性虚血病態に対する新しい治療法確立のための第一歩が踏み出された。しかし、現法での治療効果は決して臨床的に満足できるものとは言えない面もあり、さらなる方法論的改善が望まれた。そのためには、血管形成を支える分子機序をより詳細かつ統合的に理解する必要があった。

これまでの研究では、血管内皮増殖因子(VEGF)に代表される増殖因子やサイトカインとともに、転写因子の役割が注目され、中でもbHLH型転写因子の負の調節役と考えられてきたIdが、発生や腫瘍形成における血管新生過程に重要であることが、遺伝子改変マウス等の研究により明らかとなってきた。これまでIdの下流遺伝子として、組織浸潤に重要なマトリックスメトロプロテイナーゼ、細胞接着や足場形成に重要なインテグリンなどの重要性が示唆されてきた。我々も、成熟内皮細胞にId1を遺伝子導入することにより成熟内皮細胞が血管形成促進的な形質へ転換することを見出し、その新たな下流シグナル候補として、血管新生因子のひとつであるアンジオポイエチン1の関与を見出してきた。しかし、血管新生過程におけるIdの作用分子機序に関する詳細は未だ不明であった。

また、近年、新生血管内皮細胞におけるD114-Notchシグナルは、新生血管の先導役である先端細胞(tip cell)の制御を介し秩序だった血管網形成、つまり機能的な血管形成に重要であることが報告され脚光を浴びていた。我々もId1の新生血管内皮細胞における結合ターゲット分子や下流分子を検索する中、その候補の一つとしてNotch関連分子が示唆されてきた。しかしながら、IdとNotchシグナルとのクロストークにより血管新生を制御する機構に関してはこれまで明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究においては、IdとNotchシグナルとのクロストークという新しい観点から、血管新生を支える分子基盤の一端を明らかにすることで、血管生物学領域の基礎的な発展と、血管新生療法の新たな展開に繋げることを目指した。具体的には以下を明らかにすることを目標とした。

- (1) Notch下流分子を含め血管形成過程に重要なId1の新規下流分子を同定し、Id1による機能制御機構を分子レベルで明らかにする。
- (2) タイムラプスライブイメージングとコンピューター解析を用いた新しい血管新生評価系を構築し、血管新生におけるId1の下流分子・シグナルの機能的な重要性をこれまでにない角度から明らかに

する。

- (3) 上記(1)、(2)の解析によって得られた成果をもとに、血管形成のダイナミズムを説明する新たなモデルを提示する。

## 3. 研究の方法

### (1) 組織学的検討

① マウス新生仔網膜：出生後1、3日後の新生仔および成獣の眼球摘出後、固定。網膜を採取後、網膜新生血管内皮細胞におけるIdタンパク発現を蛍光免疫染色し、レーザー共焦点顕微鏡にて観察した。さらに、ImageJを用いて蛍光強度を数値化し、核染色の蛍光強度を対照としてId1の発現レベルの半定量化を図った。

② マウス胎仔脳：胎生期10~11日の胎仔を固定後、凍結切片を作製。神経管内に新生する血管におけるIdタンパク発現を蛍光免疫染色し、レーザー共焦点顕微鏡にて観察した。

### (2) 培養細胞による検討

① Id1の標的分子の検討：siRNAでId1をノックダウンしたヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)を、D114をコーティングした培養皿上で、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)と血清存在下で2日間培養刺激後、総RNAもしくは総タンパクを回収した。Notch下流分子等に関して定量的PCR法およびウエスタンブロット法にて対照と比較し検討した。

② Id1の経時的発現変化の検討：HUVECsをコンフルエント状態で培養し、血清ショック後12時間後まで、総RNAもしくは総タンパクを1時間毎に回収した。Id1の転写レベルおよびタンパクレベルの経時的発現変化を、定量的PCR法とウエスタンブロット法にてそれぞれ定量的・半定量的に検討した。さらに、血清ショック後、2時間毎に細胞をトリプシン処理にて回収し、ヨウ化プロピジウム(PI)染色を行いフローサイトメーターにて細胞周期解析を行った。

③ Id1の発現制御機構の検討：既知のId1プロモーターおよびエンハンサー下にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだリポータープラスミドを、10T1/2細胞にリポフェクションにて導入し、血清刺激24時間後のId1転写活性を、Id1過剰発現の有無により比較検討した。

### (3) 組織培養による検討

- ① ex vivo血管新生モデルにおけるId1発現の検討：マウス胸部大動脈を摘出後、

タイプ 1 コラーゲン内に包埋し、VEGF と血清存在下で 3 次元培養を行った (大動脈リングアッセイ)。培養 6-7 日目に組織固定後、蛍光免疫染色により血管内皮細胞における Id1 発現をレーザー共焦点顕微鏡にて検討した。

- ② ex vivo 血管新生モデルにおける動的評価系の確立: 大動脈リングアッセイ開始後 5-6 日目に、細胞膜透過性の色素にて核染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡を用いてタイムラプスライブイメージングを 36 時間行い、血管新生モデルにおける血管内皮細胞の動態を経時的に観察した。
- ③ ex vivo 血管新生における血管内皮細胞動態の定量的評価系の確立: 上述のタイムラプスイメージングによって得られた画像上で個々の細胞追尾を徒手的に行い、時間軸に関連づけた細胞の位置情報を抽出しそれに基づき、得られた細胞動態や伸長・分岐といった血管モジュールに対しパラメーターを設定し、血管新生過程の定量評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新生血管内皮細胞における Id1 発現

血管新生における Id1 の役割を検討するために、まず、新生血管過程における Id1 発現パターンを組織学的に検討した。

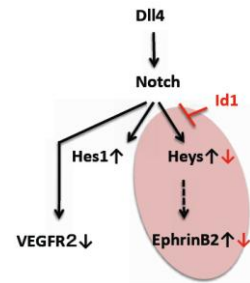
マウス網膜血管新生過程 (出生後 1 日、3 日目) にてその発現を検討した結果、Id1 は成熟した血管に比し、新生血管の内皮細胞においてより強く発現していることが分かった。さらに興味深いことに、Id1 発現程度は新生血管の内皮細胞全てに一律でなく、様々な Id1 発現レベルの血管内皮細胞が同一血管内に混在していることが分かった (モザイク状発現パターン)。生体内において、いわゆる血管新生過程にて同様に血管が形成される他の器官として脳内の血管網がある。したがって、マウス胎生期 10 日-11 日目の神経管内に侵入する新生血管内皮細胞においても同様な検討を行った。結果、Id1 の発現はマウス網膜血管新生過程同様のモザイク状発現パターンを呈した。

さらに、血管新生の ex vivo モデルにおいても Id1 発現パターンの検討を行ったが、同様に、Id1 は新生血管内皮細胞においてモザイク状に発現していた。

##### (2) Id1 の標的分子

Notch シグナルの主な下流分子として知られる Hey、Hes ファミリーは HLH 型転写因子であること、D114-Notch シグナルは血管新生過程において非常に重要であることから、

Id1 と D114-Notch シグナル経路とのクロストークの可能性に関して培養細胞を用いて検討した。その結果、HUVECs において Id1 を siRNA でノックダウンすると、D114-Notch 経路依存性および非依存性に Hey ファミリー遺伝子、特に Hey 2 の mRNA 発現が増強された。さらに、Notch 下流機能分子である EphrinB2 の発現においても、Id1 をノックダウンすることで、D114 刺激で誘導される mRNA、タンパク発現が Hey2 依存的に増強されることが分かった。



以上より、Id1 は血管内皮細胞において、D114-Notch-Hey2-EphrinB2 経路を抑制する (上図) ことで血管新生を制御する、新しい分子機構の可能性が示唆された。現在、in vivo 血管新生過程において実際に同経路が機能しているかを、組織学的に検討中である。

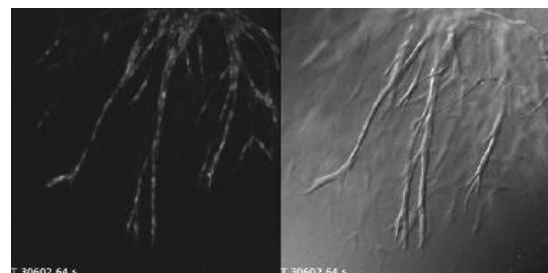
##### (3) 血管内皮細胞における Id1 発現調節

体節形成において、HLH 型転写因子 Hes の発現は一細胞内で周期的に振動し、その振動が体節の規則的な繰り返し構造をつくる原動力になっている。したがって、同じ HLH 型転写因子に属する Id1 においても、新生血管内皮細胞内でその発現が周期的に振動しており、個々の細胞内での発現振動が血管全体としてのモザイク状発現パターンを作っていると想定し、その実験的検討を行った。結果、血清ショック後に、Id1 の mRNA、タンパク発現が細胞周期とは連動せず、しかし規則的に振動している可能性が観察された。また、Id1 プロモーター解析から、分子の発現振動に必要な負の自己制御機構が存在することも示された。

これらの結果から、Id1 の発現振動が、新生血管全体における Id1 のモザイク状発現パターンを形成する一要因となっている可能性が示唆された。

##### (4) ex vivo 血管新生モデルにおける血管内皮細胞動態の可視化

Id1 の動的な発現変化や全体としての発現の不均一性がいかに血管新生に関わって



いるのかを細胞レベルで検討する目的で、ex vivo 血管新生モデルにおける血管内皮細胞動態の経時的可視化を試みた。マウス大動脈リングアッセイにおいて、細胞膜透過性の蛍光色素により核を染色することで、その染色強度により、血管内皮細胞をかなり選択的に追尾することが可能となった。この方法論により、従来の観察手法では捉えることのできなかった ex vivo 血管新生様過程の血管内皮細胞動態を経時的に可視化することが可能になった（前頁図）。

この解析により、血管の伸長や分岐形成を担う細胞現象として細胞遊走が非常に重要であること、そしてその遊走過程はこれまで想定されていた以上に極めて複雑であり、常に細胞の相対的位置関係を変化させることで細胞が位置的に混ざり合いながら（細胞の混ざり合い）、しかし全体としては巧妙に樹状様形態をかたち作っていく現象が捉えられてきた。さらに、ここで観察された血管内皮細胞の混ざり合い現象は、マウスの網膜血管新生においても同様に生じている可能性を強く示唆する結果が得られており、我々が構築した ex vivo 血管新生モデル解析を通じて、in vivo での血管新生事象を理解することができることを意味している。

(5) ex vivo 血管新生モデルにおける血管内皮細胞動態の定量化

イメージングデータを個々の細胞毎に追跡後、その位置情報を数値化し、血管新生過程での様々な細胞動態を定量的に評価できる in silico 解析系を構築した。

これまでに得られてきた知見から、Id1 が制御する血管新生モデルを以下の様に想定し、現在も引き続き検討を行っている。

血管新生過程において、Id1 は個々の血管内皮細胞内での発現レベルを周期的に変化させ、その発現変化により Notch シグナルと血管内皮細胞動態の時空間的制御を行うことで、血管新生過程を緻密に調節している。

現在、タイムラプスイメージングによる ex vivo 血管新生評価系を用いて、Id1 発現の動的变化が血管新生においてどのような機能的意義を持つのかについて、協調的細胞運動の観点から検討している。今回明らかにした血管新生過程での血管内皮細胞の集合運動現象は、これまで予想されてきた血管伸長時の血管内皮細胞の動きとはかなり異なっており、今後血管形成機構を解明して行く上で、新しい視点や切り口を与えると期待される。

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 7 件)

1. Kitazawa T, Sato T, Nishiyama K, Asai R, Arima Y, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H. Identification and developmental analysis of endothelin receptor type-A expressing cells in the mouse kidney. *Gene Expr Patterns*. 2011 (掲載確定 (印刷中)) 査読有
2. Tonami K, Kurihara Y, Arima S, Nishiyama K, Uchijima Y, Asano T, Sorimachi H, Kurihara H. Calpain-6, a microtubule-stabilizing protein, regulates Rac1 activity and cell motility through interaction with GEF-H1. *J Cell Sci*. 2011; 124:1214-1223. 査読有
3. Asai R, Kurihara Y, Fujisawa K, Sato T, Kawamura Y, Kokubo H, Tonami K, Nishiyama K, Uchijima Y, Miyagawa-Tomita S, Kurihara H. Endothelin receptor type A expression defines a distinct cardiac subdomain within the heart field and is later implicated in chamber myocardium formation. *Development* 2010;518(23):4702- 4722. 査読有
4. Tanaka A, Itoh F, Nishiyama K, Takezawa T, Kurihara H, Itoh S, Kato M. Inhibition of endothelial cell activation by bHLH protein E2-2 and its impairment of angiogenesis. *Blood* 2010;125(20):4138-4144. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

1. 西山功一. Collective endothelial cell movements driving angiogenic morphogenesis. 第 8 回心血管幹細胞研究会, 2011, 1, 15, 品川プリンスホテル, 東京
2. 西山功一. In-depth analysis of angiogenic morphogenesis through time-lapse imaging and quantification. BMB2010, 2010, 12, 10, 神戸ポートピアホテル, 神戸市

3. 西山功一.  
Novel insight into angiogenesis:  
In-depth analysis through time-lapse  
imaging and quantification.  
第18回日本血管生物医学会学術集会,  
2010, 12, 2, 梅田スカイビル, 大阪市
4. 西山功一.  
A newly identified phenomenon  
“Cell-mixing” during angiogenesis.  
第18回日本血管生物医学会学術集会,  
2010, 12, 1, 梅田スカイビル, 大阪市
5. 西山功一.  
A novel approach toward an  
understanding of angiogenesis using *in  
vitro* time-lapse live imaging.  
第18回日本血管生物医学会学術集会,  
2010, 12, 1, 梅田スカイビル, 大阪市
6. 西山功一.  
Id1 may regulate angiogenesis by  
dynamically controlling Notch  
signaling in vascular endothelial  
cells.  
The 14<sup>th</sup> annual scientific session of  
the society of cardiovascular  
endocrinology and metabolism, 2010, 3,  
31, 奈良県新公会堂, 奈良市
7. 西山功一.  
Id1 regulates angiogenesis by  
determining the specification and the  
timing of Notch signaling.  
American Heart Association,  
scientific session, 2009, 11, 11,  
convention center, Orland, USA
8. 西山功一.  
Id1 may control the specification and  
the timing of Notch signaling in  
vascular endothelial cells during  
angiogenesis.  
第82回日本生化学会大会, 2009, 10,  
21, 神戸国際会議場, 神戸市
9. 西山功一.  
Id1-mediated dynamic regulation of  
Notch signaling in vascular endothelial  
cells during angiogenesis.  
第17回日本血管生物医学会大会, 2009, 10,  
9, 東京大学安田講堂, 東京

10. 西山功一.  
*in vitro* ライブイメージングによる血管  
新生機構の解明  
第17回日本血管生物医学会大会, 2009, 10,  
8, 東京大学安田講堂, 東京

11. 西山功一.  
Blood vessel formation as a stage of  
coordinated morphogenesis - Analysis  
using *in vitro* real-time imaging  
日本数理生物学会第19回年会, 2009, 9, 11,  
東京大学駒場キャンパス数理学研究科, 東  
京

[図書] (計2件)

1. 西山功一、有馬聡、栗原裕基.  
*In vitro* ライブイメージングによる血  
管新生機構の解明.  
血管医学 2010;11(3):77-84.

[その他]

研究室ホームページ

<http://bio.m.u-tokyo.ac.jp/home-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西山 功一 (NISHIYAMA KOICHI)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 80398221

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし