

平成 26 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591099

研究課題名(和文) Id-Notchシグナル連関による時空間的血管新生制御機構の解明とその治療応用

研究課題名(英文) Angiogenic mechanism spatio-temporally controlled by Id-Notch signal crosstalk and their therapeutic application

研究代表者

西山 功一 (Nishiyama, Koichi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80398221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管が新生される際の細胞動態におけるHLH型転写因子IdとNotchシグナルのクロストークの重要性を検討した。培養モデルを用いた4次元動態解析から、VEGF誘導性に血管が新生される際にみられる個々の内皮細胞の運動スピードや方向性の変換の制御に、IdとNotchシグナルのクロストークが関連する可能性が示唆されてきた。しかし、その制御機序として細胞選別現象の関与は否定的であった。さらに、その制御機序を今後検討する際に有用となる、血管伸長時の細胞動態を表す数理モデルの基礎を構築した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to examine whether or not or how a signal crosstalk between HLH transcriptional factor Id and Notch contributes to the spatio-temporal control of endothelial cell behaviors during angiogenesis. A 4D analysis using an in vitro angiogenesis model suggested that the crosstalk possibly related to the dynamic regulation of moving speed and direction in individual endothelial cells. However, "cell sorting" phenomenon did not seem to explain the regulatory mechanism. Furthermore, we constructed a mathematical model for endothelial cell dynamics driving VEGF-induced vessel elongation, which enables us to further dissect the mechanisms systemically.

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：発生・分化 血管新生 ライブイメージング 転写因子 多細胞運動 モデル化

### 1. 研究開始当初の背景

血管新生は、個体発生時における血管網の構築のみならず、成体における生理的・病的な組織再構築の際にも観察される極めて重要な生命現象の一つである。近年、血管新生を標的とした治療が提案され一定程度の成果は納めている。しかしその成果は十分と云えず、更なる展開のためには血管新生現象をより深く理解していく必要がある。

これまで我々は、血管新生がいかに生じるかを検討する分子的切り口として、Helix-loop-helix (HLH) 型転写因子である Id に着目して検討を行ってきた。その中で、特に Id1 においては、内皮細胞の遊走能や増殖能を亢進させることで、血管新生促進的に働くことを見出してきた。しかし、Id1 が血管新生という連の多細胞現象の中でどのように作用しているのかという詳細は不明であった。最近、培養細胞を用いた検討により、Id は血管の形態形成や細胞運動に関与する Notch シグナルとクロストークすること、さらに新生血管では、Id の発現レベルは空間的に様々であることから、血管新生の過程において Id1 は、Notch シグナルを時空間的に制御することで樹状構造といった高次形態形成に関与していることが推測された。

さらに、最近我々は *in vitro* の血管新生モデルにおいて、血管のかたちを作る際の内皮細胞の 4 次元動態を捉えることが出来るようになってきた。この技術により、血管新生が成立するには、多細胞運動が重要であり、個々の細胞運動は非常に動的でかつ不均一であることが見えてきた。これらのことから、Id と Notch シグナルとのクロストークは、血管新生現象の中の個々の細胞運動を時空間的に制御しているメカニズムの一つである可能性が想定された。

### 2. 研究の目的

*in vitro* モデルにおけるライブイメージングと定量的解析を用いて、血管新生の際の内皮細胞動態特性を見出す。その特性における Id-Notch シグナルクロストークとその下流分子の時空間的な関わりを多細胞運動という観点から解析する。それにより、血管新生が制御されるメカニズムの一端をこれまでにない視点から明らかにすることで、血管新生を包括的に理解するための研究起点を作ることとする。それを通して、新しい血管新生療法の開発のための基盤を作る。

### 3. 研究の方法

(1) *in vitro* 血管新生モデルにおける内皮細胞動態解析： マウス胸部大動脈組織片をタイプ 1 コラーゲン内で VEGF 存在下に 3 次元培養する。培養後 4～6 日において、出芽的に成長し血管様形態を形成する内皮細胞動態を 4 次元イメージングにて捉える。コンピュータ上で細胞を徒手的に追尾後、得ら

れたデータを基に細胞動態の特徴付け、定量化を行う。また、同解析において分子生物学的もしくは薬理的な攪乱を行うことで細胞動態を制御する分子メカニズムを解析する。

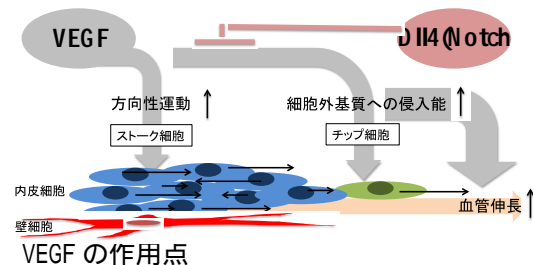
(2) 培養内皮細胞による細胞選別現象の検討： アデノウイルスベクターによる遺伝子過剰発現系や RNAi による遺伝子ノックダウン系を用いて、Id1 を過剰発現させたヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、Id1 をノックダウンした HUVEC およびそれぞれの対照となる HUVEC の 3 群を準備する。それぞれを、様々な組み合わせで 1 : 1 の細胞比でコンフルエントになるように培養皿に播種する。2 種の細胞はそれぞれ Q-dot でマーキングする。2 種の細胞の培養皿上における配置パターンの時間変化をタイムラプスイメージングで取得し、細胞選別現象の有無を定量的に解析する。

(3) 数理モデルの構築： *in vitro* 血管新生モデルにて得られてくる細胞動態情報を基に、そこに存在する規則性を抽出し、エージェント・ベース・モデルの枠組みを用いて数理モデルを構築する。数理モデルによるシミュレーションとそれに相当する実験結果を定量的に比較し、構築した数理モデルの妥当性を検証する。これらの比較の後、必要であればモデルの再構築や微調整を行い、実験結果と最も整合性のとれるモデルを得る。この過程を通して、血管新生を担う多細胞運動を制御するシステムを解析する。

### 4. 研究成果

(1) 出芽的血管新生により血管構造をつくる内皮細胞動態と分子の作用点の同定： 血管新生を担う多細胞運動を様々な指標で定量評価し、枝が伸びる際に必要な多細胞運動の特徴とそれを駆動させる分子の作用点を同定した (図 1)。

図 1: 血管新生を担う内皮細胞運動における分子の作用点



#### VEGF の作用点

最も重要な血管新生因子である VEGF は、血管構造が伸長する際に、枝の先端を構成する血管内皮細胞 (チップ細胞) およびその他の細胞 (ストーク細胞) 共に血管伸長方向への方向性運動と運動スピードを向上させ、さらにチップ細胞においては、細胞外基質内への侵入能も亢進させることで、結果、枝の伸長を実現していることが統計解析を併用することで分かった。

### Dll4/Notch シグナルの作用点

Dll4/Notch シグナルは、結果として細胞の分岐形成を調整し秩序だった合理的な血管網を構築するために重要であることが知られている。今回、その形態形成の元となる多細胞動態制御にける重要性を検討した。同シグナルを、Dll4 の中和抗体を用いて、また、セクレターゼインヒビターによる薬理的介入により機能阻害を行った。結果、Dll4/Notch シグナルは、内皮細胞の運動スピードを抑制し、ストーク細胞の枝の伸長方向とは反対方向への細胞運動を増加させ、また、チップ細胞のマトリックスへの侵入能を低下させる作用を介して、枝の伸長に対しては抑制的に働いていることが分かった。

このように分子-細胞-形態レベルと階層を超えて血管新生メカニズムを解析した例はなく、血管新生過程を包括的に理解するための重要な一歩となる。これらの結果から、VEGF の下流分子の一つであると考えられている Id と Notch シグナルのクロストークにより、血管内皮細胞の運動性（スピードと方向性）が多細胞集団として時空間的に巧妙に制御され、秩序ある血管の形がつけられている可能性が高まり、今後その仮説をさらに検討していく予定である。

(2) Id-Notch クロストークによる内皮細胞動態制御メカニズムとしての細胞選別現象の関与の否定： これまでの検討にて、Id1 と Notch シグナルのクロストークの結果として生じる機能下流分子の一つとして EphrinB2 を同定している (Id1 発現が高いと EphrinB2 発現は抑制される)。また、Id1 は内皮細胞の運動方向性の時空間的制御に関与している可能性があることから、その制御様式として細胞選別現象を想定しその可能性を培養細胞のタイムラプスイメージングによる動態解析とコンピュータ上の定量解析にて検討した。Id1 の過剰発現とノックダウンにて Id1 の発現レベルを恒常的に変化させても、内皮細胞の配置パターンの変化はみられなかった。このことから、Id1 と Notch シグナルのクロストークによる多細胞動態制御機構として、細胞選別現象は少なくとも主たるものではないことが分かった。

今後、他の方向からのメカニズム解析が必要となってきた。

(3) 多細胞動態に基づく血管伸長の数理モデルの構築： 多細胞動態を組織的に制御するメカニズムを解析するためには、数理生物学的手法は有効である。したがって、Id-Notch シグナルクロストークによる制御機構を異なる視点で解析するための基礎となる、血管新生過程の細胞動態を記述する数理モデルを構築した。実験で得た細胞動態の

特徴を基に、個々の内皮細胞の運動性（方向性とスピード）が確率的に変化するモデルをエージェント・ベース・モデルの枠組みを使って構築した (図2)。その結果、血管伸長の際の細胞動態の特徴（チップ細胞の追い越し現象、細胞の混ざり合い現象、細胞の移動パターンなど）と血管伸長の程度、さらに VEGF によるそれらの変化パターンをある一定程度再現することが出来た。このことから、血管新生の様式で血管のかたちをつくる際に見られた一見複雑な細胞動態は、個々の細胞運動性の確率的变化にてその大枠は説明できる可能性が出てきた。

今後、確率論では説明し難い要素を抽出し、Id1 と Notch シグナルのクロストークによる決定論的メカニズムの関与について研究を進展させていく予定である。血管生物学の分野において、このような分析枠組みで解析した例はほぼなく、世界に先駆けた成果である。

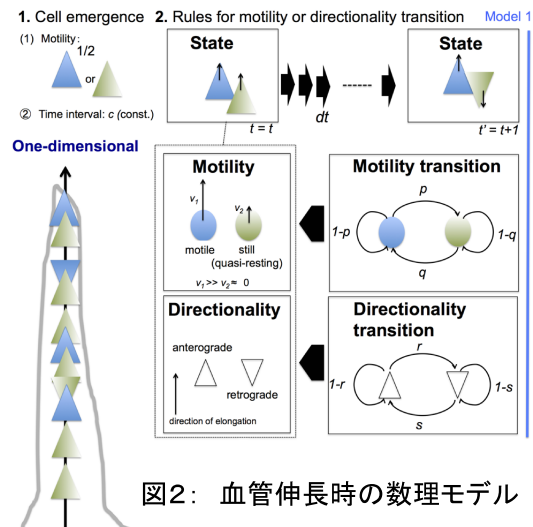


図2: 血管伸長時の数理モデル

### 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)

Kim KS, Arima Y, Kitazawa T, Nishiyama K, Asai R, Uchijima Y, Sato T, Levi G, Kitanaka S, Igarashi T, Kurihara Y, Kurihara H, Endothelin regulates neural crest deployment and fate to form great vessels through Dlx5/Dlx6-independent mechanisms, Mech Dev, 査読有, 130(11-12), 2013, pp1986-1993, DOI: 10.1016/j.mod.2013.07.005

Arima Y, Miyagawa-Tomita S, Maeda K, Asai R, Seya D, Minoux M, Rijli FM, Nishiyama K, Kim KS, Uchijima Y, Ogawa H, Kurihara Y, Kurihara H, Preotic neural crest cells contribute to coronary artery smooth muscle involving endothelin

signalling, Nat Commun, 査読有、  
3, 2012, pp1267, DOI:  
10.1038/ncomms2258

Arima S\*, Nishiyama K\*, Ko T,  
Arima Y, Hakozaiki Y, Sugihara K,  
Koseki H, Uchijima Y, Kurihara Y,  
Kurihara H, \*These authors  
contributed equally to this work,  
Angiogenic morphogenesis driven by  
dynamic and heterogeneous collective  
endothelial cell movement,  
Development, 査読有、138(21),  
2011, pp4763-76, DOI:  
10.1242/dev.068023

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 Exp Pattern, 査読有、11(7),  
2011, pp371-377, DOI:  
10.1016/j.gexp.2011.04.001

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, 査読有、124,  
2011, pp1214-1223, DOI:  
10.1242/jcs.072561

[学会発表](計 38件)

西山 功一、血管新生における血管内皮  
細胞運動の制御系としての壁細胞の役割、  
第 21 回日本血管生物医学会学術集会、  
2013、9、6、大阪

西山 功一、かたちをつくる血管細胞動  
態と数理モデル化、「非線形離散可積分系  
の新展開」RIMS 研究集会、2013、9、2、  
京都

Nishiyama K、Angiogenic  
morphogenesis: analyses of the  
self-organizing mechanisms of  
vascular cells using “imaging and  
modeling”、The 11<sup>th</sup> Japan-Korea Joint  
Symposium on Vascular Biology、2013、  
8、24、Jeju

Nishiyama K、Mural cells modulate  
collective endothelial cell movements  
to promote proper angiogenic  
morphogenesis、The Angiogenesis  
Gordon Research Conference、2013、8、

8、Newport

西山 功一、血管のかたちをつくる血  
管細胞動態の理解、第 42 回日本心脈管  
作動物質学会、2013、2、9、奈  
良

Sugihara K、A novel mathematical  
model of endothelial cell dynamics  
during angiogenic morphogenesis:  
analysis of cell-based mechanism、第  
35 回分子生物学会年会、2012、12、  
11、福岡

西山 功一、Imaging, quantification  
and modeling of self-organizing  
behaviors of vascular cells、第 20  
回日本血管生物医学会学術集会、2012、  
12、6、徳島

Nishiyama K、Cell-based mechanism  
behind angiogenic morphogenesis:  
analysis using both experimental and  
computational approaches、7<sup>th</sup> Kloster  
Seeon ‘Angiogenesis’: Molecular  
Mechanism and Functional Interactions、  
2012、9、15、Seeon

西山 功一、血管新生の形づくりを担  
う内皮細胞動態、第 22 回数理生物学会  
大会、2012、9、12、岡山

西山 功一、血管構造をつくる血管内  
皮細胞動態の可視化と理解、第 34 回日  
本血栓止血学会学術集会、2012、6、  
9、東京

Nishiyama K、Analysis of cell-based  
mechanism involved in angiogenic  
morphogenesis by biological and  
computational approaches、The 17<sup>th</sup>  
International Vascular Biology  
Meeting (IVBM) 2012、2012、6、2、  
Wiesbaden

Sugihara K、A novel mathematical model  
of angiogenic morphogenesis:  
importance of tip cell dynamics、第  
46 発生物学会大会、2012、5、30、  
神戸

西山 功一、Ex vivo 血管新生におけ  
る血管内皮細胞の集団的運動、第 117  
回日本解剖学会総会・全国学術集会、  
2012、3、26、甲府

Nishiyama K、Angiogenic  
morphogenesis driven by collective  
endothelial cell behavior、第 34 回  
分子生物学会年会、2011、12、13、

横浜

Nishiyama K、 Mechanism involving dynamic and heterogeneous endothelial cell movement during angiogenesis、第 19 回日本血管生物医学会学術集会、2011、 12、 9、 東京

Nishiyama K、 Id1 may spatiotemporally regulate endothelial cell movements driving angiogenesis、 AHA scientific session 2011、 2011、 11、 15、 Orland

Nishiyama K、 Morphogenetic cell movement in sprouting angiogenesis、日蘭二国間交流セミナー、 2011、 11、 4、 東京

Nishiyama K、 Dynamic and Heterogeneous collective endothelial cell movement driving angiogenic morphogenesis、 The Second Pacific Symposium on Vascular Biology、 2011、 10、 31、 Jeju

Nishiyama K、 Id1 modulates sprouting angiogenesis possibly via spatiotemporal regulation of the Notch signal specification、 第 84 回日本生化学大会、 2011、 9、 22、 京都

Nishiyama K、 Collective endothelial cell movement in angiogenic morphogenesis、 The 9<sup>th</sup> Japan-Korea Joint Symposium on vascular biology、 2011、 8、 25、 Pusan

〔図書〕(計 5 件)

西山功一、 日本血栓止血学会誌、 in vitro ライブイメージングと定量解析による血管新生機構の解明、 2013、 24(6)、 p553-559

西山功一、 朝倉書店、 血管生物医学事典 (NO、 NOS、 ) 2011、 pp95-97

西山功一、 朝倉書店、 血管生物医学事典 (Id) 2011、 pp375-377

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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

(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