

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11259

研究課題名(和文)血管伸長の統合的な制御機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of morphology regulation in vascular endothelial cells

研究代表者

田村 潔美(Tamura, Kiyomi)

北海道大学・歯学研究院・助教

研究者番号：90399973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：血管形成は、血管内皮細胞の増殖、分化、形態変化を経て機能的な血管となる。しかし、増殖、分化に比べて、血管内皮細胞の初期の形態変化(伸長、紐状構造)の調節機構についての知見は少ない。そこで、薬剤スクリーニングを用いて血管内皮細胞の伸張機能に関するシグナルを検討した。その結果、通常血管伸張が起こらない低濃度VEGF環境において、PI3K-Akt阻害剤、又はmTORC1阻害剤の投与により、血管伸張が誘導されることが明らかになった。さらに、その下流には、VEGF濃度の違いによってFoxo1依存的、又は非依存的な経路が存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、再生医療による組織の回復が期待されているが、組織の再生には、その内部に酸素や栄養を供給する血管ネットワークが必要不可欠である。血管内皮細胞増殖因子(VEGF)等の増殖因子を用いた血管誘導が試みられているが、増殖因子の機能は、増殖・分化から形態調節まで多岐にわたるため、未成熟血管の過形成などの多くの問題がある。本研究の血管伸張を特異的に制御するメカニズムの解明によって、血管の形態形成過程についての基礎的理解が得られた。また、低濃度VEGF環境において血管伸張を誘導する化合物の同定は、VEGFの過剰投与を必要としない血管誘導方法の開発に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：The earliest stage of formation of vascular structure requires proliferation, differentiation and morphological change in vascular endothelial cells. We focused on mechanisms of endothelial cell morphological change (cell elongation and formation of cord-like vessels). To examine signaling pathway regulating elongation of vascular endothelial cells, we performed a pharmacological screening method using vascular model of mouse ES cells. The inhibition of PI3K-Akt or mTORC1 caused elongation of vascular endothelial cells in the presence of a low concentration of VEGF, which usually does not induce endothelial cell elongation. In addition, our findings suggested that PI3K-Akt or mTORC1 differentially regulate endothelial cell elongation through transcription factor Foxo1-dependent or independent pathway, in response to the microenvironmental levels of VEGF.

研究分野：医歯薬学

キーワード：血管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、再生医療による組織の回復が期待されているが、組織の再生には、その内部に酸素や栄養を供給する血管網が必要不可欠である。そこで血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 等の増殖因子を用いた血管誘導が試みられている。しかし、増殖因子の機能は、増殖・分化から形態調節まで多岐にわたるため、未成熟血管の形成などの多くの問題がある。実験動物を用いた解析においては、高濃度 VEGF の局所作用による血管腫の発生が報告されている (Ozawa et al. J. Clin. Invest. vol. 113, p516-527.2004)。

(2) 血管形成は、血管内皮細胞の増殖・分化、細胞伸張・紐状構造形成、内腔形成という複雑さがあるが秩序立った過程で形成される (Herbert et al., Nat Rev Mol Cell Biol. Vol. 12, p551-564, 2011)。血管内皮細胞の増殖・分化に關与する MEF2C 等の複数の因子の調節には、FOX:ETS という共通の転写因子応答配列が、特異的な発現を規定することが報告されている (De val et al., Cell.vol. 135, p1053-1064, 2008)。一方、血管伸張の調節機構については不明な点が多い。

(3) 胚性幹細胞 (ES 細胞) は初期胚の未分化幹細胞である内部細胞塊から確立された細胞株であり、様々な種類の細胞に分化することができる。OP9 ストローマ細胞をフィーダー細胞として用いることで ES 細胞から中胚葉・血管前駆細胞が出現し、さらに血管前駆細胞から血管内皮細胞と血管平滑筋細胞が分化する。OP9 ストローマ細胞は低濃度の VEGF を産生放出しており、この低濃度 VEGF が血管内皮細胞の生存・分化・増殖に働き、血管内皮細胞は円型シート状のコロニーを形成する「2 次元血管モデル」。さらに、この血管内皮細胞を高濃度 VEGF (2 ng/ml 以上) で刺激すると、血管様の細胞伸張が誘導される。また、血管前駆細胞を凝集させ 1 型コラーゲンに包埋することで、血管内皮細胞による血管様構造の形成、さらに血管平滑筋細胞による被覆 (血管成熟) が観察できる「3 次元血管モデル」 (Kiyomi Tsuji-Tamura et al. ES Cell Differentiation as a Model to Study Cell Biological Regulation of Vascular Development, Embryonic Stem Cells: The Hormonal Regulation of Pluripotency and Embryogenesis, Book Chapter 30, p581-606, 2011, doi: 10.5772/14101)。

(4) フォークヘッド型転写因子 Foxo1 を欠損したマウスは、心血管系の形成異常により胎生致死となる。また Foxo1 を欠損した ES 細胞から分化した血管内皮細胞は高濃度 VEGF による伸張機能を消失し、異常なコロニー形態を示す。これらの結果から、Foxo1 は血管形成過程において、特に血管内皮細胞の形態変化に重要な因子であると考えられる。Foxo1 欠損 ES 細胞の血管モデルの解析によって、Foxo1 の欠損がアクチン・微小管細胞骨格の異常を引き起こすことが明らかとなっており (Park et al. Foxo1 is essential for in vitro vascular formation from embryonic stem cells, BBRC, vol. 18, p861-866, 2009, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.063.)、Foxo1 が細胞骨格の制御を介して血管内皮細胞の形態変化・伸張機能を調節する可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

研究開始当初の背景より、機能的な血管構造の構築には、高濃度 VEGF に依存しない新たな血管誘導方法の開発が必要であると考えた。また、その基礎的理解のために血管内皮細胞が増殖・分化から血管構造の形成プロセスに変化するメカニズムの解明が求められる。そこで、本研究では、ES 細胞による包括的な血管発生モデルを用いて薬剤スクリーニングを行うことで、血管内皮細胞の形態変化 (伸張機能) に特異的な調節機構の解明を試みた。以下により具体的な個別目的を示す。

(1) 効率的な薬剤スクリーニングのために、血管内皮細胞のライブイメージングが可能な ES 細胞を作製する。血管内皮細胞特異的に蛍光タンパク質 EGFP を発現し、また血管平滑筋細胞特異的に DsRed.T4 を発現するマウス ES 細胞を作製する (分化特異的レポーター発現 ES 細胞)。血管内皮細胞と血管平滑筋細胞は共通の血管前駆細胞から分化するため、2 つの細胞種を比較することで、薬剤に対する細胞種特異性を解析できる。

(2) (1) で構築した分化特異的レポーター発現 ES 細胞の分化能を確認する。血管内皮細胞と血管平滑筋細胞への分化が正常に起こり、分化特異的レポータータンパク質の発現が一致するかを確認するため、血管内皮細胞においては、EGFP と血管内皮細胞特異的マーカー、血管平滑筋細胞においては DsRed.T4 と血管平滑筋細胞特異的マーカーの発現を免疫染色によって確認する。

(3) 分化特異的レポーター発現 ES 細胞を用いて、化学療法基盤支援活動 (SCADS) の標準阻害剤キットの化合物について薬剤スクリーニングを行う。分化特異的レポーター発現 ES 細胞から分化した血管前駆細胞を 2 次元血管モデルに用い、各種阻害剤による血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の出現割合を解析する。さらに出現した血管内皮細胞のコロニーを円型 (非伸張型) と伸張型の 2 種に分類し、伸張型の割合が多い化合物を選定する (“伸張誘導化合物”)。

(4) (3)で得られた“伸張誘導化合物”の効果における VEGF への依存性を検討する。薬剤スクリーニングで用いた 2次元血管モデルでは OP9 細胞が産生する低濃度 VEGF が存在する。そこで、Flt-1 Fc (血管内皮細胞上に存在する VEGF 受容体の構造を持つキメラタンパク質)を用いて VEGF シグナルを阻害することで、“伸張誘導化合物”の効果における VEGF の必要性を同定する。

(5) フォークヘッド型転写因子である Foxo1 は血管形成に重要な因子であり、Foxo1 を欠損した ES 細胞から分化した血管内皮細胞は高濃度 VEGF による伸張機能を消失している。そこで、この細胞の伸張機能の障害に(3)で得られた化合物が影響するかどうかを解析し、伸張機能における Foxo1 の必要性を同定する。

(6) (3)で得られた“伸張誘導化合物”の標的因子を参考に、血管伸張におけるシグナル伝達機構を解析する。また、細胞骨格の調節に関わる因子との相互作用について解析する。

3. 研究の方法

組織再生には、新生組織と周辺組織との機能的な血管ネットワークの構築が必要不可欠である。VEGF は血管新生を強力に促進する成長因子であり、血管内皮細胞の生存・増殖・分化・伸張など血管形成の複数のプロセスに関与する。そのため、VEGF の血管新生促進作用は明らかではあるが、機能的な血管形成の効果を得るには課題がある。ES 細胞の血管分化モデルによって、低濃度 VEGF が血管内皮細胞の生存・増殖・分化に必須であることが分かっている。そこで、低濃度 VEGF 環境での薬剤スクリーニングにおいて血管伸張を誘導できる薬剤の同定を試みた。研究方法を以下に示す。

(1) 薬剤スクリーニングを効率的に解析するために、血管内皮細胞のライブイメージングが可能な ES 細胞を作製した。F10 エンハンサーによって血管内皮細胞特異的に蛍光タンパク質 EGFP を発現し、また SM22 プロモーターによって血管平滑筋細胞特異的に DsRed.T4 を発現するマウス ES 細胞を作製した(F10-EGFP/SM22-DsRed.T4 ES 細胞)。

(2) (1)で構築した F10-EGFP/SM22-DsRed.T4 ES 細胞の分化能を確認する。免疫染色によって、血管内皮細胞においては、EGFP と VE-cadherin(血管内皮細胞特異的マーカー)、血管平滑筋細胞においては DsRed.T4 と Desmin(血管平滑筋細胞特異的マーカー)の発現を検討し、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞への分化と、分化特異的レポータータンパク質の発現がそれぞれ一致するかを確認した。

(3) F10-EGFP/SM22-DsRed.T4 ES 細胞の 2次元血管モデルを用いて、薬剤スクリーニングを行う。薬剤ライブラリーとして、化学療法基盤支援活動(SCADS)の標準阻害剤キット(335種)を検討した。まず、F10-EGFP/SM22-DsRed.T4 ES 細胞を分化させ、セルソーターにより血管前駆細胞を回収した。血管前駆細胞をフィーダー細胞上に播種し、1日後に各種阻害剤を投与した。3日間後、レーザー型ラインスキャニング共焦点システム(IN Cell Analyzer)によって、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の出現割合を解析した。伸張誘導のポジティブコントロールとして VEGF を用い、出現した血管内皮細胞のコロニーを円型(非伸張型)と伸張型の2種に分類し、伸張型の割合が多い化合物を選定した(“伸張誘導化合物”)。

(4) (3)で得られた“伸張誘導化合物”の効果における VEGF の依存性を検討した。F10-EGFP/SM22-DsRed.T4 ES 細胞の 2次元血管モデルを用いて、“伸張誘導化合物”と同時に、Flt-1 Fc キメラタンパク質を投与し、VEGF シグナルが阻害された状態で、細胞伸張が誘導されるかを検討した。

(5) Foxo1 を欠損した ES 細胞から分化した血管内皮細胞は高濃度 VEGF による伸張機能を消失している。そこで、膜局在配列を持つファルネシル化 EGFP (EGFP-F)を発現する Foxo1 欠損 ES 細胞(EGFP-F/Foxo1^{-/-} ES 細胞)の 2次元血管モデルを用いて、コロニー形態における“伸張誘導化合物”の効果を検討した。

(6) F10-EGFP/SM22-DsRed.T4 ES 細胞、又は EGFP-F/Foxo1^{-/-} ES 細胞の 2次元血管モデル、3次元血管モデルを用いて、(3)で得られた“伸張誘導化合物”の標的因子を参考に、血管伸張におけるシグナル伝達機構、また、細胞骨格の調節に関わる因子との相互作用について解析した。

4. 研究成果

機能的な血管構造の構築には、高濃度 VEGF に依存しない新たな血管誘導方法の開発が必要で

ある。また、その基礎的理解のために血管内皮細胞が血管構造に形成を変化させるプロセスを調節するメカニズムの解明が求められる。そこで、本研究では、分化特異的レポーターによってライブイメージングが可能な ES 細胞を作製し、血管形成モデルを用いて薬剤スクリーニングを行い、低濃度 VEGF において血管内皮細胞の伸張機能を誘導できる 4 種類の薬剤、PI3K-Akt 阻害剤(LY294002, Akt inhibitor)、mTORC1 阻害剤 (rapamycin, everolimus) を同定した。これらの化合物は、低濃度 VEGF で細胞伸張を誘導する一方、高濃度 VEGF による血管構造の過形成を抑制する。

さらに、同定した薬剤の標的分子と転写因子 Foxo1 の相互作用の解析から、低濃度 VEGF 環境では、PI3K-Akt は Foxo1 を阻害することで血管伸張を抑制すること、また、mTORC1 は mTORC2 活性の阻害を介して、Foxo1 を制御し血管伸張を抑制することが明らかになった。一方、高濃度 VEGF 環境では mTORC1-mTORC2 シグナルによって直接制御される Foxo1 非依存的な経路が存在することが分かった。また、微小管分布における mTORC1 阻害剤と mTORC1/2 阻害剤の比較から、mTORC2 が微小管構造の制御にも関与する可能性が示された。本研究での、低濃度 VEGF 環境において血管伸張を誘導する化合物の同定と、血管伸張メカニズムの解明は、新たな血管誘導方法の開発に貢献できると考えている。本研究成果の詳細を以下に示す。

(1) F10-EGFP/SM22-DsRed.T4 ES 細胞を構築し、その分化能を確認した。免疫染色によって、VE-cadherin 陽性の血管内皮細胞における EGFP の発現、また、Desmin 陽性の血管平滑筋細胞における DsRed.T4 の発現を確認した。これらの結果から、共通の血管前駆細胞から分化した EGFP 陽性細胞と DsRed.T4 陽性細胞が、それぞれ血管内皮細胞と血管平滑筋細胞であると同定できる。

(2) (1)の F10-EGFP/SM22-DsRed.T4 ES 細胞の 2 次元血管モデルを用い、化学療法基盤支援活動(SCADS)の標準阻害剤キットの 335 種の化合物について、血管伸張における効果を解析した。その結果、PI3K-Akt 阻害剤(LY294002, Akt inhibitor)、mTORC1 阻害剤(rapamycin, everolimus) の 4 種の化合物が、低濃度 VEGF 環境において、血管内皮細胞の伸張機能を誘導することが明らかになった。これらの化合物はいずれも、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の出現割合には影響せず、また血管平滑筋細胞の形態には変化が見られなかった。そのため、同定された化合物の効果は血管内皮細胞に特異的であると考えられる。

(3) 伸張誘導効果における VEGF の依存性を検討した。Flt-1 Fc キメラタンパク質を投与して VEGF シグナルを阻害すると、LY294002、Akt inhibitor、rapamycin、everolimus を投与しても細胞伸張は誘導されなかった。よって、これらの化合物による血管伸張の誘導には低濃度の VEGF が必要であると考えられる。また、高濃度 VEGF の投与は、血管様構造の過形成を引き起こす。しかし、LY294002、Akt inhibitor、rapamycin、everolimus の投与は、血管様伸張形態を維持したまま、過形成を抑制した。

(4) Foxo1 欠損 ES 細胞 (EGFP-F/Foxo1^{-/-} ES 細胞) の 2 次元血管モデルを用いて、コロニー形態における LY294002、Akt inhibitor、rapamycin、everolimus の効果を検討した。その結果、低濃度 VEGF では、いずれの化合物でも伸張誘導は起こらなかった。一方、高濃度 VEGF では、rapamycin、everolimus において伸張機能の回復が見られた。よって、VEGF 濃度に応じて Foxo1 依存的、又は非依存的な異なる経路によって血管伸張が調節されることが示された。

(5) mTORC1 は mTORC2 の阻害に働くことが報告されている。そのため、mTORC1 阻害剤と、mTORC1/2 阻害剤である KU0063794 を比較し、伸張機能の調節における mTORC2 の関与を検討した。Foxo1^{+/+}と Foxo1^{-/-} 血管内皮細胞のいずれも、KU0063794 を投与した場合は、伸張機能は起こらなかった。この結果から、mTORC2 が血管内皮細胞の伸張機能の促進に働き、一方、mTORC1 は mTORC2 を阻害することで、伸張機能を抑制していると考えられる。

(6) Foxo1 また mTORC2 はアクチン細胞骨格の調節に関与することが示唆されている。そこで、Rho-ROCK シグナルの阻害剤である thiazovivin を用い、伸張機能におけるアクチン細胞骨格の役割を検討した。PI3K-Akt 阻害剤、mTORC1 阻害剤による伸張機能の誘導は、いずれも thiazovivin の投与により抑制された。3 次元培養系において、Foxo1^{+/+}血管内皮細胞は細胞辺縁における秩序立った繊維状のアクチン構造を示す。一方、Foxo1^{-/-} 細胞では、アクチンが異常な点状分布を示す。mTORC1 阻害剤によって Foxo1^{-/-} 細胞の伸張機能とアクチン分布の異常は回復するが、この効果は thiazovivin の投与によって阻害された。よって、Foxo1 依存的、非依存的経路のいずれも、Rho-ROCK シグナルによるアクチン細胞骨格の制御を介して、血管内皮細胞の伸張機能を調節していると考えられる。

(7) mTORC1 と mTORC2 の血管内皮細胞の細胞骨格における詳細を解析するために、血管内皮細胞株 bEnd3 細胞、UV2 細胞を用いた解析を行った。bEnd3 細胞は細長い伸張形態を持ち、アクチン・微小管は細胞の長軸方向にほぼ平行に分布している。everolimus の投与は、細胞形態、細胞骨格に影響しなかった。一方、KU0063794 の投与は細胞形態を類円型に変化させ、アクチン

の部分的集積と微小管の分布異常を引き起こした。bEnd3 細胞、UV2 細胞の 3 次元培養においても、everolimus の作用が見られない一方、KU0063794 は血管様伸張構造と細胞骨格の異常を誘導した。また、これらの異常は、微小管阻害剤(nocodazole, colchicine, paclitaxel)による形態変化と類似していた。mTORC1 阻害剤と mTORC1/2 阻害剤の比較、また微小管阻害剤作用との類似から、mTORC2 がアクチンだけでなく、微小管分布の制御も介して血管内皮細胞の伸張機能を調節している可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Kiyomi Tsuji-Tamura and Minetaro Ogawa, Morphology regulation in vascular endothelial cells. *Inflamm Regen*.vol. 38, p1-13, 2018 doi:10.1186/s41232-018-0083-8 (査読あり)

Tsuji-Tamura K, Ogawa M, Dual inhibition of mTORC1 and mTORC2 perturbs cytoskeletal organization and impairs endothelial cell elongation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 497, p326-331, 2018, doi:10.1016/j.bbrc.2018.02.080. (査読あり)

Tsuji-Tamura Kiyomi, Tamura Masato, Vascular formation : in vitro differentiation of vascular endothelial cells from pluripotent stem cells. *北海道歯学雑誌*, vol. 38(Special issue), p80-85, 2017 (査読なし)

田村-辻 潔美, 田村 正人, 胚性幹細胞を用いた血管形成メカニズムの解明, *北海道歯学雑誌* vol. 37, p173-176, 2017 (査読なし)

Ahmed T, Tsuji-Tamura K, Ogawa M, CXCR4 Signaling Negatively Modulates the Bipotential State of Hemogenic Endothelial Cells Derived from Embryonic Stem Cells by Attenuating the Endothelial Potential. *Stem Cells*. vol. 34, p2814-2824, 2016, doi:10.1002/stem.2441 (査読あり)

Kiyomi Tsuji-Tamura, Minetaro Ogawa, Inhibition of the PI3K-Akt and mTORC1 signaling pathways promotes the elongation of vascular endothelial cells. *J Cell Sci*. vol. 129, p1165-1178, 2016, doi:10.1242/jcs.178434 (査読あり)

〔学会発表〕(計 7 件)

田村-辻 潔美, 田村 正人, 小川峰太郎, 血管内皮細胞の細胞骨格と細胞伸張に対する mTORC1/mTORC2 阻害剤の抑制効果, 第 39 回日本炎症・再生医学会, 2018.7.11-12, 東京(京王プラザホテル)

田村-辻 潔美, 田村 正人, 血管内皮細胞における mTORC1/mTORC2 阻害剤の効果, 第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 2018.9.5-7, 福岡(九州大学医学部 百年講堂)

田村-辻 潔美, 田村 正人, 血管伸張は、VEGF 濃度に依存して異なる二つの経路で調節される, 第 54 回日本生化学会北海道支部例会 日本生化学会北海道支部・日本生物物理学会北海道支部合同シンポジウム, 2017.7.7, 札幌(北海道大学医学部学友会館フラテホール)

田村-辻 潔美, 田村 正人, 小川 峰太郎, 血管内皮細胞の伸張に伴う SM22 の発現 - 血管形成の指標としての可能性, 第 38 回日本炎症・再生医学会, 2017.7.18-19, 大阪(大阪国際会議場)

田村-辻 潔美, 田村 正人, 血管内皮細胞の伸張機能に着目した、血管形成の新たな指標の探索, 第 59 回歯科基礎医学会, 2017.9.16-18, 長野(塩尻, 松本歯科大学キャンパス)

田村-辻 潔美, 田村 正人, The induction of vascular endothelial cell elongation without an overdose of vascular endothelial growth factor (VEGF), 第 65 回国際歯科研究学会日本部会(JADR)学術大会(国際学会), 2017.7.8 札幌(北海道大学工学部 北海道大学工学部 フロンティア応用科学研究棟・鈴木章ホール)

田村-辻 潔美, 田村正人, PI3K - Akt と mTORC1 シグナルは血管内皮細胞の伸長機能を制御する, 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016.8.24-26 日, 札幌(札幌コンベンションセンター)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。