

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業  
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 血管新生におけるメカノトランスダクション機構の解明  
(英語) Elucidating the mechanisms of mechanotransduction in angiogenesis

研究開発担当者 (日本語) 日本医科大学 先端医学研究所 分子細胞構造学分野 教授 福原 茂朋  
所属 役職 氏名： (英語) Dept. of Mol. Pathophysiol., Inst. of Adv. Med. Sci.,  
Nippon Med. School • Professor • Shigetomo Fukuhara

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語)  
開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)  
所属 役職 氏名： (英語)

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### 研究開発項目1「細胞接着装置によるメカノトランスダクションが、血管新生における内皮細胞の極性形成と方向性を持った集団運動を制御するメカニズムの解明」

#### 光活性化型 tension modulator の開発

植物の青色光受容体を用いて光刺激依存的に細胞接着部位にかかる張力を増強 (TenG)・弛緩 (TenR) するための分子モジュールを設計した。各モジュールを、細胞間接着分子 vascular endothelial-cadherin の分子内に挿入し、光刺激依存的に細胞間接着部位にかかる張力を増強・弛緩する TenG-VEC・TenR-VEC を発現するプラスミドを作製した。同様に、各モジュールを、インテグリンとアクチン繊維を繋ぐ vinculin の分子内に挿入し、光刺激依存的に細胞-基質間接着にかかる張力を増強・弛緩する TenG-VIN・TenR-VIN を発現するプラスミドを作製した。HeLa 細胞に、これら分子を発現させたところ、TenG-VEC、TenR-VEC は細胞間接着部位に、TenG-VEC、TenR-VEC は焦点接着部位に局在した。さらに、青色光で TenG-VEC 発現細胞を刺激したところ、一部の TenG-VEC が細胞間接着部位に集積し、ジッパー状の局在を示したことから、光依存的に細胞間接着部位の張力が操作できている可能性が示唆された。

#### 血管新生過程の内皮細胞の動態と張力のイメージング解析

ゼブラフィッシュの中脳静脈形成過程の内皮細胞の形態、核の動態、極性、アクチン細胞骨格などをライブで観察し、血管新生における内皮細胞の一方向集団運動を制御する分子メカニズムを解析した。血管新生において、内皮細胞は前後軸極性を形成し、能動的に前方移動していることが示された。また、伸長する血管の先端に位置するリーダー細胞は、後方のフォロワー細胞との細胞間接着により前後軸極性を獲得し、前方移動することを見出した。さらに、リーダー細胞の後方に位置するフォロワー細胞についても解析を行い、フォロワー細胞は前方の内皮細胞との距離が長く、後方の細胞との距離が短いときに前方移動することを発見した。このことから、血管新生において、内皮細胞は前後の細胞との間に働く力学的相互作用によって、前後軸極性を獲得し、能動的に前方へと移動することが示唆された。

### 研究開発項目2「血管内皮細胞に作用するシェアストレスおよび圧力が、血管新生を制御するメカニズムの解明」

#### 血管新生における内皮細胞に作用する圧力の役割の検討

これまでに、皮膚創傷治癒に伴う血管新生において、切断血管が修復する際、血流に対して上流の血管は伸長せず、下流血管が選択的に伸長することを発見した。血流に対して上流血管では内腔圧が高いことが想定される。そこで、内腔圧が血管新生における血管伸長を抑制するのか検討するため、上流損傷血管の内腔圧を人為的に解除したところ、上流血管も下流血管と同程度まで伸長できるようになった。また、微小流体デバイスを用いて *in vitro* で血管新生を誘導し、伸長する血管に内腔圧を負荷すると血管伸長が抑制された。以上の結果から、内腔圧が血管新生における血管伸長を抑制することが明らかになった。さらに、内腔圧が血管新生における血管伸長を抑える機構について解析を行ったところ、内腔圧は伸長する血管の先端構造を球状化し、それにより内皮細胞に伸展張力を負荷すること、さらにこの内皮細胞に負荷された伸展張力が内皮細胞のアクトミオシン系を抑制することで、血管新生における血管の伸長を抑えている可能性が示唆された。これにより、内腔圧による血管新生の新たな制御機構を明らかにした。

**Research and development project I “Elucidation of mechanisms by which mechanotransduction pathways induced by cell adhesion apparatuses regulate front-rear polarity and directional collective migration of endothelial cells during angiogenesis.”**

Development of light-activated tension modulator

We designed molecular modules that increase (TenG) and decrease (TenR) tension applied to the cell adhesion apparatuses in response to light stimulation by utilizing blue light photoreceptors in plants. To modulate tension applied to cell-cell adhesions in a light-dependent manner, we constructed the plasmids encoding TenG-VEC and TenR-VEC in which TenG and TenR modules are inserted into vascular endothelial cadherin. We also generated the plasmids expressing TenG-VIN and TenR-VIN in which TenG and TenR modules are inserted into vinculin, which links integrin to actin cytoskeleton, to modulate tension applied to cell-substratum adhesions. When expressed in HeLa cells, TenG/TenR-VEC localized at cell-cell adhesions, while TenG/TenR-VIN were located to focal adhesions. Furthermore, TenG-VEC was accumulated at cell-cell junctions and exhibited zipper-like localization upon stimulation with blue light, suggesting that TenG-VEC might apply tension to cell-cell adhesions in a light-dependent manner.

Imaging analysis of endothelial cell dynamics and tension during angiogenesis

We investigated molecular mechanisms underlying directional collective migration of endothelial cells (ECs) in angiogenesis by performing fluorescent bio-imaging of EC behavior during mesencephalic vein formation in zebrafish. In angiogenesis, leader cells at the front of growing vessels established front-rear polarity by contacting with follower cells to move forward. On the other hand, follower cells frequently moved forward when the distance to cell in front was long and that to cell in rear was short. Migrating follower cells were found to have front-rear polarity. These results suggest that ECs move forward by establishing front-rear polarity through the mechanical interaction with the cells located at the front and rear during sprouting angiogenesis.

**Research and development project II “Elucidation of molecular mechanisms underlying the regulation of angiogenesis by mechanical stresses such as shear stress and blood pressure.”**

Role of intraluminal pressure acting on endothelial cells in angiogenesis.

By performing time-lapse imaging of angiogenesis in the wounded skin of adult zebrafish, we have shown that wound angiogenesis occurred through both elongation of injured blood vessels and sprouting from pre-existing ones. Intriguingly, the elongation was actively induced in the injured vessels located at the downstream side of blood flow, while the upstream vessels only slightly elongated. Since intraluminal pressure is assumed to be higher in the upstream vessels than in the downstream ones, we investigated the role of intraluminal pressure in angiogenesis and found that the injured vessels at the upstream side began to elongate when intraluminal pressure was diminished by cutting a more upstream site. By performing an in vitro angiogenesis assay using a microfluidic device, we also found that vessel elongation in angiogenesis was halted by increasing intraluminal pressure. These findings indicate that intraluminal pressure suppresses vessel elongation in angiogenesis. Furthermore, we investigated the underlying mechanism and found that intraluminal pressure induced expansion of injured blood vessels to stretch the ECs. Mechanical stretching of ECs resulted in suppression of actomyosin activity, thereby inhibiting elongation of blood vessels. In conclusion, we successfully reveal an unexpected role for intraluminal pressure in controlling angiogenesis.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 2件、国際誌 6件）

1. Chávez-Vargas L., Adame-García S.R., Cervantes-Villagrana R.D., Castillo-Kauil A., Bruystens J.G.H., Fukuhara S., Taylor S.S., Mochizuki N., Reyes-Cruz G., Vázquez-Prado J. Protein kinase A (PKA) Type I interacts with P-Rex1, a Rac guanine nucleotide exchange factor: Effect on PKA localization and P-Rex1 signaling. **Journal of Biological Chemistry** 291: 6182-6199 (2016).
2. Ando K., Fukuhara S. (Co-corresponding author), Izumi N., Nakajima H., Fukui H., Kelsh R.N., Mochizuki N. Clarification of mural cell coverage of vascular endothelial cells by live imaging of zebrafish. **Development** 143 : 1328-1339 (2016).
3. Chiba A., Watanabe-Takano H., Terai K., Fukui H., Miyazaki T., Uemura M., Hashimoto H., Hibi M., Fukuhara S., Mochizuki N. Osteocrin, a peptide secreted from the heart and other tissues, contributes to cranial osteogenesis and chondrogenesis in zebrafish. **Development** 144 : 334-344 (2017).
4. Nakajima H., Yamamoto K., Agarwala S., Terai K., Fukui H., Fukuhara S., Ando K., Miyazaki T., Yokota Y., Schmelzer E., Belting H.-G., Affolter M., Lecaudey V., Mochizuki N. Flow-dependent endothelial YAP regulation that contributes to vessel maintenance. **Developmental Cell** 40(6): 523-536 (2017).
5. Miura K., Nojiri T., Akitake Y., Ando K., Fukuhara S., Zenitani M., Kimura T., Hino J., Miyazato M., Hosoda H., Kangawa K. CCM2 and PAK4 act downstream of atrial natriuretic peptide signaling to promote cell spreading. **Biochemical Journal** 474: 1897-1918 (2017).
6. Rho S., Ando K., Fukuhara S. (Corresponding author). Dynamic regulation of vascular permeability by vascular endothelial cadherin-mediated endothelial cell-cell junctions. **Journal of Nippon Medical School** In press.
7. 福原茂朋. 血管透過性のダイナミックかつ巧妙な制御を可能にするシグナル伝達系, 「生化学」89-3号近畿支部企画『基礎と臨床をつなぐ血液・血管生物学』, 生化学会 In press.
8. 弓削進弥, 藤原正和, 福原茂朋. 血管新生のメカノバイオロジー, 医薬ジャーナル, 6月号特集「新しい医療を拓くメカノバイオロジー」, 医薬ジャーナル社 In Press

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 福原茂朋, 望月直樹, 演題名「血管新生におけるメカノトランスダクション機構の役割」第55回日本生体医工学会大会、オーガナイズドセッション「血管メカノバイオロジー研究の最前線」、口頭、富山、平成28年4月28日、国内
2. 福原茂朋, 望月直樹, 演題名「血管新生の蛍光イメージング」第37回日本炎症・再生医学会、シンポジウム9「炎症と血管・リンパ管新生」、口頭、京都、平成28年6月17日、国内
3. Shigetomo Fukuhara. “Live imaging of vascular development in zebrafish” New Era of Angiogenesis Research (Organized by Japan Vascular Biology and Medicine Organization). Oral, Osaka. July 7, 2016, Japan

4. 福原茂朋、演題名「蛍光イメージングによる血管の形成・維持・破綻の分子機構の解明」2016 谷根千形成懇話会、口頭、東京、平成 28 年 7 月 16 日、国内
5. 福原茂朋、演題名「血管形成と血管構造の安定化を司るシグナル伝達機構」第 3 回 Nephrology Expert Conference (NEXT)、口頭、東京、平成 28 年 7 月 20 日、国内
6. 福原茂朋、演題名「血管新生の蛍光生体イメージング」第 84 回日本医科大学医学会総会、口頭、東京、平成 28 年 9 月 3 日、国内
7. 福原茂朋、演題名「創傷治癒に伴う血管新生のライブイメージング」日本血管生物医学会秋期シンポジウム、口頭、東京、平成 28 年 9 月 10 日、国内
8. 福原茂朋、若山勇紀、望月直樹、演題名「血管新生における内皮細胞の一方向性移動を制御する分子機構」第 89 回日本生化学会大会、シンポジウム「膜動態を介した細胞間・細胞外環境との相互作用の制御」、口頭、仙台、平成 28 年 9 月 25 日、国内
9. 弓削進弥、國田樹、有馬勇一郎、横川隆司、三浦岳、望月直樹、西山功一、福原茂朋、演題名「創傷治癒に伴う血管新生のライブイメージングから明らかになった血管新生の新たな制御機構」生理学研究所研究会 2016 「心臓・血管系の包括的な機能統合研究」、口頭、福岡、平成 28 年 10 月 24 日、国内
10. 福原茂朋、演題名「血管新生の蛍光生体イメージング」東京大学代謝生理化学セミナー、口頭、東京、平成 28 年 10 月 27 日、国内
11. 福原茂朋、演題名「血管新生の蛍光イメージング」慶応大学総合医科学研究センターセミナー、口頭、東京、平成 28 年 11 月 17 日、国内
12. 福原茂朋、安藤康史、望月直樹、演題名「血管壁細胞の *in vivo* ライブイメージング」第 39 回日本分子生物、シンポジウム「ペリサイトを認識し研究することの重要性」、口頭、横浜、平成 28 年 11 月 30 日、国内
13. 福原茂朋、演題名「蛍光生体イメージングにより明らかになった血管新生の新たな制御機構」日本医科大学・東京理科大学 第 3 回合同シンポジウム、口頭、東京、平成 28 年 12 月 17 日、国内
14. 福原茂朋、演題名「血管新生と血管安定化を司るシグナル伝達機構」第 1 回 血管・創傷治療研究会、口頭、東京、平成 28 年 12 月 21 日、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 福原茂朋、演題名「生命の最小単位「細胞」の神秘 ～人体を形作る 60 兆個の細胞～」日本医科大学オープンキャンパス 2016 模擬講義、東京、平成 28 年 8 月 26 日、国内

(4) 特許出願

該当事項なし