

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15019

研究課題名(和文) Zicファミリーによる血管再生制御技術の開発

研究課題名(英文) Development of the blood vessel regeneration system utilizing Zic family proteins

研究代表者

有賀 純 (ARUGA, Jun)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：10232076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らが研究対象としてきたZnフィンガー型転写因子Zicファミリーは脳の血管構成細胞に発現している可能性があり、動脈硬化に関わるApoEの発現レベルを制御する。そこで、Zicファミリーが脳血管を構成する細胞でどのような役割を持つのか、動脈硬化、脳虚血時にZicファミリーがどのような発現変化を示すのかについて検討した。その結果、Zicファミリータンパク質がサブタイプ選択的に、ペリサイト、血管内皮細胞、血管構成細胞の前駆細胞に強く発現していること、ペリサイトの発生制御について重要な役割を持つことが明らかになった。これらはZicの生物活性を利用した血管再生制御技術の開発につながる知見である。

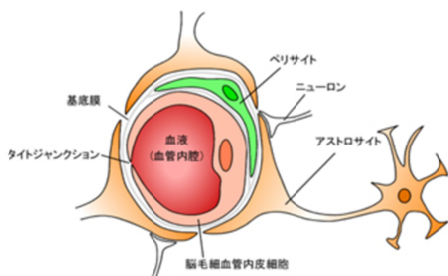
研究成果の概要(英文)：We and others recently reported that Zic family zinc finger transcription factors are expressed in brain vessel-constituting cells and regulate the gene expression of ApoE, an atherosclerosis protective protein. We therefore planned to clarify the role of Zic genes in neurovascular units and the expression change of the Zic family proteins among normal, atherosclerotic, and ischemic brain vessels. The results indicated that the Zic family proteins produced in the vascular pericytes, vascular endothelial cells and blood vessel progenitor cells in a cell-type specific manner. We also found that some Zic proteins have critical role of in the development of brain vessels. These findings paved a way to develop a regulatory system utilizing the biological activities of Zic family proteins.

研究分野：神経生物学、薬理学

キーワード：神経血管ユニット 遺伝子発現制御 転写因子 虚血性脳疾患 動脈硬化 遺伝子ターゲティング

1. 研究開始当初の背景

脳の毛細血管を構成する細胞には大きく分けて、血管内皮細胞と血管周皮細胞(ペリサイト)がある(下図)。



このうち、ペリサイトは神経堤に由来すると考えられており、異質な性質を持った細胞群を含むが、近年、間葉性幹細胞の性質を有していることが明らかになった。ペリサイトは全身の血管に存在しているが、特に脳では血管内皮細胞に対する数が多く血液脳関門の成り立ちに必要とされる。更に、虚血脳において脳損傷防衛的に働くこと、生理的な脳血流の調節に働くことが明らかになっている。

申請者らは最近、自ら見だし、研究対象としてきた Zn フィンガー型転写因子 Zic ファミリーが脳の血管構成細胞に選択的に発現していることを見いだした。一方、これまでに Zic1 および Zic2 が動脈硬化の原因遺伝子の 1 つである Apoe のプロモーターに結合して、その発現レベルを制御することを報告したが、Zic ファミリーの活性が動脈硬化の発症に対して予防的に働くかどうかは検討されていない。また、血液循環障害による脳虚血時に Zic ファミリーがどのような発現変化を示すのかも明らかにされていない。これら、正常および病態脳血管における Zic ファミリーの役割を知ることがその生物活性を利用した治療法の開発に必須である。

2. 研究の目的

本課題では血管前駆細胞、血管内皮細胞、血管周皮細胞に発現する幹細胞分化制御因子 Zic1, Zic2, Zic3 の生理的役割と病態生理的役割を Zic 条件変異動物と動脈硬化モデルマウスの解析により明らかにすることを目的とした。これらの知見を基にして血管内から Zic ファミリー転写因子の活性に影響を与えるツールを開発することを見据えた。これまでに Zic ファミリータンパク質の構造生物学的解析が進められており、DNA 結合能、転写活性化能にもっとも重要な部位がわかっている。また、先行研究により細胞膜の透過性を高めるいくつかの候補ペプチドが報告されている。これらの知見と申請者の研究室で稼動している *in vitro* 血液脳関門再構成系を利用して、Zic の生物活性を利用する方法

を探索する。

3. 研究の方法

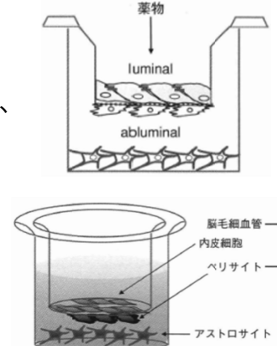
(1) 神経血管ユニットの発生過程における Zic ファミリーの発現様式。マウス脳および神経血管ユニットを構成する、血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイト、および発生過程の血管前駆細胞を含む髄膜前駆細胞で定量 PCR 法、*in situ* ハイブリダイゼーション法、免疫染色法により、Zic ファミリーの発現様式を明らかにする。

(2) 脳血管発生を標的とした Zic 条件変異マウスの解析。神経血管ユニットにおける Zic ファミリーの役割を明らかにするため、(Zic1flox/flox, Zic2flox/flox, Zic3null/Y) の個体を作成し、これと Wnt1-Cre 系統、もしくは Tie2-Cre 系統と交配することにより、前脳の背側間葉系細胞全体、または、血管内皮細胞に選択的に Zic1, Zic2, Zic3 の発現を欠く個体を作成して、その表現型を解析する。前者は早い発生段階からの広範囲にわたる欠損、後者はより血管内皮細胞に選択的な欠損となることが期待される。

(3) 動脈硬化モデルマウス (Apoe 欠損マウス) の導入と解析。マウスでは Apolipoprotein E (Apoe) の欠損が、動脈硬化および血液脳関門の破綻を引き起こし、ApoE4 はアルツハイマー病の危険因子とされている。一方、Zic1, Zic2 タンパク質は Apoe 遺伝子のプロモーターを活性化する。ジャクソン研究所より Apoe 欠損マウスを導入し、血管における Zic1, Zic2, Zic3 陽性細胞状態を検討した後、ZicX/Apoe 複合変異マウスを作製して、Zic ファミリーが実験動物で観察される動脈硬化に対してどのように働くかを検討する。

(4) *in vitro* 血液脳関門再構成系、ES 細胞分化系を利用した神経血管系における Zic の評価。

中川らは脳血液関門の中樞薬理における重要性に注目して、*in vitro* の脳血液関門再構成系(右図)を開発した。この再構成系は脳の毛細血管の細胞配置を模しており、ペトリ皿中に血管内腔側と血管外側ができ、血管内皮細胞の強固な細胞間結合に特徴付けられる脳血管関門の機能評価が可能である。この実験系を作成する過程で、中川らは生後のラット個体の脳より効率の良いペリサイトの単離、培養法を確立した。この系を血管透過性 Zic の性



能評価、Zic 欠損マウスないし Apoe 欠損マウスの血液脳関門の機能評価に利用する。

(5) 虚血脳の循環動態の系統的解析。
マウスを用いた中大脳動脈梗塞モデルを作製して、虚血脳における Zic の発現変化を検討する。また、正常な脳血流の制御に Zic ファミリータンパク質が果たす役割についても検討する。経時的光計測ではドロペリドール・フェンタニルを用いたニューロレプト麻酔下で、視覚、聴覚、触覚などの感覚刺激に対応した脳血流量の変化を可視光の吸収率の変化として捕らえることができる。この方法の利点は長期間、反復して計測を行える点にある。また時間分解能がより優れたレーザードップラー血流計による解析も併用する。解析系は研究室にセットされており、再現性よく脳血流の変化を検出できる。

4. 研究成果

(1) 神経血管ユニットにおける Zic ファミリー遺伝子の発現様式。
発生過程のマウス脳および髄膜前駆細胞では Zic1, Zic2 の発現が高く、Zic3 の発現は低いことをみいだした。またそれ以外の Zic4, Zic5 タンパク質の発現量は極めて少ない。このうち、Zic1 はマウス成熟個体のペリサイトに強く選択的に発現していた。一方、Zic3 は全身の血管のうち、脳の血管内皮細胞に選択的に発現しており、Zic2 はこれらの血管構成細胞の前駆細胞に強く発現していた。この結果は近年公開されたマイクロアレイデータの解析によっても裏付けられている。同様にサル由来の脳血管細胞における発現様式を検討したところ、発現プロファイルはげっ歯類のものと同く相関することがわかり、脳血管系における Zic ファミリーの発現は哺乳類の進化過程で保存されているものと考えられた。これらの結果は現時点で未発表であり、投稿準備中である。

(2) 脳血管発生を標的とした Zic 条件変異マウスの解析。

まず始めに部分致死性を示す Zic3 欠損マウスのうち、二ヶ月齢まで生存した個体を用いて脳血管に発現する転写因子遺伝子の定量 PCR を行った。その結果、Zic3 を欠損する脳血管画分において野生型に比して、Zic2 および Tbx1 の発現が上昇する傾向が認められた。

この結果を受けて、マウスまたはヒト Zic ファミリー遺伝子をマウスの血管内皮由来細胞株 bEnd3 またはサル ES 由来血管内皮様細胞に過剰発現させて影響を評価したところ、いずれの場合でも Zic2 および Zic3 の過剰発現により内在性 Zic1 の発現が上昇する傾向を示した。これらの結果は血管前駆細胞における Zic ファミリー遺伝子間の相互遺伝

子発現制御の可能性を示している。

一方、Zic1, Zic2 のヌル型変異ホモ接合体の表現型は重篤であり、出生後の解析は難しい。そこで、脳血管の発生における Zic ファミリーの役割を明らかにするために、Zic2 を血管前駆細胞から欠く条件変異マウス (Zic2 floxed/floxed, Wnt1-Cre) を解析したところ、Zic1 陽性ペリサイトの数が減少していることが明らかになった。同系統を用いて、Zic1 の条件変異、Zic1/Zic2 の複合条件変異の表現型を明らかにするために、交配を続けたが、致死性のために解析が困難であった。

血管内皮細胞における Zic ファミリーの役割を明らかにするために、血管内皮細胞に選択的に遺伝子発現が導かれる Tie2-Cre トランスジェニックマウスを導入し、flox 型 Zic 条件変異マウスと交配することにより、血管内皮特異的遺伝子不活化を行うことを計画した。現在、Zic1, Zic2, Zic3 を同時に血管内皮細胞で不活化した個体の作製が進行中であり、この個体の表現型を解析することで、血管内皮細胞における Zic ファミリー遺伝子の役割が明らかになるものと期待される。これらの結果は現時点で未発表であり、投稿準備中である。

(3) 動脈硬化モデルマウス (Apoe 欠損マウス) の導入と解析。

導入された Apoe 欠損マウスおよび同腹同性の対照マウスに高脂肪食を一定期間投与した後に血液検査を行い、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症が起きていることを確認した。現在、これらの個体由来の脳組織を用いて、免疫染色および定量 PCR により、Zic 遺伝子の発現の変化を検討している。

(4) invitro 血液脳関門再構成系、ES 細胞分化系を利用した神経血管系における Zic の評価。

ラット由来の初代培養細胞を用いた invitro 血液脳関門再構成系を用いて、虚血状態を模した低酸素・低グルコース処理を行ったのちに、Zic ファミリー遺伝子の発現変化を定量 PCR にて、解析した。その結果、特定の Zic 遺伝子の発現が低酸素・低グルコース処理により、変化する傾向が認められた。これらの結果は現時点で未発表であり、適切な補足データと共に誌上発表される。

(5) 虚血脳の循環動態の系統的解析。

イソフルラン吸入麻酔を施したマウスに頸動脈からシリコンコートした縫合糸を挿入して、一定時間、片側中大脳動脈を閉塞させた後に抜去する処理を行い、これを生体の脳虚血モデルとした。一定時間経過後、2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド染色を行って梗塞巣を同定した後、傍梗塞巣 (penumbra) を切り出した。対側の相同領域を対照とした。これらのサンプルを用いて、定量 PCR を行った結果、上述の初代培養血管

内皮細胞の低酸素・低グルコース処理の場合と同様な遺伝子発現の変化が観察された。

これらの結果から、虚血状態の脳血管において、Zic ファミリーの発現の変化が何らかの生理的な反応に関わる可能性がでてきた。今後、その詳細について、Zic 複合条件変異を用いた虚血実験により、明らかにしていきたい。

また、ニューロレプト麻酔下での脳血流の光計測は後頭葉第一次視覚野を対象に行い、様々な視覚刺激に対応した血流パターンの変化を観察することができた。この実験系を Zic 複合条件変異マウスに適用していきたいと考えている。

上に述べた成果以外に本研究計画では脳血管の転写因子を標的とした分子ツールを開発することを見据え、実際に特定の膜透過性ドメインと Zic タンパク質の機能ドメインを含む人工タンパク質についての予備実験が行われた。たが、現時点では評価に足るものが得られておらず、更なる試行錯誤が必要である。しかし、Zic の脳血管の発生における役割、病態生理学的な意義を解明することは、Zic を標的とする分子ツールの開発に当たって避けて通れない重要な課題であり、その意味で本課題の研究期間内の成果は着実な前進であったと考えている。

血管構成細胞の増殖分化制御を主な作用機序とした薬物は未だ実用化されていない。特にペリサイトの幹細胞としての性質が Zic タンパク質の多寡により、影響を受ける可能性が高い。脳ペリサイトは成体脳に広く存在する幹細胞として神経疾患の治療に大きく貢献する可能性を持ち、Zic の成体幹細胞における役割を明らかにする上で格好の対象である。

<引用文献>

- 有賀 純、畑山 実 Zic. 脳科学辞典 DOI 10.14931/bsd.6899
Inoue et al., J. Neurosci. 28, 4712-4725. (2008)
Salero, Aruga et al. JBC 276, 1881 (2001)
Hatayama et al., Hum. Mol. Genet., 14, 3459-3473, 2008.
Nakagawa, S. et al. Neurochem Int 54, 253-263 (2009).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

- Morimura, N., Yasuda, H., Yamaguchi K., Katayama, K., Hatayama, M., Tomioka, N.H., Odagawa, M., Kamiya, A., Iwayama, Y., Maekawa, M., Nakamura, K., Matsuzaki, H., Tsujii, M., Yamada, K., Yoshikawa, T., Aruga, J. Autism-like

behaviors and enhanced memory formation and synaptic plasticity in Lrfrn2/SALM1-deficient mice. *Nat. Commun.* 8:15800, 2017
DOI:10.108/ncomms15800 査読有
有賀 純, Dandy-Walker 症候群、*Clinical Neuroscience* 33, 397-401 (2015) 査読無

[学会発表](計 6 件)

- A. Watanabe, M. Hatayama, S. Nakagawa, J. Aruga. Control of neurovascular unit development by Zic family zinc finger proteins. 90th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. Nagasaki Brick Hall (Nagasaki-ken・Nagasaki-shi), Mar. 15-17 (2017)
S. Nakagawa, J. Aruga. Role of sphingosine 1-phosphate on blood-brain barrier dysfunction induced by oxygen glucose deprivation in vitro. 90th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. Nagasaki Brick Hall (Nagasaki-ken・Nagasaki-shi), Mar. 15-17 (2017)
R. Tatsumi, H. Maeda, S. Nakagawa, N. Horie, J. Aruga. Effectiveness of pluripotent stem cell-derived endothelial cell and pericyte transplantation in a rat model of cerebral ischemia 90th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. Nagasaki Brick Hall (Nagasaki-ken・Nagasaki-shi), Mar. 15-17 (2017)

中川慎介, 有賀純. スフィンゴシン 1-リン酸経路の抑制は虚血再灌流による血液脳関門機能障害を軽減する. 第 41 回日本脳卒中学会総会 ロイトン札幌 (北海道・札幌市), Apr.14-16 (2016)

R. Tatsumi, S. Nakagawa, J. Aruga. Efficient co-induction of endothelial - and pericyte-like cells from primate pluripotent stem cells. 89th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. Pacifico Yokohama, (Kanagawa-ken・Yokohama-shi), Mar. 9-11 (2016)

J. Aruga, M. Hatayama, S. Nakagawa, R. Tatsumi. Roles of Zic family zinc finger proteins in development and maintenance of the blood-brain-barrier. 45th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Chicago (USA), Oct. 17-21 (2015)

[その他](計 1 件)

有賀 純, 畑山 実 Zic 脳科学辞典 DOI

10.14931/bsd.6899

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有賀 純 (ARUGA, Jun)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・
教授

研究者番号 : 10232076

(2) 連携研究者

中川慎介 (NAKAGAWA, Shinsuke)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・
講師

研究者番号 : 10404211

巽 理恵 (TATSUMI, Rie)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・
助教

研究者番号 : 40484727

畑山 実 (HATAYAMA, Minoru)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・
助教

研究者番号 : 50443007