

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19404

研究課題名(和文)血管のメカノバイオロジー：血圧変動のライブイメージング

研究課題名(英文)Vascular mechanobiology: Live imaging of blood pressure fluctuation

研究代表者

人見 次郎(Hitomi, Jiro)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：00218728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管内皮にかかる圧変動を可視化することで、血流に起因する圧変動がどのように血管形態形成に寄与しているかを明らかにすることを目的とした。ゼブラフィッシュ(Danio rerio)を実験モデルとして、近年開発が進んでいるFRETを利用した圧センサープローブを血管特異的に発現する遺伝子組み換えゼブラフィッシュを作成し、ライトシート顕微鏡でライブ・イメージングを行い、圧変動を可視化した。その結果、正常胚、血流を停止した胚それぞれでFRET画像を取得することに成功したが、血流に起因する圧変動を可視化するには至らなかった。今後改良を加えて圧変動の可視化を引き続き目指していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、圧変動を可視化するFRETプローブを血管内皮特異的に発現する系統樹立に成功した。このシステムでは、Gal4-UASシステムを利用しており、Gal4の発現領域を変えることで血管系に限らず様々な組織の発生過程において圧プローブの発現が誘導可能であり、形態形成と圧負荷の関係解明に応用できる。現状では血圧の変動を可視化するには至っていないが、今後目標を達成することで血管形成メカニズムの解明に寄与する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we visualized blood pressure fluctuation to analyze how blood flow contributes to vascular morphogenesis zebrafish. At first, we created a new transgenic zebrafish in which a pressure sensor probe using FRET system was specifically expressed in endothelial cells, and then observed the living embryo with light-sheet microscope to visualize the blood pressure fluctuation. As a result, we succeeded in obtaining the FRET images of the pressure probe both in embryos with and without blood flow. However, the pressure fluctuation due to blood flow could not be visualized. We will continue to aim for visualization of pressure fluctuations by making some improvements.

研究分野：解剖学

キーワード：メカノバイオロジー 血管形成 ゼブラフィッシュ FRET ライトシート顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管系の発生過程は大まかに、脈管形成 (*vasculogenesis*) と血管新生 (*angiogenesis*) の二つのプロセスに分けて考えられているが (Risau et al, Nature, 1997)、初期の血管形態がどのようにして構築されるのかは長らく不明のままであった。我々はこの問題を解決するためのモデル生物として、全発生過程が顕微鏡下で観察可能なゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) に着目し、血管内皮が特異的に蛍光を発するトランスジェニック・ゼブラフィッシュと二光子顕微鏡によるタイムラプス・イメージング法を組み合わせることで、脳血管系の初期の形成過程の全容を解明することに成功した。初期の頭部血管形成は、血流がなくともほぼ正常に進行することから遺伝的に制御されていることが示唆されたが、血流がまったく血管系の形態形成に寄与しないわけではない。初期の形態形成に続くリモデリング過程において、血流は一定の役割を果たすことが示唆されている。しかしながら、血流が、どのように血管形態形成に寄与しているのかは、いまだ推測の域を出ない。この問題を解明するためには、*in vivo* で血管内皮細胞にかかる圧負荷を可視化し、実際の血管形態形成過程における圧変動の影響を解析する必要がある。2010 年以降、細胞にかかる圧負荷を可視化することが可能となった (Grashoff et al., Nature, 2010; Meng et al., JCS, 2010)。その際、細胞骨格に架橋する蛋白質内に、FRET 構造を挿入する手法が多くの場合で用いられてきた。当初これらの圧プローブの応用は *in vitro* の系で進められ、その後 *in vivo* の系でも原腸形成などの初期発生過程で導入されてきたが、研究開始当時、血管にかかる圧変動を *in vivo* で可視化したとの報告はなく、挑戦的萌芽研究としてスタートすることとなった。

2. 研究の目的

本研究では、血管内皮にかかる圧負荷を可視化することで、血流に起因する圧変動がどのように血管形態形成に寄与しているかを明らかにすることを目的とした。現在、血管系の発生過程は大まかに、脈管形成 (*vasculogenesis*) と血管新生 (*angiogenesis*) の二つのプロセスに分けて考えられており、100 年前に Thoma や Evans により提唱された、未分化な血管網の中から血流によって動・静脈が選択されるというネットワークモデルが、長らく初期の血管形態と動静脈分化を決するメカニズムとして信じられてきた。しかし、この説明は血管系の変異性の説明には適しているが、同時に血管系の示す規則性や恒常性を説明し得ないことから血管系を構築する遺伝的に制御された形態形成システムの存在が想定された。そして小型魚類ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用いた体幹部の節間動静脈分化において、血流に依存しない初期の血管形態形成過程が明らかとなった (Isogai et al., Dev, 2002)。では血流は、血管の形態形成にまったく寄与しないのか。磯貝らの報告では、血流はリモデリング過程で、一定の割合を果たすことが示唆されている。しかしながら、実際に、血管を構成している内皮細胞にどのような勾配で圧負荷がかかっているかを可視化することは長い間不可能であった。そこで本研究では、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を実験モデルとして、近年開発が進んでいる FRET を利用した圧センサープローブを血管特異的に発現させ、血管の形態形成への影響を、圧変動をイメージングすることで評価することを目的とした。特に、血管のリモデリング過程では、いったんつながって形成された血管系が解離 (disconnect) する現象への血流の関与を詳細に解析することを目的とした。すなわち、これまでの観察から得た血管系が二又に分岐している際、血流が優位に流れている血管が保持され、血流の乏しい血管は解離していくという仮説を、圧負荷を可視化することで検証することが最終的な目的である。

3. 研究の方法

血圧負荷を可視化するために、圧プローブ (ActTS-GR) を血管内皮で特異的に発現する遺伝子組み換えゼブラフィッシュを作成する。ActTS-GR は、東京大学 坪井博士、早稲田大学 北口博士によ

り開発された細胞膜にかかる圧負荷を可視化する FRET を利用した新しい蛍光プローブで、培養細胞や、アフリカツメガエルを用いた初期発生過程での張力の可視化に成功している(図 1 参照: Yamashita, et al., Sci Rep, 2016; Wang, et al., J Biomech Sci Eng, inpress, 2016)。ActTS-GR では、actin を架橋する actinin 分子の spectrin repeat 内に mCherry と EGFP の FRET 構造を挿入している。これが二量体を形成して actin filament 間に架橋することで、actin にかかる張力に応じて FRET 効率が変わる。本研究では、血管特異的に遺伝子を発現させる *flk1* 遺伝子の発現調節領域(プロモーター)の下流に、ActTS-GR の cDNA 配列をつなげて、血管内皮細胞での圧変動をリアルタイムで可視化できる組み換え体を作成する。組み換え体作成後、まず正常胚での圧負荷がイメージングできるかを検証する。心臓の収縮関連蛋白である *troponin T 2a(tnnt2a)* の発現を *Morpholino antisense oligo(MO)* を受精卵にインジェクションして発現を抑制した(心拍を生じない)胚や、心筋細胞内カルシウム動態を抑制する 2,3-Butanedione monoxime(BDM) を使用して一定時間心拍を経たのちに心拍を停止した胚などを併せて解析して、血管内皮での圧負荷の可視化を確認する。

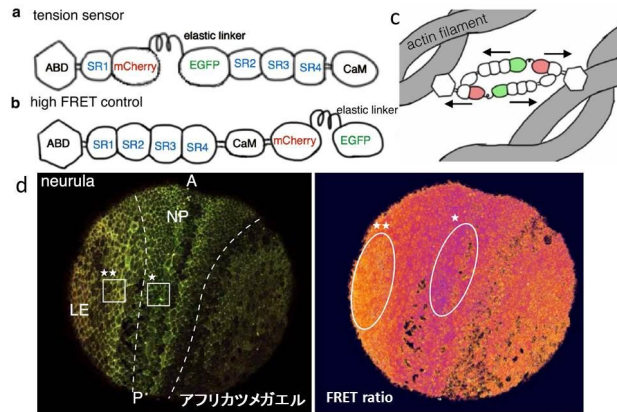


図1 ActTS-GRによるactinにかかる張力の可視化(Sci rep 6, 2016) A-B: ActTS-GRとhigh-FRET controlの構造。C: Actinにかかる張力の可視化メカニズム。D,E: 初期発生過程での細胞にかかる張力の可視化。

4. 研究成果

血圧負荷を可視化するために、圧プローブ(ActTS-GR)を血管内皮で特異的に発現する遺伝子組み換えゼブラフィッシュの作成をまず行った。DNA コンストラクトとして、血管系で特異的に発現を誘導する *flk1* 遺伝子のプロモーターを用いて ActTS-GR を直接発現させるもの (*flk1:ActTS-GR*) と、Gal4-UAS の系を用いたもの (*UAS:ActTS-GR*) の 2 種類を作成し、1 細胞期の受精卵へインジェクションを行った。その結果、直接 ActTS-GR を発現誘導する系では、founder が得られなかったが、Gal4-UAS 系を用いる系では、founder を得ることに成功した。そして既に作成してあった *flk1:GFF* (GFF:Gal4 の改変体) の系統と新たに作成した *UAS:ActTS-GR* の系統を交配してダブルトランスジェニック胚を作製することで、血管特異的に ActTS-GR を発現する系統を樹立に成功した。ライトシート顕微鏡を用いて受精後 2-3 日目胚の体軸血管(DA: dorsal aorta と PCV: posterior cardinal vein)を対象にまず観察を行った。正常胚での観察で得られた画像(励起波長 568nm で mCherry 画像取得、488nm で GFP 画像取得、488nm で mCherry 画像取得)を Image J の FRET 用プラグイン(FRET and Colocalization Analyzer)を用いて FRET 画像を作成した。その結果、FRET 画像自体の作成には成功したが、血管内皮での FRET 効率の差を血管内皮の領域に対応して明確に可視化するには至らなかった。得られた FRET 画像では、FRET プローブの発現が DA に優位に認められたが、FRET 効率がプ

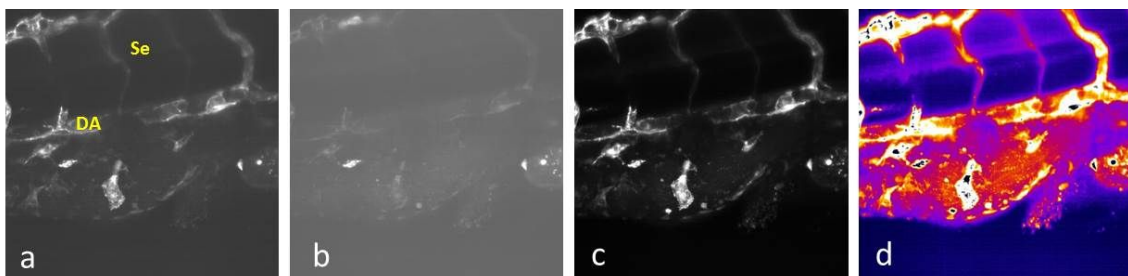


図2 正常胚での体軸血管のFRETイメージ像(DA: dorsal aorta;Se: segmental vessel) a) 488nm励起によるEGFP像、b) 488nm励起によるmCherry像、c) 568nm励起によるmCherry像、d) Image JによるFRET画像

プローブの発現量自体に比例した形で確認され、血管の部位で特異的な変化は認められなかった(図2参照)。

同時に BDM を使用して、血流を停止した胚(図3参照)でも同様の解析を行ったが、正常胚と比べて FRET 画像で圧負荷に対応した変化は認められなかった。すなわち、正常胚と同様に、FRET プローブの発現が DA に優位に認められたが、FRET 効率がプローブの発現量自体に比例した形で確認され、血管の部位で特異的な変化は認められず、血流の有無による明確な差も認められなかった(図4参照)。今回十分な結果が得られなかった原因としては、血管内皮での FRET プローブの発現量が十分ではないこと、または使用した ActTS-GR が血管内皮にかかる圧負荷の変化を可視化するに足りるだけの FRET 効率の変動を示さないことが、その原因として考えられた。そこで、FRET プローブのより発現量が強い系統を得るために、ActTS-GR を direct に血管内皮で drive できるコンストラクトの作成を改めて試みた。すなわち通常血管特異的に遺伝子を発現させるために使用する *flk1(kdr1)* のプロモーターは 7kbp あるが、これをエンハンサー領域だけを抽出して 5kbp まで短くして、より効率的にゲノム内にノックインできるコンストラクトを作成した。新たに作成した *kdr1_shortP:EGFP* を 1 細胞期の受精卵にインジェクションしたところ非常に高効率でトランジェントでの EGFP の発現が確認でき、また F0 世代のスクリーニングでも 20-30% と非常に高確率で founder が得られることが確認できた。このプロモーターを用いて ActTS-GR を発現させるコンストラクト (*kdr1_shortP;ActTS-GR*) を作成して、現在 F0 世代のスクリーニングを進めている。今後系統が樹立され次第ゼブラフィッシュ血管内皮での圧変動の可視化を引き続き目指していく。またプローブ自体も問題に関しては、VE カドヘリンを用いた FRET プローブも近年報告されており、新たなプローブの導入も検討していく。

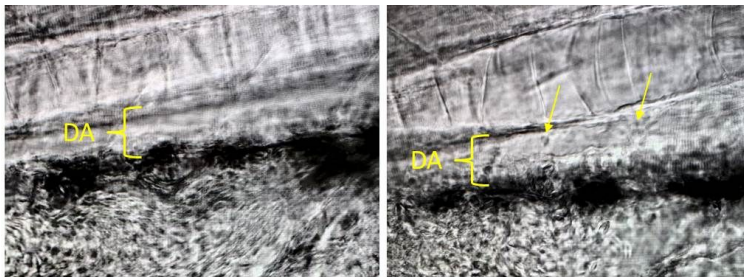


図3 BDMによる血流の停止
a) Control b) BDM処理(矢印:DAの血球が静止して確認できる)

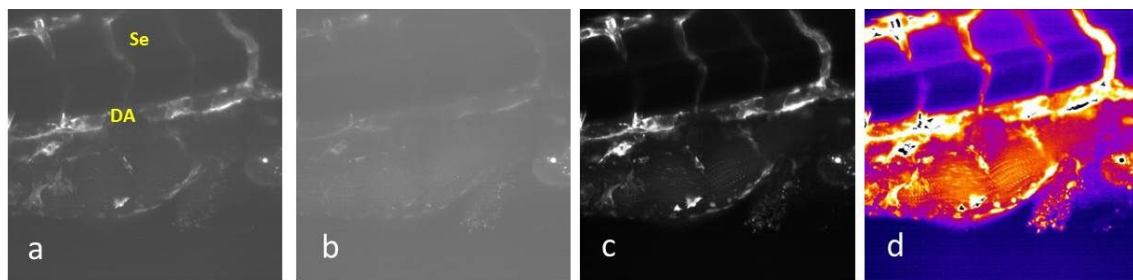


図4 BDMにより血流を停止した胚での体軸血管のFRETイメージ像(DA: dorsal aorta; Se: segmental vessel)
a) 488nm励起によるEGFP像、b) 488nm励起によるmCherry像、c) 568nm励起によるmCherry像、d) ImageJによるFRET画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hachiya Tsuyoshi, Narita Akira, Ohmomo Hideki, Sutoh Yoichi, Komaki Shohei, Tanno Kozo, Satoh Mamoru, Sakata Kiyomi, Hitomi Jiro, Nakamura Motoyuki, Ogasawara Kuniaki, Yamamoto Masayuki, Sasaki Makoto, Hozawa Atsushi, Shimizu Atsushi	4. 巻 8
2. 論文標題 Genome-wide analysis of polymorphism××sodium interaction effect on blood pressure identifies a novel 3'-BCL11B gene desert locus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-32074-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hashiura Tetsuya, Kimura Eiji, Fujisawa Shizuko, Oikawa Sayuri, Nonaka Shigenori, Kurosaka Daijiro, Hitomi Jiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Live imaging of primary ocular vasculature formation in zebrafish	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0176456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0176456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金澤潤、燕軍、木村英二、人見次郎
2. 発表標題 脊髄の前髄節動脈の島の形状と分布
3. 学会等名 日本解剖学会第64回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	木村 英二 (Kimura Eiji) (50405750)	岩手医科大学・医学部・准教授 (31201)	