

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07280

研究課題名(和文) 発生における脈管間相互作用の役割の解明

研究課題名(英文) Role of vascular interaction in embryonic development

研究代表者

浦崎 明宏 (Urasaki, Akihiro)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：40550083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：動脈・静脈・リンパ管などの脈管は解剖学的に異なるネットワークを形成するが、異なる脈管同士が接触して接続(吻合)・並走することが、脊椎動物の発生にどのような重要性を持っているのかについては不明な点が多い。本研究では、脈管ネットワーク形成における異なる脈管と脈管の相互作用の果たす役割およびその機構を明らかにすることを目的とした。本研究では、胚が透明なゼブラフィッシュを用い、発生初期の血管形成過程を細胞レベルで解析した。ALK1シグナル主要受容体遺伝子の変異体は胎生致死を示し、脳において動脈と静脈が毛細血管を介さずに直接繋がる血管異常を、その他臓器で新たなタイプの血管異常を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、胚が透明で体外で発生するゼブラフィッシュを用いることにより、ヒトやマウスでは困難な初期の血管形成過程を細胞レベルで解析した。これまで観察が困難であった脳深部や様々な臓器の血管を可視化して、異なる脈管同士の接触という新たな視点から、脈管形成機構の解明を目指したところに学術的独自性がある。また、ALK1シグナル欠損で異なる脈管同士の接続に異常が生じることを見出したが、ALK1シグナル伝達系の低下は遺伝性出血性末梢血管拡張症(オスラー病)の原因とされている。本研究による脈管間相互作用の解析は発生学・遺伝学への学術的な影響を与えるだけでなく、血管疾患の病態の理解に繋がる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Vessels such as arteries, veins, and lymphatic vessels form anatomically distinct networks. The importance of contact, connection (anastomosis), and juxtaposition between different vessels in vertebrate development is still unclear. In this study, we investigated the role of interactions between different blood vessels during vascular formation. Using transparent zebrafish embryos, we analyzed the process of organ-specific vascular formation during embryogenesis. We found that defects in ALK1 signaling lead to cerebral arteriovenous malformations, in which arteries and veins connect directly without capillaries, and to a new type of vascular abnormality in another organ.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：血管 発生 ゼブラフィッシュ 遺伝性出血性末梢血管拡張症

1. 研究開始当初の背景

ゼブラフィッシュは、胚が透明で、母体外で発生するため、発生学的な観察に優れている。1990年代以降、世界中の研究者に用いられてきたが、遺伝学的解析のための方法の開発は十分でなかった。特に、トランスジェニック系統作製は非常に効率が悪いものがあつた。この状況を大きく変えるために、研究代表者らはゼブラフィッシュにおけるトランスポゾン（動く遺伝子）を用いた方法の開発を行なった。そして、遺伝子トラップ法、エンハンサートラップ法、Gal4/UAS システムなどの開発を行い、さまざまな細胞・組織・器官を可視化することが可能になった。

研究代表者は静脈・リンパ管特異的に蛍光タンパク質を発現する系統を作製し、初期リンパ管形成過程を初めて捉えることに成功した。ゼブラフィッシュの体幹においては、動脈からの出芽により最初に動脈系内皮細胞のネットワークができ、静脈からの出芽が起こる。そして、静脈から出芽した内皮細胞の約半数が動脈と接触（動脈-静脈相互作用）して接続し、動脈を乗っ取って血流のある静脈に変えていた。また、残りの半数の内皮細胞はリンパ管内皮前駆細胞として静脈から分離し、動脈と接触（動脈-リンパ管相互作用）しながらリンパ管ネットワークを形成していた。その後、観察のしやすい体幹の血管については研究が進んだが、可視化が難しい脳深部やその他の臓器の血管の形成過程については未だに不明な点が多い。

研究代表者らによる異なる脈管同士の相互作用に関する観察結果は、これまで動脈・静脈・リンパ管が独自にネットワークを形成すると考えられていた概念を覆し、動脈・静脈・リンパ管のダイナミックな物理的相互作用が発生過程における脈管ネットワーク形成において大きな役割を果たしている可能性を示唆していた。動脈・静脈・リンパ管は解剖学的に独自のネットワークを別々に形成するが、異なる脈管同士が接触して接続（吻合）・並走することが、脊椎動物の発生にどのような重要性を持っているのかについては明らかになっていない。

2. 研究の目的

申請者自身により見出された現象を基盤として、異なる脈管同士の接触という新たな視点から、脈管形成機構の解明を目指し、本研究を提案するにいたつた。本研究では、(1)これまで観察が難しかった部位の血管を可視化する方法を確立すること、(2)生体ライブイメージングにより血管形成過程を細胞レベルで明らかにすること、(3)異なる脈管と脈管の相互作用に関わるシグナル伝達系を明らかにすることを目的とした。本研究では、動脈・静脈・リンパ管ネットワーク形成における、異なる脈管と脈管の相互作用の果たす役割およびその分子機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 新規トランスジェニック系統を用いた発生期における血管の可視化

発生期の血管形成を細胞レベルで調べるために、既存の血管可視化系統である *fli1*:GFP 系統、*kdrl*:mCherry 系統を用いて、発生期における血管の観察を行なった。次に、これまで観察が困難であった部位の血管を観察するために、独自に樹立した遺伝子トラップ系統の中で血管特異的発現が観察される 478A 系統、332A 系統、312A 系統を用いて、発生期における血管の観察を行なった。

(2) 生体ライブイメージングによる発生期血管形成過程の解析

血管と血球を同時に可視化できるようにするため、血管可視化系統 478A 系統と血管可視化系統 *gata1*:DsRed を交配し、血管と血球を同時に可視化できる系統を樹立した。初期発生における血管形成の過程を明らかにするために、血管可視化系統を用いて、脳血管形成期（受精後 36 時間から 60 時間）と消化管-肝臓-門脈系形成期（受精後 36 時間から 84 時間）の生体ライブイメージングを行なった。

(3) 異なる脈管と脈管の相互作用に関与するシグナル伝達系の解析

各種シグナル伝達系の初期血管形成における役割を明らかにするために、血管形成期に各種シグナル伝達系阻害剤で処理し、血管に異常が生じるか否かを調べた。さらに、ALK1 シグナルの脈管相互作用における役割を明らかにするために、ALK1 シグナルの主要受容体の変異体を作製した。変異体と血管可視化系統と交配し、共焦点顕微鏡により血管形成の表現型解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 新規トランスジェニック系統を用いた発生期における血管の可視化

発生期の血管形成を調べるために、既存の血管可視化系統である *fli1*:GFP 系統と *kdrl*:mCherry 系統を用いて、受精後 36 時間から 84 時間における血管の観察を行なった。既存系統 *fli1*:GFP 系統は、全ての動脈・静脈・リンパ管で発現していたが、内皮細胞以外の組織でも蛍光が観察され、発生初期の脳や肝臓周辺の血管の観察には向かないことが判明した。既存系統 *kdrl*:mCherry 系統は、体幹や脳の動脈・静脈などの内皮細胞で蛍光が観察されたが、発生初期の消化管・肝臓などの臓器では蛍光がほとんど観察されなかった。これらの結果から、既存の

血管可視化系統で観察が困難な部位が存在することが明らかになった。

次に、これまで観察が困難であった部位の血管をより明瞭に観察できる系統があるか否かを調べるために、独自に樹立した血管可視化系統 478A 系統、332A 系統、312A 系統、DLL4:GFP 系統を用いて発生期血管の観察を行なった。332A 系統は、体幹の静脈でほとんど蛍光が観察されなかったが、消化管・肝臓などの血管は明瞭に観察できた。312A 系統は、発生初期の動脈で蛍光はほとんど観察されなかったが、全身の静脈で蛍光が観察できた。DLL4:GFP 系統は、発生初期の動脈の血管で GFP 蛍光が観察できた。これらの実験により、これまで観察が難しかった部位の血管を可視化できるトランスジェニック系統を複数見出すことが出来た。

(2) 生体ライブイメージングによる発生期血管形成過程の解析

血管と血球を同時に可視化できるようにするため、血管可視化系統 478A 系統と血管可視化系統 gata1:DsRed を交配し、血管と血球を同時に可視化できる系統を樹立した。これにより、様々な組織・臓器において血管と血球を同時に観察することが可能になった。次に、初期発生における血管形成の過程を明らかにするために、血管可視化系統 478A を用いて、脳血管形成期と消化管-肝臓-門脈系形成期の生体ライブイメージングを行なった。脳深部の血管形成において、動脈 (BA: basilar artery) と静脈 (PHBC: primordial hindbrain channel) が接続して血流が生じる。その後、動脈の分岐が増えていくにしたがって、最初に出来た BA-PHBC の接続が細くなっていくことが観察できた。消化管-肝臓-門脈系の血管形成において、発生初期の消化管や肝臓周辺の血管形成過程を共焦点顕微鏡で観察した。消化管-肝臓-門脈系の内皮細胞は静脈から遊離し、再配置され、既存血管と接続し、血管ネットワークを形成することが観察できた。新たな血管可視化系統と生体ライブイメージングによりこれまで観察が難しかった脳深部や臓器特異的な血管形成の過程を細胞レベルで明らかにすることが出来た。

(3) 異なる脈管と脈管の相互作用に関与するシグナル伝達系の解析

各種シグナル伝達系の初期血管形成における役割を明らかにするために、受精後 36-60 時間の胚を各種シグナル伝達系阻害剤で処理し、血管異常が生じるか否かを調べた。VEGF シグナル阻害剤 (SU5414) や Wnt シグナル活性化剤 (BIO) で処理したときに、脳出血が生じることが明らかになった。ALK1/ALK2 シグナル阻害剤 (K02288) で処理したときに、一部の血管で接続異常が生じた。

ALK1 シグナルの脈管相互作用における役割を明らかにするために、ALK1 シグナルの主要受容体の変異体を作製した。変異体と血管可視化系統と交配し、共焦点顕微鏡により血管形成の表現型解析を行なった。変異体は胎生致死を示し、脳において動脈と静脈が毛細血管を介さずに直接繋がる血管異常である動静脈奇形を、本研究で観察可能となったその他の臓器の血管で新たなタイプの血管異常を示した。本研究により、ALK1 シグナル伝達系は発生期の様々な臓器において異なる脈管と脈管の相互作用に重要な役割を果たしていることが示唆された。ALK1 シグナル伝達系の低下は動静脈奇形・末梢血管拡張・出血を特徴とする遺伝性出血性末梢血管拡張症 (オスラー病) の原因とされている。本研究による発生期血管における脈管間相互作用の解析は、発生学・遺伝学への学術的な影響を与えるだけでなく、血管疾患の病態の理解に繋がる可能性が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kinugasa Katayama Yumi, Watanabe Yusuke, Hisamitsu Takashi, Arima Yuichiro, Liu Norika M., Tomimatsu Ayaka, Harada Yukihiro, Arai Yuji, Urasaki Akihiro, Kawamura Teruhisa, Saito Yoshihiko, Nakagawa Osamu	4. 巻 59
2. 論文標題 Tmem100 BAC EGFP mice to selectively mark and purify embryonic endothelial cells of large caliber arteries in mid gestational vascular formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 genesis	6. 最初と最後の頁 e23416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvg.23416	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 Harada Yukihiro, Tanaka Toru, Arai Yuji, Isomoto Yoshie, Nakano Atsushi, Nakao Shu, Urasaki Akihiro, Watanabe Yusuke, Kawamura Teruhisa, Nakagawa Osamu	4. 巻 26
2. 論文標題 ETS dependent enhancers for endothelial specific expression of serum/glucocorticoid regulated kinase 1 during mouse embryo development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 611 ~ 626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12874	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 Urasaki Akihiro, Morishita Seiya, Naka Kosuke, Uozumi Minato, Abe Kouki, Huang Ligu, Watase Emiko, Nakagawa Osamu, Kawakami Koichi, Matsui Takaaki, Bessho Yasumasa, Inagaki Naoyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Shootins mediate collective cell migration and organogenesis of the zebrafish posterior lateral line system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48585-4	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 Huang Ligu, Urasaki Akihiro, Inagaki Naoyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Rab33a and Rab33ba mediate the outgrowth of forebrain commissural axons in the zebrafish brain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-38468-5	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9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akihiro Urasaki, Nami Akaho Nagata, Yuki Kakihana, Yukihiro Harada, Osamu Nakagawa
2. 発表標題 Physiological significance of ALK1 signaling in zebrafish organotypic vascular formation
3. 学会等名 BCVR 第5回日本循環器学会基礎研究フォーラム（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浦崎明宏
2. 発表標題 Tol2遺伝子導入システムの開発と生体ライブイメージングによる基礎血管研究
3. 学会等名 第57回日本小児循環器学会学術集会併催 第24回日本小児心血管分子医学研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浦崎明宏、中川修
2. 発表標題 臓器特異的血管形成におけるALK1シグナルの生理学的重要性
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浦崎明宏、田中亨、原田恭弘、劉孟佳、川村晃久、渡邊裕介、中川修
2. 発表標題 胚発生における心血管シグナル伝達系と環境因子の相互関係
3. 学会等名 第23回日本心血管内分泌代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦崎明宏、渡邊裕介、原田恭弘、田中亨、劉孟佳、中川修
2. 発表標題 BMP-ALK1シグナル伝達系の新規下流遺伝子群の発現制御と機能解析
3. 学会等名 第6回日本HHT研究会
4. 発表年 2019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	中川 修 (Nakagawa Osamu) (40283593)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長 (84404)	
研究分担者	渡邊 裕介 (Watanabe Yusuke) (20562333)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長 (84404)	
研究分担者	劉 孟佳 (Liu Norika) (50826922)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動 研究員 (84404)	
研究分担者	垣花 優希 (Kakihana Yuki) (40910534)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・リ サーチフェロー (84404)	
研究分担者	橋本 大輝 (Hashimoto Daiki) (40911342)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・リ サーチフェロー (84404)	

6. 研究組織（つづき）

	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	原田 恭弘 (Harada Yukihiro) (70911402)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・リサーチフェロー (84404)	
研究分担者	L A M R I L Y N D A (Lamri Lynda) (90883984)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・リサーチフェロー (84404)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関