

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：74408

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16140

研究課題名（和文）生体内血管リモデリング：血流刺激に対する血管内皮細胞の感知応答機構の解明

研究課題名（英文）In vivo vascular remodeling: Molecular mechanisms of blood flow sensing and response by vascular endothelial cells

研究代表者

高瀬 悠太 (Yuta, Takase)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部・特別研究員

研究者番号：70756478

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では血流依存的に起こる血管リモデリングに注目し、トリ胚周囲に広がる血管網をモデルとして、血管内皮細胞による血流刺激の感知・応答機構の解明を目指した。まず、トリ胚血管内皮細胞への局所的な遺伝子導入法を確立した。そして、この手法を活用し、TGF 受容体ALK1が物理的刺激的の感知センサーTRPM7/8や細胞骨格制御因子RhoAと関連することで動脈へのリモデリングが惹起されることを見出した。この結果は、血流刺激の実体が液体の流れに伴う物理的刺激である可能性を示唆する。また、ノックダウン実験を通じて、ALK1がリモデリング後の血管の性質（動脈や静脈）決定にも関わる可能性も見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管ネットワークは、秩序だった動静脈パターンで全身に広く分布し、各臓器・器官への酸素や栄養素の供給などを通してさまざまな生理活動を支えている。これらの血管パターンの多くは、無秩序なメッシュ状の血管網がリモデリングすることで完成する。本研究成果は、発生過程における動脈リモデリングを制御する分子機構の一端を明らかにした点で生命科学分野における学術的意義を持つ。加えて、血管リモデリングの破綻は循環器系疾患やガン転移にも繋がらうことから、本研究成果は社会的にも大きな意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：Whereas the early formation of blood vessels is genetically determined during embryogenesis, at later stages non-genetic factors including hemodynamics (blood flow) play predominant roles in vasculature network formation, particularly the vasculature remodeling. To understand how the remodeling is regulated in living embryos at the cellular and molecular levels, I used the yolk sac vasculature in chicken embryos as an experimental model. At first, I established a local gene transfer method to developing vasculature. By taking advantages of this method, I found that the TGF receptor ALK1 triggers remodeling to the arteries, in association with the mechano-stress sensor TRPM7/8 and cytoskeletal regulator RhoA. These results suggest that the blood flow may be acting as the "physical stimulus". Additionally, local knockdown experiments suggest that ALK1 may be also involved in determining the nature of blood vessels (arteries and veins) after remodeling.

研究分野：発生生物学

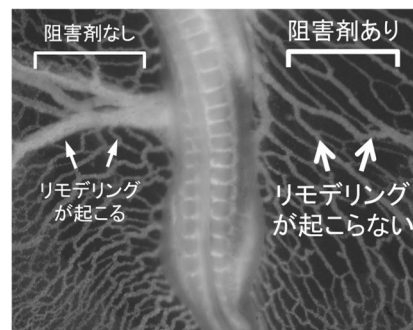
キーワード：生体内血管リモデリング トリ胚 細胞挙動 血流刺激 感知・応答



組織透明化法の至適化を試みた。

### (3) 血流刺激の感知・応答機構の分子実体解明

トリ胚血管網において血管リモデリングを左右別々に操作できる解析系(図2, 申請者が確立)および(1)で確立した血管網への局所的な遺伝子導入法を活用し、内皮細胞による血流刺激に対する感知・応答に關与する分子群の探索・同定を実施した。具体的には、左右片側の血管網、特に動脈へとリモデリングする領域の血管網に候補分子群に対する阻害剤や siRNA を処理し、血流が正常であっても動脈リモデリングが阻害されるものを探索した。



**図2.血流刺激の感知応答機構の解析系**

胚右側の血管網のみで阻害剤を作用させると、正常な血流があっても動脈へのリモデリングが起こらない。3日目胚。背側像。

## 4. 研究成果

2020-2021 年度は新型コロナ感染拡大に伴う活動制限、2022 年度は所属機関変更の影響もあり研究時間が十分に確保できない状況であったが、動脈リモデリングを惹起する血流刺激の感知・応答機構に関して十分な成果を得られた。また、血管リモデリング評価系の確立時に培った組織透明化技術や画像解析技術を活用し、血管を介した栄養運搬の起点となる腸に注目した研究プロジェクトにおいて、予定外の成果を得た。

### (1) トリ胚血管網への局所的な遺伝子導入法の確立

市販トランスフェクション試薬の種類や濃度について条件検討を行った結果、プラスミド DNA に加えて mRNA や siRNA を効率よくトリ胚血管網に遺伝子導入できる条件を見出した (Takase Y. and Takahashi Y., *Dev. Biol.*, 2019)。加えて、トランスフェクション溶液の注入時期や場所を変えることで、遺伝子導入される血管領域を調節することも見出した。この手法を活用することで、各種血管構造 (動脈-毛細血管-静脈) へのリモデリングにおける注目分子の機能を、それぞれ区別して解析できるようになった。

### (2) 血管リモデリング評価系の確立

血管リモデリング過程における内皮細胞の挙動を 1 細胞レベルで撮影するために、共焦点顕微鏡 (Nikon A1R) を用いたライブイメージング解析系を確立させた。加えて、血管組織の 3 次元構造や内皮細胞の血流刺激応答の指標となる「細胞内における核とゴルジ体の相対位置関係」を可視化・評価するために、血管の標識方法や細胞核やゴルジ体の免疫染色、組織透明化法の組み合わせを至適化した。特に組織透明化法に関しては、親水性溶液をベースとした手法 3 種 (Sca/e, SeeDB2, CUBIC) について検討を行い、SeeDB2 による透明化が血管の蛍光標識と相性が良いことを見出した。

これらの検討結果や取得画像の解析技術は、血管を介した栄養運搬の起点となる腸に注目した研究プロジェクトにおいて、トリ胚腸の蠕動運動解析、腸の蠕動運動のペースメーカー細胞の可視化などの成果に繋がった (Shikaya Y. et. al., *Front. Cell Dev. Biol.*, 2022; Yagasaki R. et. al., *Dev. Growth Differ.*, 2022; Takase Y. and Takahashi T., *J. Vis. Exp.*, 2023)。

### (3) 血流刺激の感知・応答機構の分子実体解明

まず、血管リモデリングを左右別々に操作できる解析系(図2)を用いて、各種シグナリング阻害剤を処理した際に動脈リモデリングが起こらなくなるものをリストアップした。そして、効果を示した阻害剤の標的分子群について、血管網における遺伝子発現の確認と血管網への遺伝子導入による機能抑制( siRNA ノックダウンや機能阻害型変異体の強制発現)を行い、感知・応答機構の候補分子を絞り込んだ。また同時に、九州大学・大川恭行博士の協力の元、動脈リモデリング前後の血管網における RNAseq 解析も実施した。これらの解析結果から、TGF 受容体 ALK1 が動脈リモデリングに必要であることが見出された。興味深いことに、ノックダウン実験の結果から、ALK1 は動脈以外のリモデリング後の血管の性質(動脈や静脈)決定にも関わる可能性も見出された。

続いて、ALK1 の上流・下流シグナルの探索を試みた。まず、ALK1 の上流候補として、化学的刺激(リガンド分子)と物理的刺激(血流による摩擦力や圧力)の役割について解析した。化学的刺激に関しては ALK1 のリガンド分子として働きうる BMP9/10・TGF 1 のいずれもが動脈リモデリングに対して負に働くことが見出された。一方、物理的刺激に関しては、メカニカルイオンチャネル群の阻害剤スクリーニングの結果、TRPM7/8 が ALK1 を介した動脈リモデリングに関わる可能性が見出された。これらの結果は、血流刺激の実体が液体の流れに伴う物理的刺激である可能性を示唆する。次に、ALK1 の下流候補として、血流刺激に応じた内皮細胞の挙動変化2種を引き起こす細胞骨格制御因子 RhoA との関連性を解析した。具体的には、ALK1 に対する siRNA ノックダウンと RhoA の活性化阻害剤/促進剤の共導入などを行い、ALK1 の下流で RhoA の活性が変化することで動脈リモデリングが起こる可能性が強く示唆された。

## 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 3件）

1. 著者名 Takase Yuta, Fujishima Kazuto, Takahashi Toshio	4. 巻 -
2. 論文標題 The 3D Culturing of Organoids from Murine Intestinal Crypts and a Single Stem Cell for Organoid Research	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	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） 10.3791/65219	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 Yagasaki Rei, Shikaya Yuuki, Kawachi Teruaki, Inaba Masafumi, Takase Yuta, Takahashi Yoshiko	4. 巻 64
2. 論文標題 Newly raised anti c Kit antibody visualizes morphology of interstitial cells of Cajal in the developing gut of chicken embryos	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 446 ~ 454
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12808	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shikaya Yuuki, Takase Yuta, Tadokoro Ryosuke, Nakamura Ryo, Inaba Masafumi, Takahashi Yoshiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Distribution Map of Peristaltic Waves in the Chicken Embryonic Gut Reveals Importance of Enteric Nervous System and Inter-Region Cross Talks Along the Gut Axis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	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） 10.3389/fcell.2022.827079	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 Takase Yuta, Takahashi Yoshiko	4. 巻 456
2. 論文標題 Blood flow-mediated gene transfer and siRNA-knockdown in the developing vasculature in a spatio-temporally controlled manner in chicken embryos	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 8 ~ 16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2019.08.001	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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高瀬悠太
2. 発表標題 生体内血管リモデリング：血管網内の無血管領域"pillar"の変形と周辺血流との関係
3. 学会等名 第6回血管生物医学会若手研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takase Y. and Takahashi Y.
2. 発表標題 Vascular remodeling: dynamics of avascular pillars regulated by local differences in blood flow
3. 学会等名 第53回日本発生生物学会年会（誌上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takase Y. and Takahashi Y.
2. 発表標題 Vascular remodeling: dynamics of avascular pillars regulated by local differences in blood flow
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会（誌上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takase Y. Nakazato K. Mochizuki A. and Takahashi Y.
2. 発表標題 Vascular remodeling: dynamics of avascular pillars regulated by local differences in blood flow
3. 学会等名 the 9th EMT International Association meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高瀬悠太
2. 発表標題 二ワトリ胚観察を通じた数理の可能性の探求
3. 学会等名 数理が紡ぐ新しい科学研究連携ワークショップ 第一回 ~生命医科学と数理科学~ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takase Y. Nakazato K. Mochizuki A. and Takahashi Y.
2. 発表標題 Vascular remodeling: dynamics of avascular pillars regulated by local differences in blood flow
3. 学会等名 第52回日本発生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 京都大学大学院理学研究科MACS教育プログラム実行委員会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 京都大学学術出版会	5. 総ページ数 318
3. 書名 京大式サイエンスの創り方	

〔産業財産権〕

〔その他〕

research map 個人ページ <a href="https://researchmap.jp/you-takase">https://researchmap.jp/you-takase</a>
---

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------