

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17131

研究課題名（和文）N-cadherinの血管内皮細胞における分子機構の解明と新たな治療薬の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of N-cadherin in vascular endothelial cell

研究代表者

友利 裕二（TOMORI, YUJI）

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：30637848

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）：本研究では正常時および炎症時の血管透過性制御、脳血管関門（BBB）の構築・維持におけるN-cadherinの機能を明らかにするため、内皮細胞特異的n-cadherin欠損ゼブラフィッシュの樹立を試みたが、正常にloxPサイトが挿入された個体を得ることができなかった。並行して、血管内皮細胞間接着を増強し、血管透過性を抑える働きがある低分子量Gタンパク質Rap1の生体における役割についても解析を進めた。血管内皮細胞特異的Rap1欠損マウスを作製し、解析を行ったところ、重度の肺水腫により死亡することを発見し、Rap1は肺胞毛細血管の血管バリア機能に必須の分子であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRISPR/Cas9の技術を用いて、内皮細胞特異的にn-cadherinを破壊することができるコンディショナルゼブラフィッシュの開発を試みたが、期待通りにloxP遺伝子を挿入できなかった。現在、挿入部位を変え、再度検討を行っている。血管透過性制御における低分子量Gタンパク質Rap1の機能に関しては、肺のバリア機能における役割を明らかにすることができた。血管内皮細胞におけるRap1の機能を解明することは、血管透過性に関わる疾患の予防法・治療法の開発に寄与する。

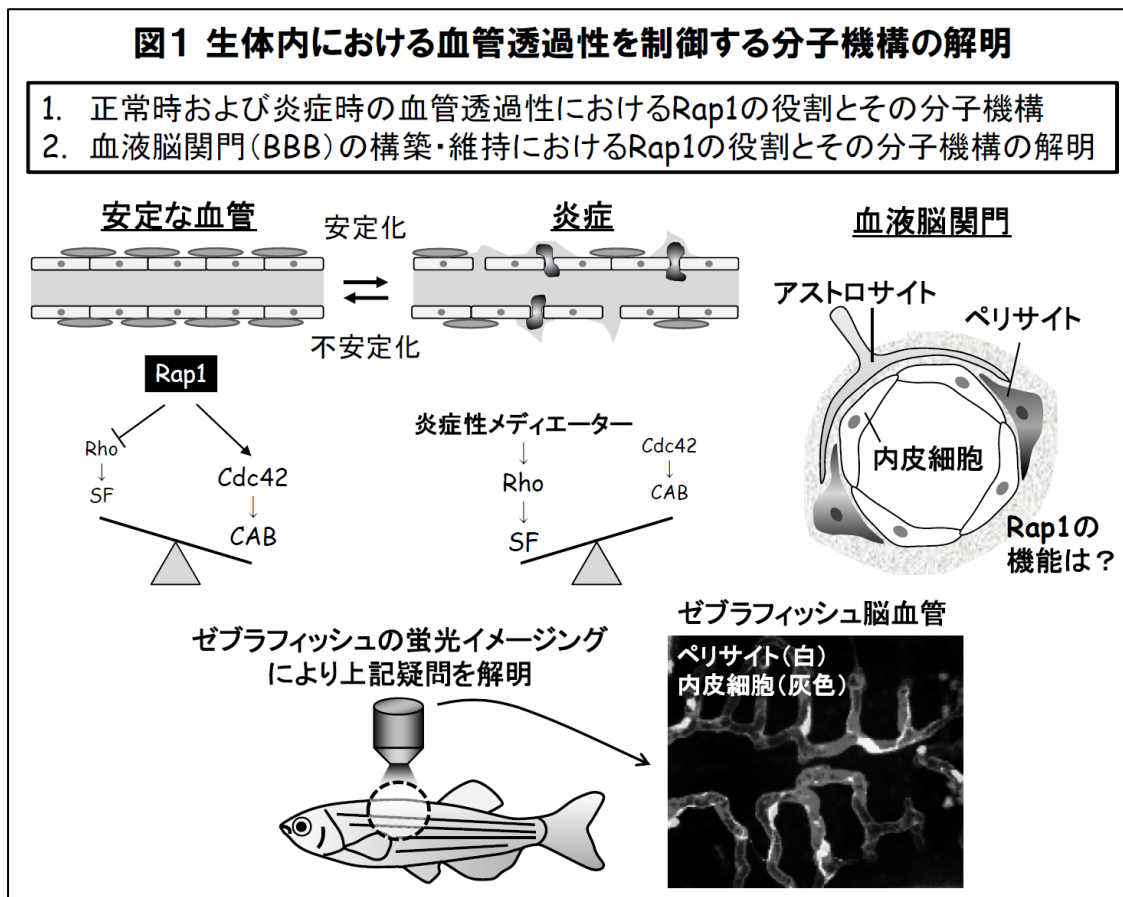
研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to establish endothelial cell-specific n-cadherin-deficient zebrafish in order to clarify the function of n-cadherin in the regulation of vascular permeability and the establishment and maintenance of the cerebrovascular barrier (BBB) under normal and inflammatory conditions. gene using CRISPR/Cas9 technology, but we were unable to obtain individuals in which loxP sites were inserted normally. In parallel, we also analyzed the in vivo role of Rap1, a low molecular weight G protein that enhances vascular endothelial cell-to-cell adhesion and suppresses vascular permeability. They generated and analyzed vascular endothelial cell-specific Rap1-deficient mice and found that they died from severe pulmonary edema, indicating that Rap1 is an essential molecule for the vascular barrier function of alveolar capillaries.

研究分野：循環器内科

キーワード：N-cadherin 血管透過性制御 ゼブラフィッシュ 蛍光イメージング 脳血管関門（BBB）

1. 研究開始当初の背景

血管透過性は血管内皮細胞同士の接着によって制御されている。血管内皮細胞には、内皮特異的接着分子である Vascular endothelial-cadherin に加え、N-cadherin も発現している。これまで血管内皮細胞間接着の形成には、VE-cadherin が重要な働きをもつことが知られているが、血管透過性制御における N-cadherin の機能に関して不明な点が多く残されている。



2. 研究の目的

本研究では生体内における血管透過性制御に対する N-cadherin (n-cad) の役割とその分子メカニズムを解明することを目的とした。

本研究目標を達成するため、ゼブラフィッシュをモデル動物として用いた蛍光イメージング技

術を駆使して、下記の3研究課題について研究を遂行した。

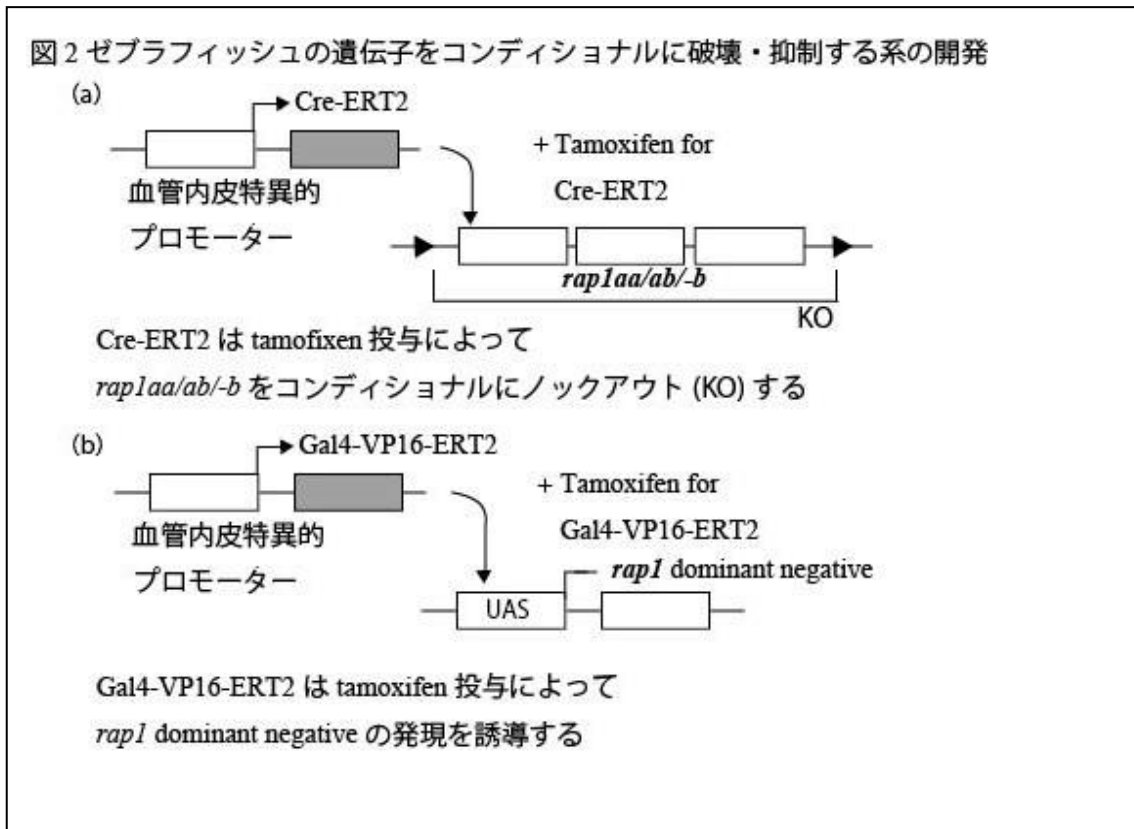
1. ゼブラフィッシュで n-cad 遺伝子をコンディショナルに破壊または抑制できるシステムの開発
2. 正常時および炎症時の血管透過性における n-cad の役割とその分子メカニズムの解明
3. 脳血管関門 (BBB) の構築・維持における n-cad の役割とその分子メカニズムの解明

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュで rap1 遺伝子をコンディショナルに破壊または抑制できるシステムの開発

ゼブラフィッシュには、rap1aa、rap1ab、rap1b の3つの rap1 遺伝子が存在する。既に、TALEN を用いたゲノム編集により、これら遺伝子を全身性に破壊したフィッシュを樹立して

いる。本研究では、さらに内皮細胞特異的に *rap1* を破壊あるいは機能を抑制できる系を構築することを試みた。CRISPR/Cas9 系を用いて、*rap1* 遺伝子の両端に *loxP* 配列を挿入したフィッシュを樹立し、内皮細胞で CreERT2 を発現するトランスジェニック (Tg) フィッシュと交配することで、タモキシフェン (TM) 依存性に内皮細胞の *rap1* を破壊する。また、GAL4/UAS システムを利用して、UAS の下流で Rap1 のドミナントネガティブ体 (Rap1DN) を



発現する Tg フィッシュと内皮細胞で Gal4VP16-ERT2 を発現する Tg フィッシュを交配し、TM 依存的に内皮細胞において Rap1DN を発現させることで、Rap1 シグナルを抑制することとした。

(2) 正常時および炎症時の血管透過性における Rap1 の役割とその分子メカニズムの解明

はじめに、1 の *rap1^{aa}*、*rap1^{ab}*、*rap1^b* 欠損フィッシュの胚および成魚の血管を詳細に観察し、血管透過性に異常が無いか解析することとした。また、「血管透過性は Rho と Cdc42 のバランスによって制御されており、正常組織では Rap1 がそのバランスを Cdc42 側に傾けることで血管透過性を抑えているが、炎症が誘導されると炎症性メディエーターがそのバランスを Rho 側に傾けることで血管透過性を亢進する」という仮説を検証するため、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理をもとに開発された Rap1・Rho・Cdc42 活性を可視化するバイオセンサーを内皮細胞で発現するゼブラフィッシュを樹立した (一部樹立済)。これらフィッシュを用いて、正常時および炎症時・炎症収束時における血管透過性と内皮細胞における Rap1・Rho・Cdc42 活性をライブイメージングにより解析することとした。正常皮膚組織に炎症性メディエーターを投与したときの、皮膚血管の透過性と Rap1・Rho・Cdc42 活性をライブで観察することとした。また、皮膚損傷により炎症を惹起したとき、さらに炎症が収束し血管が安定化するときについても、同様な解析を実施した。さらに、*rap1^{aa}*、*rap1^{ab}*、*rap1^b* の全身性およびコンディショナル遺伝子欠損フィッシュを用いて、正常および炎症組

織における血管透過性や Rho・Cdc42 活性を解析し、上記仮説を検証することとした。

4. 研究成果

本研究では正常時および炎症時の血管透過性制御、脳血管関門 (BBB) の構築・維持における N-cadherin の機能を明らかにするため、内皮細胞特異的 n-cadherin 欠損ゼブラフィッシュの樹立を試みた。CRISPR/Cas9 の技術を用いて n-cadherin 遺伝子の両端に loxP サイトの挿入を試みたが、正常に loxP サイトが挿入された個体を得ることができなかった。現在、挿入部位を変え、再度検討を行っている。

上記に並行して、血管内皮細胞間接着を増強し、血管透過性を抑える働きがある低分子量 G タンパク質 Rap1 の生体における役割についても解析を進めた。血管内皮細胞特異的 Rap1 欠損マウスを作製し、解析を行ったところ、重度の肺水腫により死亡することを発見し、Rap1 は肺胞毛細血管の血管バリア機能に必須の分子であることが明らかになった。血管透過性制御における低分子量 G タンパク質 Rap1 の機能に関しては、肺のバリア機能における役割を明らかにすることができた。現在、Rap1 が透過性を制御する分子メカニズムについて解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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