

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06740

研究課題名（和文）血管形成と神経発生のクロストーク：脳血管形態形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigating the crosstalk between angiogenesis and neurogenesis: elucidating the mechanism of cerebrovascular morphogenesis

研究代表者

木村 英二（Kimura, Eiji）

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50405750

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）：本研究では、複雑な形態を示す脳血管系の形態形成メカニズムの解明を目的とした。頭部において血管周囲組織を代表する「脳」で特異的な発現パターンを示し、脳血管形成との関連を認められた30の遺伝子群を選定した。これらの遺伝子群をCRISPR/Cas9システムによって破壊し、その脳血管形成への影響を評価することで脳血管特異的な血管形態構築システムの解明を目指した。その結果、複数の遺伝子破壊体の作成に成功し、現在その表現型の解析を進めている。また並行して実施した脳血管と周囲組織との関係を可視化した発生アトラスの作成にも成功した。このデータをもとに、今後様々な遺伝子破壊体の表現型解析を行うことが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の実施により、頭部発生過程において特徴的な発現パターンを示す複数の遺伝子群の破壊帯の作成を行うことに成功した。これらの破壊体における脳血管系への影響を今後明らかにすることで、複雑な形態を示す脳血管系の形成メカニズムの解明へとつなげていく。また並行して作成した頭部組織と脳血管の走行に関するアトラスに関しては、今後様々な遺伝子破壊体の表現型解析において指標となる貴重なデータとして活用していく。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to elucidate the mechanisms of formation of the cerebrovascular system, which has a complex morphology. We selected 30 genes that showed specific expression patterns in the brain, which represents the perivascular tissue in the head, and were found to be associated with cerebral vasculature formation. These genes were disrupted using the CRISPR/Cas9 system and their effects on cerebral vasculature formation were assessed, with the aim of elucidating the cerebral vasculature specific morphogenesis system. As a result, several gene disruptors were successfully generated and their phenotypic analysis is currently underway. In parallel, a developmental atlas visualizing the relationship between the cerebral blood vessels and the surrounding tissues was successfully generated, which will allow the phenotypic analysis of several gene disruptors in the future.

研究分野：発生学

キーワード：血管形成 ゼブラフィッシュ ゲノム編集 CRISPR/Cas9 脳血管

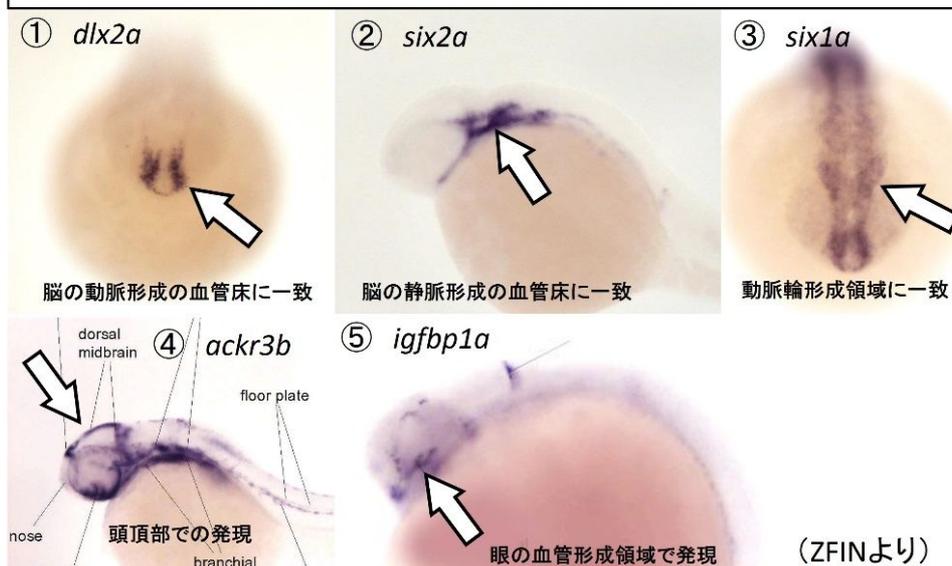
1. 研究開始当初の背景

血管と神経は、ほぼすべての組織に含まれており、絡み合うことなく精巧に体中に張り巡らされて各臓器へとつながっていく。約 500 年前から血管網と神経網の形態が示す類似性は指摘されていたが、2002 年に向山らは、マウスの上腕皮下組織内での血管網の形成を末梢神経に付随するシュワン細胞が誘導していること、同時に血管からは酸素や神経栄養因子が供給されることを明らかにし、血管形成と神経発生のクロストークが実験的に初めて証明された (Mukoyama et al., Cell 109, 2002)。我々はこれまで脳血管を研究対象とし、その初期形態の形成過程を形態学的に解析してきた。我々はこのためのモデル生物として、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・ゼブラフィッシュをタイムラプスイメージングにより観察し、脳血管系の初期の形成過程の全容を形態学的に明らかにすることに成功した (Kimura et al., Dev Biol 406, 2015; Hashiura, Kimura et al., PLoS One, 2017)。

すなわち初期の頭部血管系を構成する血管内皮細胞は、9-12 体節期に、眼胞の嘴側 (動脈性) と、眼胞と耳胞の間の後脳外側壁 (静脈性) に出現する 2 つの血管芽細胞集団を起源とし、そこからの動脈性・静脈性の血管新生によって互いに連結することで初期循環形態が確立する。動脈性の血管床からは、脳底部での動脈輪形成が、静脈性の血管床からは、頭頂部への中大脳静脈の形成や脊髄の血管とつながる原始後脳静脈 (PMBC) が形成される。また眼を支配する動静脈の形成も動静脈それぞれの血管床からの血管新生により形成されることが明らかとなった。

本研究でも使用しているゼブラフィッシュは、1990 年頃から脊椎動物の実験モデルとして重用されるようになった。1990 年代から ENU を用いたランダムな変異誘発による突然変異体の原因遺伝子のポジショナルクローニング法による同定により、さまざまな遺伝子の機能解析に貢献してきた。血管研究に関しては、microangiography 法による血管形成の発生アトラスが作成され (Isogai et al., Dev Biol 230, 2002)、このアトラスを基に血管形態形成に関与する遺伝子の探索・同定が行われてきた。その結果、主に体幹部の血管で神経ガイダンス因子である semapholin-plexin など数多くの遺伝子の関与が報告されている (Torres et al., Dev Cell 7, 2004; Jin et al., Dev Biol 307, 2007)。一方脳血管系では、後脳領域における中心動脈の形成における *cxcr4-cxcl12* シグナルの関与 (Fujita et al., Dev 138, 2011) や Wnt 関連遺伝子 *Reck* の関与 (Ulrich et al., Dev 143, 2016) などの報告があるのみで、複雑な形態を示す個々の脳血管系の形態形成に関わる遺伝子メカニズムはいまだ十分解明されていない。また *plxnd1* などの節間血管の形成異常を示す遺伝子破壊体でも多くの場合脳血管系は正常に構築されており、脳血管系の複雑な形態形成には体幹部とは異なった血管形成と神経発生のクロストークによる独自の形成メカニズムが存在していることが想定されている。そこで本研究では、先に記載した脳血管形成の 5 つの領域を対象とし、血管形成と神経発生のクロストークによる脳血管特異的な血管形態構築システムの解明を目的とし研究を開始した。

図 1: 対象遺伝子リストとその発現パターン(一部の遺伝子のみ)



- ① 脳動脈床の形成領域 (6遺伝子): *dlx2a/2a, dlx4a/4b, dlx5a/5b*
- ② 脳静脈床の形成領域 (2遺伝子): *six2a/2b*
- ③ 動脈輪形成領域 (10遺伝子): *gli1, gli2a/2b, lhx3, 4, pitx1, 2, 3, six1a/1b*
- ④ 頭頂領域 (6遺伝子): *ackr3b/3a, arr3a/3b, tpbga/tpgb*
- ⑤ 眼の血管形成領域 (6遺伝子): *igfbp1a/1b, arhgef1a/1b, qki a/b*

2. 研究の目的

本研究では、複雑な形態を示す脳血管系の形態形成メカニズムを明らかにすることを目的とした。体幹部と頭部を比べると、血管の周囲組織に大きな違いが存在する。体幹部では、体節において発現している遺伝子が反発作用をもたらすことで節間の血管の伸展方向を規定し節間血管の形態形成を制御している (Shoji et al., Dev 130, 2003)。頭部では「脳」がその役割を担っていることが推定された。そこで本研究では、「脳」で特異的な発現パターンを示し脳血管形成との関連を認めた 30 の遺伝子群を選定し、これらの遺伝子群を CRISPR/Cas9 システムによって破壊し、その脳血管形成への影響を評価することで脳血管特異的な血管形態構築システムの解明することを目的とした。我々は、ゼブラフィッシュの正常血管発生に精通しており、複雑な形態を示す脳血管における表現型の解析を行ううえで、非常に重要である。この利点を生かして脳血管系の形成メカニズムを解明することを目的とした。また表現系解析を行ううえで、脳血管系と周囲組織との細胞レベルでの関連性を明らかにしておく必要がある。このために本研究では脳血管形成メカニズムの解明と並行して正常の初期発生過程における脳血管と神経系を中心とした周囲組織との関係を、アトラスを作成し明らかにすることも併せて行った。

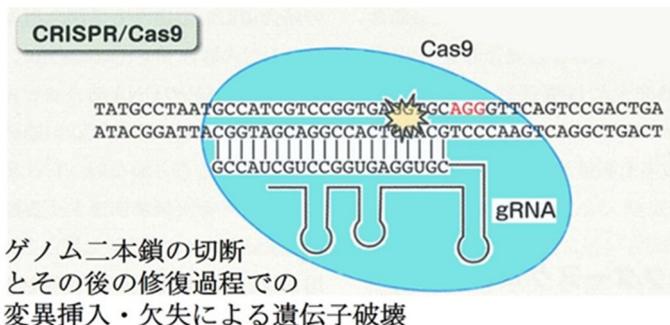


図 2 : CRISPR/Cas9の構造と配列結合様式 (今すぐ始めるゲノム編集 2014より)

3. 研究の方法

本研究では、脳血管系の形態形成システムを、脳領域で特異的な発現を示した 30 の遺伝子群の破壊体を CRISPR/Cas9 法で作成し、血管形成への影響をイメージングにより評価し、その影響を解析する。標的遺伝子探索のため、ゼブラフィッシュのデータベースである ZFIN (<https://zfin.org/>) から「脳」での発現を認める 1000 を超える遺伝子群の発生初期での詳細な in situ hybridization のデータを取得し、このデータを我々がこれまで観察してきた脳血管系の形態形成過程と照らし合わせることで、脳の動脈床、脳の静脈床、脳底動脈輪、頭頂部、眼胞の 5 つの領域において、脳血管形成と時間空間的な関連性を認めた 30 の遺伝子群を選定した (図 1 で各領域の遺伝子リストと代表的な発現パターンを提示)。このためにまず選定した 30 の遺伝子群の gRNA を合成し、Cas9 蛋白質と受精卵にインジェクションすることで遺伝子破壊体を作成を行った (図 2)。Cas9 蛋白質を使用することで、Cas9 mRNA の使用に比して高効率に F0 世代での表現型の確認が可能となることが期待される。またインジェクションは、血管系で特異的に緑色蛍光 (EGFP) を発現する Tg(flk1:EGFP) と、全細胞の細胞膜で赤色蛍光 (mCherryCAAX) を発現する Tg(bactin:mCherryCAAX) の系統のダブルトランスジェニックの受精卵に対して行う。この組み替え体を用いることにより血管系の異常のみならず、脳を含む全組織での異常 (表現型) を蛍光顕微鏡により評価できる (図 3)。またパラログ遺伝子が存在する場合は複数遺伝子の同時破壊も並行して行い、F0 世代での表現型がより確認しやすい条件でスクリーニングを進めていく。表現型を認めた遺伝子に関してはライン化を進めていく。ライン化には 1 年程度時間がかかるため、並行してモルフォリノオリゴによるノックダウン実験を行い表現型の差異の有無も検証する。ライン化を樹立した後は、表現型が出現する過程をタイムラプス観察により詳細に解析し、正常発生と比較し、形態形成以上を認めた遺伝子に対しては、破壊遺伝子の mRNA による rescue 実験を行い、表現型の回復を確認するとともに、関連遺伝子を含めた発現変化を in situ hybridization 法により評価し、脳血管形成メカニズムを解明する。

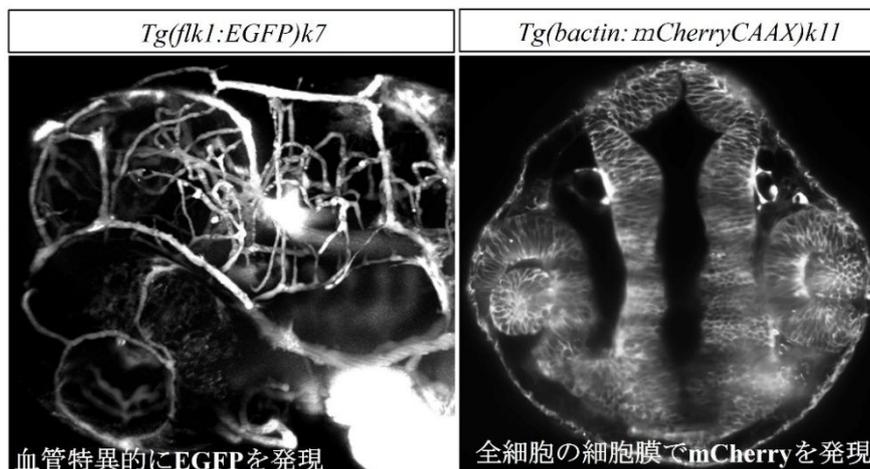


図 3 : 遺伝子破壊体作成に使用するトランスジェニックゼブラフィッシュ

4. 研究成果

2021 年度には、ゼブラフィッシュのデータベースを用いて対象遺伝子の再確認を行い、計 31 遺伝子を対象として選定した（脳動脈床の領域 5 遺伝子、脳静脈床の領域 2 遺伝子、視床下部・下垂体領域 10 遺伝子、眼の血管形成領域 6 遺伝子、頭頂部領域 4 遺伝子）。そしてこれらの対象遺伝子の破壊実験のために使用する sgRNA の設計を行った。併せて sgRNA のゲノム編集活性を評価する HMA 法で使用する check primer も各 sgRNA に対して設計し発注した。このうち、sgRNA 用 primer をそれぞれ pDR274 にクローニングし、組み込まれた配列をシークエンサーで確認した。配列が正しく確認できた plasmid は制限酵素処理することで 1 本化し、sgRNA を合成した。これらの sgRNA を、血管系で特異的に蛍光を発する遺伝子組み換え体の受精卵に対してインジェクションを行い、HMA 法によりゲノム編集活性を評価すると同時に、表現型の有無を F0 世代で確認した。その結果、約半数でゲノム編集活性を確認できたが、残りの半数では十分な編集活性は認められなかった。これらの傾向として年度後半にインジェクションしたもののほどゲノム編集活性が低い傾向があることから、gRNA の合成してからの保存に問題がある可能性が考えられた。またインジェクションした F0 世代で、個体発生に重篤な影響を示すものは複数確認できたが、明確な血管パターンの変異のみを示すものは得られなかった。そのため表現型の評価を F1 世代で行うべく、編集活性を認めた遺伝子に関しては F0 世代を飼育中であり、今後交配可能になった段階で F1 世代でのゲノム変異を確認し、変異体系統の樹立を目指していくこととした。またゲノム編集活性を認められなかった遺伝子に対しては、2022 年度に再度同様に sgRNA の作成し、インジェクションを行ったが、多くの遺伝子群では、この段階でもゲノム編集活性が認められなかった。そのため残りの研究期間との兼ね合いも考慮し IDT による crRNA の導入を行った。crRNA では tracrRNA と合わせてインジェクションすることで sgRNA と同等以上のゲノム編集が可能となり配列を打ち込むだけで 1 週間後には納入されインジェクションが可能となる。crRNA の導入により予定した遺伝子群でゲノム編集能を有する sgRNA をすべて取得することができ、2022 年度内で全ての対象遺伝子に対する sgRNA のインジェクションを終わらせることができた。2023 年度には F0 世代の potential founder の同定を行い、その founder と血管で特異的に蛍光を発現する系統との交配による F1 世代の飼育を進め、遺伝子変異を有するものを同定するところまで進行した。今後これらの系統を交配し F2 世代での表現型の確認作業を行っていく。

また血管系と周囲組織のアトラスの作成では、血管系で特異的に緑色蛍光 (EGFP) を発現する Tg(flk1:EGFP) と、全細胞の細胞膜で赤色蛍光 (mCherryCAAX) を発現する Tg(bactin:mCherryCAAX) の系統のダブルトランスジェニック胚を、12 体節期、18 体節期、24 体節期、受精後 1 日目胚、受精後 1.5 日目胚、受精後 2 日目胚、受精後 2.5 日目胚、受精後 3 日目胚を対象とし、撮影を行った。受精後 1 日目胚までの初期胚に対しては、固定し透明化処理すると自家蛍光が強くなるため、生きたままで撮影し、それ以降の胚に関しては、4%PFA で固定後、Scale 処理し、ライトシート顕微鏡で撮影しデータ収集を行った。これらのデータは 180 度回転させて、背側からと腹側からそれぞれ撮影を行い、その後 ImageJ の plugin である BigStitcher により合成することで質の高いアトラスデータを作成することに成功した。これらのデータは現在英文発表に向け準備を進めている。

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