

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871232

研究課題名(和文) 生体4Dイメージングによる血管の管腔形成機構の解析

研究課題名(英文) Analyses of vascular lumen formation by in vivo imaging

## 研究代表者

中嶋 洋行 (Hiroyuki, Nakajima)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：10467657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞特異的に内腔膜および細胞間接着を可視化できるトランスジェニックゼブラフィッシュを作製し、生体内ライブイメージングにより血管の管腔形成過程を観察した。その結果、同過程における血流の役割を見出した。さらに我々は、Hippo pathwayの標的因子であるYAP1が、血管の管腔形成に伴って核外から核内に移行することを見出し、最終的にはこれが管腔形成後の血流刺激によって制御されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We constructed transgenic zebrafish lines that can label apical membranes and cell-cell junctions specifically in endothelial cells. By using these lines, we have revealed that some processes of lumen formation are driven by blood flow. In addition, we found that YAP1, a target of the Hippo pathway, translocated into the nucleus just after lumen formation. Finally, we have demonstrated that YAP1 is regulated by blood flow after lumen formation.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管形成

1. 研究開始当初の背景

血管の主要な役割は、『管』として血液(血球、栄養因子、老廃物など)の運搬を担うことである。それゆえ、酸素や栄養の需要に応じて最適な径の内腔を形成することが、機能的血管の構築には不可欠となる。血管内腔の形成は、血管内皮細胞が内腔(Apical)側と側底部側に極性化するところから始まり、続いて内腔側の細胞外に腔を生成する。そして最終的に血球が通過可能な大きさにまで内腔が拡張する。一旦、形成された血管は、血液が流れることにより、その管構造が維持されると考えられている。しかしながら、生体内でどのようにしてこの一連の現象が起こるのかについては、分子メカニズムは元より現象自体についても知見が乏しいのが現状である。さらに、管腔形成を制御するシグナル伝達系や管腔形成に起因する血管内皮細胞の応答についてもまだまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、ゼブラフィッシュを用いた生体内ライブイメージングにより血管の管腔化の過程を動的に理解することを目指す。さらに、それを制御するシグナル伝達系や、管腔化に起因して内皮細胞がどのように応答するのかを明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

胚が透明で生きたまま血管を可視化できるゼブラフィッシュをモデルとして用いて、管腔形成の過程を共焦点顕微鏡や多光子励起顕微鏡を用いて観察した。その前段階として、内腔膜や細胞間接着を蛍光蛋白質で血管内皮細胞特異的にラベルすることができるトランスジェニックゼブラフィッシュの作製を行った。内腔膜をラベルする目的で内腔膜に局在することがわかっている podocalyxin-like 1 (pdx11)の全長、および phospholipase Cδ (PLCδ)の PH ドメインをクローニングし、これに mCherry や GFP を繋げて、血管内皮細胞特異的なプロモーターである *fli1* プロモーターで発現させた。細胞間接着をラベルする目的で、Claudin-5 および Pecam-1 の全長をクローニングし、同様に血管内皮細胞特異的に発現させた。血流の可視化は量子ドットを心臓にインジェクションすることにより行った。

管腔形成に関与するシグナル分子の候補として、上皮細胞の極性形成に関与する Hippo 経路に注目し、血管の管腔形成との関係性を検討した。Hippo pathway の標的因子である転写共役因子 YAP1 は、細胞内での局在の変化によって、その転写活性化能が制御されていることがわかっている。そこで、GFP-YAP1 を血管内皮細胞特異的に発現させるトランスジェニックゼブラフィッシュを作製し、その局在(核内もしくは核外)を生体内で観察することで活性化状態をモニター

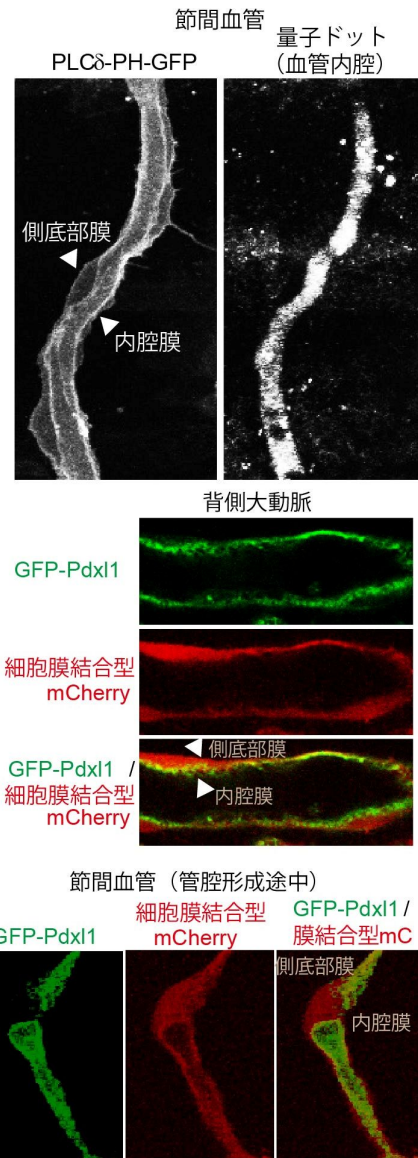
した。

4. 研究成果

(1) 内腔膜および細胞間接着を可視化できるトランスジェニックゼブラフィッシュの作製

PLCδの PH ドメインを発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ *Tg(fli1:PLCδ-PH-GFP)* の発現を検討したところ、血管内皮細胞の内腔膜が GFP で強くラベルされ、側底部膜が弱くラベルされることが分かった。一方で、*Tg(fli1-GFP-pdx11)* (GFP は *pdx11* の signal sequence 直後に付加) を作製し、局在を検討したところ、血管内皮細胞の内腔膜のみが特異的にラベルされることが分かった。

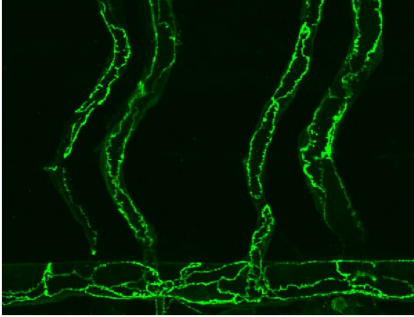
*Tg(fli1:Pecam1-GFP)*、*Tg(fli1:Claudin5-GFP)*



ゼブラフィッシュ節間血管において、PLCδ-PH-GFP は内腔膜により強く局在した(上段)。一方、GFP-Pdx11 は、背側大動脈、節間血管において内腔膜に特異的に局在した(中下段)。

を新たに作成し、両者が血管内皮細胞の内腔膜を特異的にラベルすることを観察した。  
(2) 管腔形成過程の経時観察と、それにおける血流の役割

## Pecam1-GFP

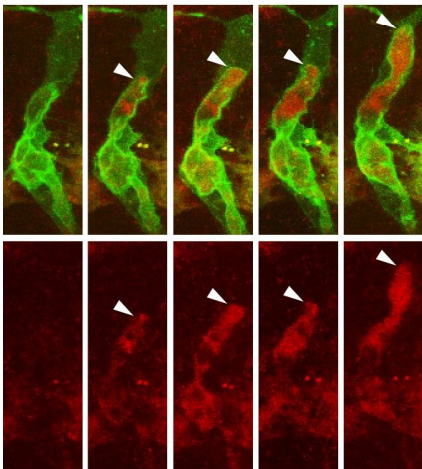
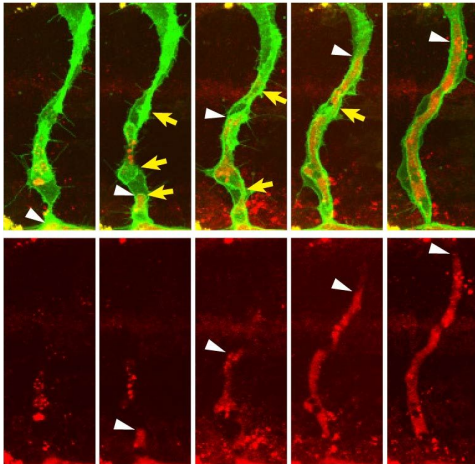


Pecam1-GFP は、背側大動脈、節間血管において細胞間接着に特異的に局在した。

二光子励起顕微鏡を用いて、管腔が形成される過程を動的に解析した結果、血管新生では最初に複数の両側盲端の管腔が自律的に形成され、続いて血流と繋がった内腔（開放端）が抹消（盲端側）に向かって伸長・融合することで一続きの管腔を形成することを明らかにした。後者の管腔の伸長および融合は心拍に起因する血流に依存しており、血流による方向性を持った力が管腔化の駆動力となることがわかってきた。管腔形成において、血管内皮細胞がどのようにして血流によ

緑：内腔膜 (PLCδ-PH-EGFP)

赤：量子ドット (内腔)

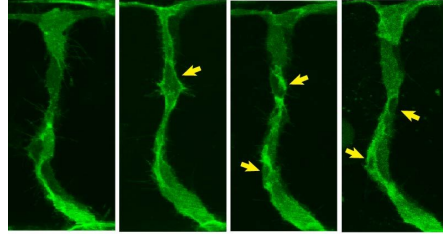


節間血管の管腔形成過程を二光子励起顕微鏡を用いて観察した。血流と繋がった内腔（開放端）が抹消（盲端側）に向かって伸長（下図）、融合（上図）することで一続きの管腔が形成される。

るメカニカルストレスにตอบสนองするのが今後の課題である。

心拍停止させた胚 (*tnnt2a* MO)

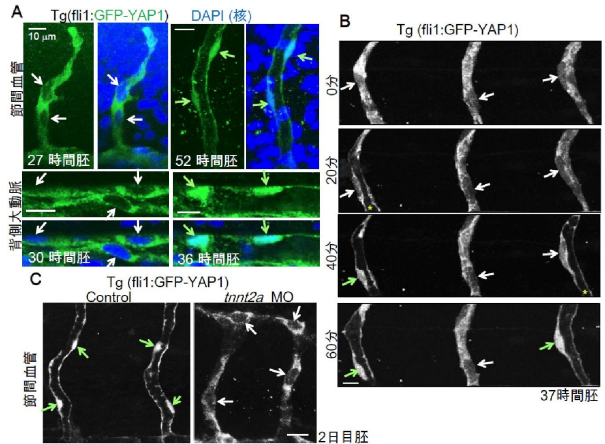
内腔膜 (PLCδ-PH-GFP)



*tnnt2a* に対するモルフォリノオリゴのインジェクションにより血流を消失させた胚では、節間血管の管腔形成過程における管腔の伸長および融合が阻害された。

### (3) 管腔形成を介した YAP1 の局在制御

Hippo 経路の標的因子である転写共役因子 YAP1 の活性制御をモニターする目的で、血管内皮特異的に GFP-YAP1 を発現するトランスジェニックフィッシュ *Tg(fli1:YAP1)* を作製して解析を行った。本研究では、GFP-YAP1 の局在を生体内で生きたまま観察することで、血管における YAP の活性状態を動的に捉えることに成功した。その結果、GFP-YAP1 が血管管腔化に伴って核内に移行すること、YAP1 の核局在に管腔形成が必要であることを見出した。さらに一連の解析から、YAP の核局在が、管腔化に伴う細胞形態の変化ではなく、血流によるシアストレスによって引き起こされることを新たに見出した。



(A) GFP-YAP1 は、背側大動脈、節間血管において管腔形成が起こる前もしくは管腔形成が未熟な時期の血管では核外に局在していたのに対して、管腔形成後の血管では核内に局在した。(B) GFP-YAP1 は、管腔形成に伴って核内に移行した。(C) 血流の停止により管腔形成が阻害された *tnnt2* MO 胚では GFP-YAP1 の核内移行が阻害された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Identification of inter-organ vascular network: vessels bridging between organs.  
Omae M., Takada N., Yamamoto S., Nakajima H., Sato TN. *PLoS One* 8: e65720 (2013) 査読有

S1P-Yap1 signaling regulates endoderm

formation required for cardiac precursor cell migration in zebrafish.  
Fukui H., Terai K., Nakajima H., Chiba A., Fukuhara S., Mochizuki N. *Dev. Cell* **31**: 128-136 (2014) 査読有

$\beta$ -Catenin-dependent transcription is central to Bmp-mediated formation of venous vessels.  
Kashiwada T, Fukuhara S, Terai K, Tanaka T, Wakayama Y, Ando K, Nakajima H., Fukui H, Yuge S, Saito Y, Gemma A, Mochizuki N. *Development* **142**: 497-509 (2015) 査読有

Looking back and moving forward: Recent advances in understanding of cardiovascular development by imaging of zebrafish.  
Fukuhara S, Fukui H, Wakayama Y, Ando K, Nakajima H., Mochizuki N. *Dev. Growth Differ.* **57**: 333-340 (2015) 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

第 4 回 Molecular Cardiovascular Conference II 2013 年 9 月 (Talk およびポスター発表)  
血管形成過程における Hippo pathway 標的因子 YAP の動態解析  
中嶋洋行、福原茂朋、望月直樹

The 18th International Vascular Biology Meeting (IVBM2014) 2014 年 4 月 (ポスター発表)  
In vivo imaging of YAP dynamics in zebrafish vascular development  
Hiroyuki Nakajima, Shigetomo Fukuhara, Naoki Mochizuki

第 5 回 Molecular Cardiovascular Conference II 2014 年 9 月 (Talk およびポスター発表)  
血流に依る機械的刺激に対する内皮細胞の新たな応答機構の解析  
中嶋洋行、福井一、福原茂朋、望月直樹

第 67 回日本細胞生物学会大会 2015 年 6 月 (ワークショップおよびポスター発表)  
血流による機械的刺激に対する YAP1 の応答機構  
中嶋洋行、山本希美子、福井一、福原茂朋、望月直樹

Gordon Research Seminar on Angiogenesis(GRS) 2015 年 8 月 (Talk)  
Flow-dependent mechanical stress induces nuclear translocation of YAP1 by regulating actin cytoskeleton  
Hiroyuki Nakajima

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中嶋 洋行 (Nakajima Hiroyuki)  
国立循環器病研究センター研究所・上級研究員  
研究者番号：10467657

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：