

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460255

研究課題名(和文)血管形成・動静脈分化に関与する新規遺伝子群のTALEN法による機能解析

研究課題名(英文)Analysis for the regulatory mechanisms underlying the cranial vascular formation

研究代表者

木村 英二(Kimura, Eiji)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：50405750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイクロアレイ法と遺伝子発現パターンを併用して選定した脳血管形成への関与が想定された11遺伝子を対象にCRISPR/Cas9法を用いて遺伝子破壊体を作成し、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。その結果、対象とした全11遺伝子に対してゲノム編集能を有するsgRNAの作製に成功した。また10遺伝子に対しては、フレームシフトを生じる変異体の作成にも成功し、現在これらの系統を用いて脳血管形成に関わる表現型の解析を進めている。一方、並行して眼を支配する血管形成過程を解析し、ゼブラフィッシュとマウス胚子においてその初期過程を明らかにすることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Previously, we performed microarray analysis of *etv2* deficient zebrafish embryos, which was one of the earliest markers for angioblasts. We first identified 165 genes that were up-regulated more than 1.5 fold by silencing *etv2* expression, then analyzed their expression patterns at 12-somite stage to evaluate whether these genes were associated with the cranial vascular formation, and finally selected 11 genes for the loss of function assay. In this study, we knocked out these 11 genes using the CRISPR/Cas9 system to analyze the mechanisms of cerebral vasculature formation. As a result, we succeeded in producing sgRNAs for each gene which was capable of the genome editing. For 10 genes, we established heterozygous zebrafish lines in which targeted genes were knocked out by the frame-shift and analysis of the phenotype induced by loss of function were in progress. Additionally, we succeeded in revealing the primary ocular vasculature formation both in zebrafish and mouse embryos.

研究分野：発生学

キーワード：ゼブラフィッシュ CRISPR/Cas9 脈管形成 血管新生 遺伝子破壊

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は、小型魚類のゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用いて、初期の脳血管系がいかんして構築され、そののちどのようにして脊髄の血管系と統合されるか、その全過程を明らかにすることに成功した。そして血管形成が阻害された胚において発現が上昇する遺伝子群を、脳血管系が形成されるタイミングでマイクロアレイ法により解析し、1.5倍以上の上昇を示した遺伝子群を抽出し、さらにその発現パターンを血管形成や動静脈分化領域と比較することで、関連領域で特異的に発現している 11 遺伝子を脳血管形成に関与する遺伝子候補として同定した。

(2) われわれはゼブラフィッシュを用いた解析により、初期の脳血管形成過程と脳脊髄の連結過程を形態学的に明らかにしたが、眼を支配する血管系の形成過程に関しては、まだ十分な解析をおこなっていなかった。

(3) ゼブラフィッシュで我々が得た初期の脳血管形成に関する知見が、哺乳類でも保存されているのか、十分な解析は行っていない。

2. 研究の目的

(1) これまでわれわれは、形態学的手法を駆使して、初期の脳血管系の形成過程を解析し、その基本的な過程を理解することに成功した。そこで本研究では、マイクロアレイ法と遺伝子発現パターンを併用して抽出した脳血管形成への関与が想定された 11 遺伝子を CRISPR/Cas9 法により破壊し、脳血管系の形態形成メカニズム、ならびに頭部血管系における動静脈分化制御システムを明らかにすることを目的とした。

(2) 同時に、まだ十分な解析が行われていない眼を支配する血管系の初期形成過程をタイムラプス法により詳細に明らかにし、その形態形成制御メカニズムの解析を行う上での基盤情報を整備することを目的とした。

(3) また我々が、ゼブラフィッシュの観察を通じて明らかにしてきた初期の脳血管系の形成過程が哺乳類においても保存されたものであるのかを、血管系に対して蛍光免疫染色を施したマウス胚子を観察することで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、マイクロアレイ法と遺伝子発現パターンを併用することで抽出した 11 遺伝子を対象とし、それらの遺伝子を破壊したゼブラフィッシュの系統を作製する。遺伝子破壊体の作成手法としては、当初は TALEN 法を用いることを想定したが、その後の急速な技術的な進展を踏まえ、より簡便にゲノム編集が可能な CRISPR/Cas9 法を採用することとした。まず標的遺伝子の脊椎動物間で保存性の高い領域を tblastx 法により抽出した。抽出した配列に対して CRISPR direct により特異性の高い sgRNA を設計し、クロー

ニング後に sgRNA を合成した。これとは別に合成した Cas9 の mRNA とともに 1 細胞期のゼブラフィッシュの受精卵にインジェクションし、その後 HMA 法により作成した sgRNA のゲノム編集に対する活性を評価した。HMA 法では、ポリアクリルアミドゲル電気泳動の際、完全に相補的なホモ二本鎖 DNA は分子量依存的な泳動パターンを示すが、一部がミスマッチしたヘテロ二本鎖 DNA は露出した部分の立体構造の差異により泳動速度が遅くなる現象を利用した方法で、簡便な標的ゲノム切断活性の評価を可能にする。十分なゲノム編集が認められたものに関しては、そのまま F0 世代を飼育し、成魚に成長したのち野生型と交配して得られた F1 世代のゲノムを再び HMA 法で解析することで、potential founder を同定した。Potential founder は、血管系で特異的に蛍光を発する *Tg(fli1:EGFP)y1* と交配することで、血管系が可視化された状態にして F1 世代を飼育した。成長した F1 世代は、fin clip 法により、ゲノム編集パターンを HMA 法ならびにシーケンスにより確認し、フレームシフトを生じる個体を同定した。同一の変位を持つ雌雄体が得られた場合は、それらを交配することで 4 分の 1 の確率でホモ接合体を取得し、この血管形成における表現型をイメージングにより評価した。

(2) 眼を支配する血管系の初期形成過程の解析では、血管で特異的に蛍光を発する遺伝子組み換えゼブラフィッシュ *Tg(flk1:EGFP)k7* を二光子顕微鏡でタイムラプス撮影し、初期の形態形成過程を明らかにした。また周囲組織との関連性を明らかにするために、GMA 樹脂包埋した連続組織切片を作成した。トルイジンブルーで染色した標本をデジタルカメラにて撮影後に三次元再構築することで、眼を支配する血管系と眼裂の位置関係に関して形態学的に解析した。

(3) 初期の脳血管形成過程が哺乳類において保存されているかの検討では、ICR 妊娠マウスから、脳血管系が最初に形成されるタイミングである交尾後 7.5 日目から 8.5 日目にかけてマウス胚子を取り出し、抗 CD31 抗体を用いて、ホールマウント蛍光免疫染色を施すことで、初期の脳血管系を可視化した。染色に際しては Tyramid 法を用いることで蛍光強度を増幅させ、また染色後の胚子は、CUBIC 法により透明化処理を施し、そののち共焦点顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

(1) 今回我々は 11 遺伝子を遺伝子破壊体の作成対象として抽出した。すなわち静脈性の血管床の分化に一致した領域で発現を示した遺伝子として *acer1* と *eng2a* を、動脈性の血管床の分化に一致した領域で発現を示した遺伝子として *diala* を、脳脊髄をつなぐ血管が伸展する脊髄腹側面に接した領域で発現を示す遺伝子として *crhbp*、*eno2*、*calb2b* を、ほか脊索に発現する *lgals111*、頭部オー

ガナイザーの *gsc*、頭部神経全体に発現する *satb1a*、耳胞に発現する *stm*、頭部間葉系に発現する *manf* の計 11 遺伝子を選定し、これらの遺伝子破壊体の作成をそれぞれ進めた。その結果、すべての遺伝子に対してゲノム編集活性を有する sgRNA の設計と合成に成功した。これら 11 遺伝子のうち *gsc*、*satb1a*、*acer1*、*diala* の 4 遺伝子に関しては、F1 世代においてフレームシフトを生じるヘテロ接合体の雌雄を得ることに成功し、F2 世代におけるホモ接合体の血管形成に関する表現型の解析を行った。しかしながら、脳血管形成に関して明らかな表現型を得ることはできなかった。また *eng2a*、*manf*、*calb2a*、*crhbp*、*stm*、*eno2* の 6 遺伝子に関しては、F1 世代においてフレームシフトを生じるヘテロ接合体の雌の同定に成功したが、雌雄体がそろわなかったため、現在 F2 世代を飼育し、F3 世代での表現型解析の準備を進めている。一方、*Igals111* に関しては、F1 世代においてフレームシフトを示す個体が同定できなかったため、現在 F0 世代の飼育からやり直しており、今後継続して解析を進めていく。以上 本研究期間内では、対象遺伝子群のゲノム編集活性を有する sgRNA の作成には成功したが、血管形成へ影響を及ぼす表現型の同定にはいっただけであった。

(2) ゼブラフィッシュにおける眼を支配する血管系の解剖を解析するために、受精後 2 日目の胚のイメージングをまず行った。その結果、ゼブラフィッシュにおいても、眼を支配する血管系として、硝子体血管系と毛様血管系の 2 系統が存在し、硝子体血管系は、OA(optic artery)とOV(optic vein)により構成され、一方毛様血管系は、NCA(nasal ciliary artery)とDCV(dorsal ciliary vein)からなる表面血管系とCVP(choroidal vascular plexus)からなる脈絡膜血管系により構成されていることが確認できた(図1参照)。次に血管系で特異的に蛍光を発する遺伝子組み換えゼブラフィッシュ *Tg(flk1:EGFP)k7* の二光子顕微鏡によるタイムラプス観察により、初期の眼を支配する血管系の形成過程を詳細に解析した。結果ゼブラフィッシュにおいては、眼の血管形成は、大きく4つの段階に分けて進行していることが判明した。すなわち、OAとOVが眼胞内に進入して縫合する硝子体血管系の形成段階、PMBC(primitive midbrain channel)からの血管新生により、DCVが形成され、さらにDCVが吻側に伸展してCrDI(cranial division)と吻合し、NCAとなる毛様血管系の表面血管系の形成段階、そしてこれらの2つの血管系が、OVが外側に変位していくことで連結する段階、最後に毛様血管系のCVPが眼球を包んで発達する段階に分けられる。これらの形成過程を、イメージングデータを詳細に解析することにより明らかにし、模式図を作成することで、初期の眼を支配する血管系の形成過程の全容を記載した(図2参

照)。またOVの外側への変位メカニズムを解析するために、樹脂切片の三次元再構築を受精後1日目と2日目の胚に対して行い、結果OAが眼胞の中心に位置しOVが辺縁に位置することで、眼裂が閉鎖する際にOVのみが外側へと変位し、OAは眼胞を貫くことを明らかにした(図3参照)。以上の結果は、国際英文科学雑誌Plos Oneで2017年に発表した。

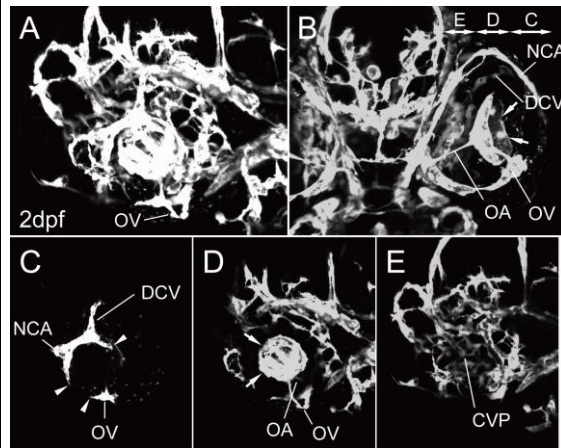


図1 初期の眼を支配する血管系の解剖

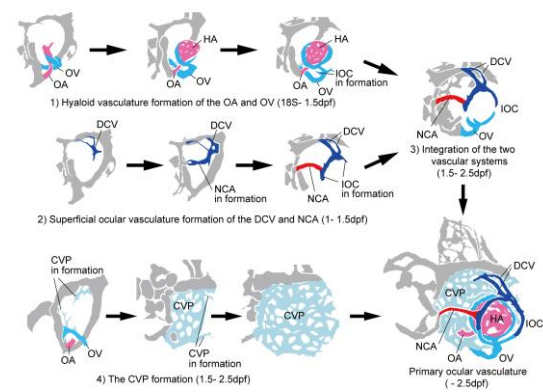


図2 初期の眼を支配する血管系の形成過程

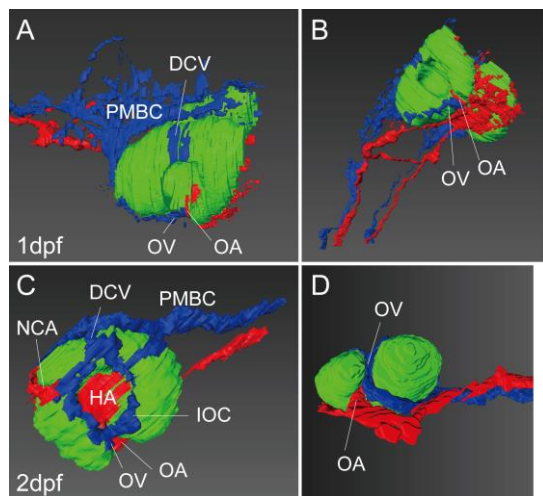


図3 OA、OVと眼裂の位置関係(連続切片の再構築法による解析)

(3) 交尾後 7.5 日目から 8.5 日目の間で取り出したマウス胚子を用いて抗 CD31 抗体により血管系を可視化し、その後 CUBIC 法により透明化処理を施し、共焦点顕微鏡で観察した。その結果、初期の眼の支配する血管系の形成過程を明らかに成功した。マウスにおいては、眼を支配する血管系は、まず表面血管系が原始内頸動脈、CrDI の伸長により形成され、その後脈絡膜血管叢が発達しつつ、その形成過程を詳細に明らかにすることに成功した (図 4 参照)。

マウスとゼブラフィッシュにおける眼を支配する初期血管系の形成過程を比較した場合、完成した血管解剖自体では相同性が高いが、その形成過程や構成する内皮細胞の供給元における相違性が存在することが判明した。すなわちゼブラフィッシュでは、まず硝子体血管系が形成され、続いて毛様血管系の表面血管系、脈絡膜血管叢が形成される。一方マウスでは、まず毛様血管系の表面血管系、脈絡膜血管叢が形成されたのちに硝子体血管系が形成されることが確認された。また内皮細胞の由来に関しても、ゼブラフィッシュでは OA 以外の血管はすべて静脈性の血管床である PMBC に由来しているのに対し、マウスでは初期に形成される表面血管系が CrDI や原始内頸動脈といった動脈性の血管由来である点で異なっていることが判明した。これらの相違性がなぜ生じたのかに関しては、周囲組織との関連性も含めて今後その形成メカニズムとともに解析していく必要がある。

ゼブラフィッシュでは、血管芽細胞分化の上流に位置する *etv2* の組み換え体の観察から、眼胞吻側に位置する血管床と眼胞と耳胞の間に位置する血管床、これら 2 つの独立した血管床から頭部の血管系が構築されることが既に報告されている。我々も彼らと同様の結果を得ており、これらの血管床からの動静脈分化過程を *in situ* hybridization 法により確認している (図 5 参照)。ゼブラフィッシュにおいて報告されているこれらの脳血管系を構築する独立した血管床のうち CrDI と CaDI (caudal division) の分岐部に位置する動脈性の血管床がマウス胚子においても存在している可能性が今回の我々の解析で示唆された (図 6 参照)。現在ゼブラフィッシュ同様にマウス胚子に対するタイムラプス・イメージングを行い、マウス胚子における初期脳血管形成過程の可視化を目指している。以上の結果に関してはまとめて、岩手医学会誌に 2017 年に発表した (2017 年掲載予定)。

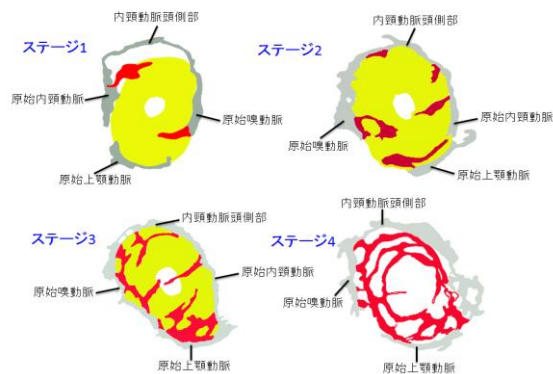


図 4 マウス胚子における眼の表面を栄養する初期血管系の形成過程

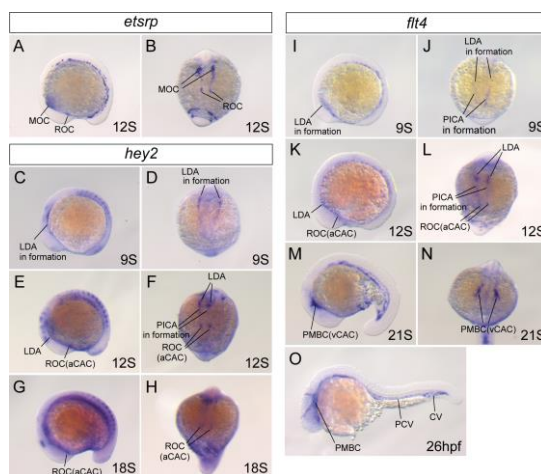


図 5 ゼブラフィッシュ胚における頭部血管系を構築する 2 つの血管床の動静脈分化

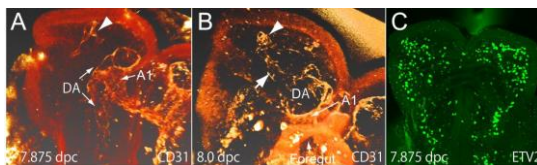


図 6 マウス胚子における頭部の独立した血管床

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

① 清野太郎, 木村英二, 村嶋亜紀, 黒坂大次郎: マウス初期胚の眼球形成領域の血管形成. 岩手医学会誌 査読有 (2017 年掲載予定)

② Hashiura T, Kimura E, Fujisawa S, Oikawa S, Nonaka S, Kurosaka D, Hitomi J: Live imaging of primary ocular vasculature formation in zebrafish. PLoS One 査読有 12 (2017) :e0176456.

doi:10.1371/journal.pone.0176456. eCollection 2017.

〔学会発表〕 (計 7 件)

① 木村英二, 藤澤志津子, 及川里百合, 人見次郎: 眼を支配する初期血管系の形成: 魚類と哺乳類の相違 第 122 回日本解剖学会総

会・全国学術集会、2017年3月28-30日 長崎県・長崎市 口頭発表

山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号：10362518

② 木村英二、橋浦哲哉、藤澤志津子、及川小百合、人見次郎：眼を支配する血管系形成過程のタイムラプス・イメージング法による解析 第39回日本分子生物学会、2016年11月30日-12月2日 神奈川県・横浜市 ポスター

③ 木村英二：ゼブラフィッシュを用いた脳血管形成過程の形態学的解析. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会；2016；福島 招聘講演

④ Kimura E: Vascular morphogenesis between the brain and spinal cord in zebrafish. The 120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomist, 2015/03/21-23. Hyogo・Koube Invited speaker

⑤ Takahashi N, Kimura E, Fujisawa S, Hitomi J: Generation of *tardbp* deficient zebrafish using CRISPR/Cas9 system. The 120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomist, 2015/03/21-23. Hyogo・Koube Poster

⑥ Saito E, Isogai S, Kimura E, Shimoda H, Hitomi J: Novel mechanisms involved in the endothelial differentiation of arteries and veins during vasculogenesis and angiogenesis, 120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomist, 2015/03/21-23. Hyogo・Koube Invited speaker

⑦ Kimura E, Fujisawa S, Koizumi M, Tanifuji G, Hitomi J: Screening of the novel genes associated with vascular morphogenesis by microarray analysis of the *etsrp/etv2* deficient zebrafish. The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014/4/14-17 Kyoto・Kyoto Poster

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 英二 (KIMURA, Eiji)
岩手医科大学・医学部・講師
研究者番号：50405750

(2) 研究分担者

人見 次郎 (HITOMI, Jiro)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：00218728

(3) 連携研究者

川原 敦雄 (KAWAHARA, Atsuo)