

機関番号：84404

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893336

研究課題名(和文) 生体内ライブイメージングによる血管安定化に関わる壁細胞動態の解析

研究課題名(英文) In vivo live imaging-based investigation of mural cell-dynamics involved in vascular stability

研究代表者

安藤 康史(Ando, Koji)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：10736010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：壁細胞とその細胞系譜を観察できる遺伝子改変ゼブラフィッシュを樹立し、生体内で血管への壁細胞動員機構を明らかにした。脳血管では神経堤細胞および中胚葉由来の壁細胞が内皮細胞周囲に出現し、更に内皮細胞間接着部位に沿って移動・増殖し、壁細胞による被覆を拡大させた。体幹部では壁細胞は中胚葉に由来した。壁細胞は大動脈腹側に出現するが、後主静脈には認められなかった。加えて、大動脈腹側に出現した壁細胞の移動と新たな壁細胞の出現は、静脈節間血管に比べて動脈節間血管に優位に認められ、血管形成時に壁細胞は動脈血管に優先的に動員されることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We clarified the mechanism how mural cells (MCs) develop and cover endothelial cells (ECs) by generating the transgenic zebrafish lines that allow live imaging of MCs and by lineage tracing in vivo. To cover cranial vessels, MCs derived from either neural crest or mesoderm emerged around the ECs, proliferated and migrated along EC tubes. During their migration, the MCs moved forward by extending their processes along the inter-EC junctions, suggesting the role of inter-EC junctions as a scaffold for MC migration. In the trunk vasculature, MCs derived from mesoderm covered the ventral side of the dorsal aorta (DA), but not the posterior cardinal vein. Furthermore, the MCs migrating from the DA or emerging around intersegmental vessels (ISV) preferentially covered arterial ISVs rather than venous ISVs, indicating that MCs mostly cover arteries during vascular development.

研究分野：血管生物

キーワード：壁細胞 in vivo イメージング ゼブラフィッシュ

## 1. 研究開始当初の背景

血管全層を構成する細胞としての内皮細胞-壁細胞間相互作用の重要性は、内皮細胞→壁細胞(PDGF-BB); 壁細胞→内皮細胞(Angiopoietin-1)へのシグナルの解明によって明らかにされてきた。壁細胞の欠如は、血管の不安定化、恒常性の破綻を惹起し、遺伝性毛細血管拡張症や癌など様々な血管が病態に関わる疾患の発症・進展と密接に関連する。しかし、100年以上も前に壁細胞が発見されたにも関わらず、如何に壁細胞が血管に動員され、維持されるのかという根源的疑問の解明には十分に至っていない。その原因として、これまで固定した生体組織や *in vitro* の実験系でしか壁細胞を観察できず、生体内における壁細胞の動態を解析する手段が無かったことが挙げられる。この課題を解決するため、申請者はゼブラフィッシュをモデル動物として用い蛍光ライブイメージング技術を駆使することにより、生きた個体内で内皮細胞および壁細胞の挙動を同時にかつ高い時間空間分解能で可視化する技術を確立した。ゼブラフィッシュは胚が透明なため、内皮細胞および壁細胞において異なる蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック(Tg)ゼブラフィッシュ(*Tg(fli1a:mCherry);TgBAC(pdgfrb:EGFP)*)を樹立することにより、生体内で両細胞の挙動を容易に可視化することに成功した。*Tg(fli1a:mCherry);TgBAC(pdgfrb:EGFP)*は *fli1a* プロモーター依存性に mCherry(赤色蛍光)を発現し、さらに BAC クローンを用いた *pdgfrb* (platelet derived growth factor receptor beta)プロモーター依存性に EGFP(緑色蛍光)を発現することで、内皮細胞と壁細胞がそれぞれの蛍光タンパク質によりラベルされる Tg フィッシュである。

## 2. 研究の目的

本研究では“血管内皮細胞および壁細胞の生体内ライブイメージング”により、壁細胞の血管(内皮細胞の管腔外側)への動員メカニズムを明らかにすることを目的とする。申請者は、蛍光イメージング技術とゼブラフィッシュへの遺伝子導入技術を駆使して、生きた個体内で内皮細胞と壁細胞を同時に観察できる Tg ゼブラフィッシュを樹立した。本研究では、この Tg 個体を活用して生きた個体内における壁細胞の発生・増殖・遊走を観察することにより、血管への壁細胞動員様式を明らかにし、さらにその分子制御メカニズムを解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 血管への壁細胞動員様式の解析  
壁細胞可視化 Tg ゼブラフィッシュを用いて、壁細胞の発生・遊走・増殖に着目し、いつ・どの血管へ・どのように壁細胞が動員されるかを共焦点蛍光顕微鏡による経時観察により明らかにしようとした。さらに壁細胞動

態や発生をより詳細に解析できるよう、*TgBAC(pdgfrb:EGFP)*に加えて *pdgfrb* プロモーター依存性に mCherry(赤色蛍光)または Gal4FF(転写因子)を発現する *TgBAC(pdgfrb:mCherry)* または *TgBAC(pdgfrb:Gal4FF)*を新たに樹立した。

① 壁細胞の発生は、壁細胞特異的プロモーター(*pdgfrb* または *transgelin*)下で発現する蛍光タンパク質の発現上昇を指標に判断する(これまでに蛍光タンパク質の発現上昇に伴って壁細胞マーカーである *cspg4* や *acta2* 遺伝子の発現が誘導されることを確認している)。

### ② 壁細胞の細胞系譜解析

(a) Cre-loxP 組み換え法を利用した壁細胞の細胞系譜解析を行う。具体的には *TgBAC(pdgfrb:Gal4FF);Tg(loxP-mVenus-loxP-mCherry)*を樹立し、この Tg と神経堤細胞特異的プロモーター(*sox10*)または中胚葉特異的プロモーター(*tbx6*)下で Cre を発現する Tg との交配を行い、mVenus 陽性の壁細胞の分布を観察した。

(b) *tfap2a* および *foxd3* に対するモルフォリノ(MO)により神経堤細胞由来または *tbx6* および *hand2* に対する MO により中胚葉由来の細胞分化を抑制した際の壁細胞の出現に対する影響を観察した。

③ 壁細胞の増殖は経時観察とともに、細胞周期の可視化プローブである Fucci(Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator)を壁細胞特異的に発現する Tg ゼブラフィッシュを樹立・観察することで、血管への壁細胞の動員における壁細胞増殖の関与を明らかにしようとした。

(2) 発生初期における壁細胞の動員に関わる分子制御メカニズムの解析

① 上述した(1)の観察結果から分子制御機構を推定し、人為的標的遺伝子の機能調節により壁細胞動員に関わる分子メカニズムの解明を目指した。

## 4. 研究成果

### (1) 血管への壁細胞動員様式の解析

#### 脳内血管への壁細胞動員

樹立した内皮細胞・壁細胞を可視化できる *Tg(fli1a:mCherry);TgBAC(pdgfrb:EGFP)*を用いて、脳内血管への壁細胞動員を解析した。まず、脳底に *pdgfrb* 弱陽性の一層の細胞集団が発生初期に生じることが分かった。次に *pdgfrb* 弱陽性の細胞シート上に脳底血管が形成されると、脳底血管を構成する内皮細胞に近接する *pdgfrb* 弱陽性細胞においてのみ *pdgfrb* の発現が上昇し、壁細胞へと分化することが分かった。さらに観察を継続すると、この脳底血管内皮細胞周囲に出現した壁細胞

胞が、連続する内皮細胞に沿って後脳血管へと移動し増殖することにより後脳血管へと動員されることが分かった。さらに *pdgfrb* 強陽性の壁細胞は脳底血管に加えて、CVP (choroidal vascular plexus) 周囲に出現することが分かった。CVP 周囲に生じた壁細胞は同様に連続する血管内皮細胞に沿って移動・増殖することにより、前方の脳血管へと動員されることが分かった。これら壁細胞が脳内血管に動員される時、血管内皮細胞間接着分子である PECAM1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) に EGFP を融合した PECAM1-EGFP を内皮細胞に発現させ、内皮細胞間接着部位と壁細胞を同時観察できる *Tg(fli1a:PECAM1-EGFP);TgBAC(pdgfrb:mCherry)* を用いて経時観察したところ、壁細胞は内皮細胞同士の細胞間接着部位に沿って突起を伸ばし移動する様子が観察され、内皮細胞同士の細胞間接着部位が壁細胞の移動時の足場となる可能性が示唆された。

#### 体幹部の血管への壁細胞動員

体幹部では大動脈および動脈節間血管周囲に *pdgfrb* 強陽性の壁細胞が認められた。経時観察を行ったところ、大動脈腹側に *pdgfrb* 陽性細胞が出現し、受精後 30-48 時間にかけて *pdgfrb* の発現が上昇することが分かった。さらに出現した壁細胞が増殖することにより大動脈の壁細胞による被覆を拡大させることが Fucci バイオセンサ - を用いた解析から分かった。一方、節間血管周囲には 48 時間胚以降に壁細胞が出現し始めた。経時観察を行ったところ、動脈節間血管の壁細胞の被覆は①内皮細胞周囲に新たに出現する *pdgfrb* 強陽性の壁細胞 ②大動脈腹側に生じた壁細胞の移動 ③それらの細胞増殖により起こることが分かった。しかし、体幹部ではこれら大動脈および動脈節間血管周囲に壁細胞が認められるものの、幼生に至る受精後 5 日目になっても後主静脈や尾静脈には *pdgfrb* 強陽性の壁細胞が認められなかった。静脈節間血管には壁細胞が認められるものの、静脈節間血管背側部には動脈内皮細胞が存在し、静脈節間血管に認められた壁細胞は動脈内皮細胞周囲に選択的に存在した。これらの結果は、静脈内皮細胞に比べ、動脈内皮細胞周囲に壁細胞が出現・動員されやすいことを示唆する。脳内血管では壁細胞が内皮細胞同士の細胞間接着部位に沿って突起を伸ばし移動するものの、体幹部の血管では壁細胞の突起進展と内皮細胞間接着部位との位置的相関性は脳血管に比べて低かった。この結果は、壁細胞と内皮細胞の相互作用が組織により異なる可能性を示唆する。

#### 壁細胞の細胞系譜解析

壁細胞は神経堤細胞または中胚葉に由来することが報告されている。一方で、脳血管における壁細胞の起源は、すべての壁細胞が神経堤細胞に由来するのか、または中胚葉由来

の壁細胞が存在するのかは議論が分かれているように、これまでのところ壁細胞の由来は十分に明らかではない。この背景を受け、*TgBAC(pdgfrb:Gal4FF);Tg(loxP-mVenus-loxP-mCherry)* を樹立し、*Tg(sox10:Cre)* または *Tg(tbx6:Cre)* との交配を行い、神経堤細胞または中胚葉に由来する壁細胞を mVenus により可視化し細胞系譜解析を行った。その結果、体幹部の血管 (大動脈腹側および節間血管) および脳底・後脳血管に出現する壁細胞は *Tg(tbx6:Cre)* と交配時にのみ mVenus 陽性となり、中胚葉に由来することが明らかになった。さらに中胚葉マーカー - である *no tail* のプロモーター - 制御下で Cre を発現させた場合も同様の結果が得られた。一方、頭部腹側の血管 (大動脈弓および鰓弓動脈) または前方の脳血管に出現する壁細胞は、*Tg(sox10:Cre)* と交配時にのみ mVenus 陽性となることから、これらの壁細胞は神経堤細胞に由来することが明らかになった。

さらに壁細胞の起源を確認するため、*tfap2a* および *foxd3* に対する MO により神経堤細胞由来または *tbx6* および *hand2* に対する MO により中胚葉由来の細胞分化を抑制した。その結果、Cre/lox システムを用いた細胞系譜解析結果と一致するように、体幹部(大動脈、動脈節間血管)および後脳血管に出現する壁細胞の出現は *tbx6* および *hand2* に対する MO により抑制される一方で、前方脳血管および頭部腹側の血管(大動脈弓、鰓弓動脈)に出現する壁細胞の出現は *tfap2a* および *foxd3* に対する MO により抑制された。これらの結果から、壁細胞のうち体幹部および後脳血管は中胚葉に由来し、前方脳血管および頭部腹側の血管は神経堤細胞に由来することが確かめられた。

#### (2) 発生初期における壁細胞の動員に関わる分子制御メカニズムの解析

上述した(1)の壁細胞動員様式の解析結果から、脳血管および体幹部の血管に共通して、壁細胞の分化が動脈内皮細胞の近傍で誘導されることが分かった。この結果から、動脈内皮細胞との接触依存的に壁細胞の分化が促進される可能性が示唆された。そこで細胞間接着依存的に活性化する Notch シグナルに着目し、壁細胞分化における Notch シグナルの関与をモルフォリノオリゴ(MO)による遺伝子ノックダウンや阻害剤(DAPT)により検討した。*TgBAC(pdgfrb:EGFP)* から EGFP 陽性の壁細胞を含む細胞集団を FACS-aria により回収し、Notch 受容体の発現を定量 PCR により確認したところ壁細胞を含む細胞集団には Notch2 が多く発現するものの Notch1a や Notch1b の発現量は低かった。残念ながら Nothc3 の発現を定量 PCR により検出することは出来なかったが、これまでに in situ hybridization により Nothc3 が壁細胞に発現することが報告されている。この結果に一致し

て DAPT 処理または *notch2* および *notch3* に対する MO 処理により壁細胞の発生が完全に消失したことから、Notch2/3 が壁細胞の分化に必須であることが示唆された。今後はこの阻害効果が細胞自律的なものを移植実験により検討すること、および壁細胞における Notch 依存的な転写活性をモニタ - することにより Notch シグナル依存的な壁細胞発生の証明を試みる。

壁細胞は脳底動脈周囲で出現した後、細胞移動と増殖を経て、脳内血管の壁細胞被覆が完了する。これまで壁細胞における PDGFRb が壁細胞の移動と増殖に極めて重要であることがよく知られている。実際に *pdgfrb* 変異体 (sa16389) ではこれまでの知見と一致するように初期の壁細胞発生は影響を受けないがその後の脳内血管の被覆は認められなかった。さらに細胞移動時の PDGFRb の寄与を示唆する結果として、mCherry を付加した PDGF-B を内皮細胞プロモーター依存的に発現させると、壁細胞移動時にその進行方向の先端で mCherry-PDGF-B(PDGF-BB)の取り込みが認められた。一方、体幹部の血管でも壁細胞数は減少傾向にあったが壁細胞の発生自体は認められた。これらの結果から、内皮細胞から Notch シグナルを受容した前駆細胞が壁細胞へと分化し、その後 PDGFRb を介して、内皮細胞から分泌される PDGF-BB に応答して細胞移動・増殖を行い壁細胞による血管被覆領域を拡大させるものと推測された。

## 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 6 件)

(1) Ando K, Fukuhara S, Izumi N, Nakajima H, Fukui H, Kelsh RN, Mochizuki N. Clarification of mural cell coverage of vascular endothelial cells by live imaging of zebrafish. *Development* **143(8):1328-39. (2016)** 査読有

(2) Fukuhara S, Fukui H, Wakayama Y, Ando K, Nakajima H, Mochizuki N. Looking back and moving forward: recent advances in understanding of cardiovascular development by imaging of zebrafish. *Dev Growth Differ*. **57(4):333-40. (2015)** 査読有

(3) Mikelis C, Simaan M, Ando K, Fukuhara S, Sakurai A, Amornphimoltham P, Masedunskas A, Weigert R, Chavakis T, Adams R, Offermanns S, Mochizuki N, Zheng Y and Gutkind JS. RhoA and ROCK mediate histamine-induced vascular leakage and anaphylactic shock. *Nat. Commun*. **6. (2015)** 査読有

(4) Kashiwada T, Fukuhara S, Terai K<sup>1</sup>, Tanaka T,

Wakayama Y, Ando K, Nakajima H, Fukui H, Yuge S, Saito Y, Gemma A and Mochizuki N. b-Catenin-dependent transcription is central to Bmp-mediated formation of venous vessels. *Development*. **142, 497-509. (2015)** 査読有

(5) Wakayama Y, Fukuhara S, Ando K, Matsuda M and Mochizuki N. Cdc42 mediates Bmp-induced sprouting angiogenesis through Fmnl3-driven assembly of endothelial filopodia in zebrafish. *Dev. Cell*. **32:109-122. (2015)** 査読有

(6) Fukuhara S, Zhang J, Yuge S, Ando K, Wakayama Y, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A and Mochizuki N. Visualizing the cell-cycle progression of endothelial cells in zebrafish. *Dev. Biol*. **393: 10-23. (2014)** 査読有

[学会発表](計 1 件)

Ando K, Fukuhara S, Mochizuki N. Live-imaging of mural cells in zebrafish. Gordon research seminar and conference. Newport, RI, USA. Jul 31-Aug 7, 2015.

[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：  
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

安藤 康史 (Ando Koji)

国立循環器病研究センター - 研究所・流動研究員

研究者番号：10736010