

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：84404

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22122003

研究課題名（和文）ライブイメージングによる血管 - 神経ワイヤリングの誘導・維持機構の解明

研究課題名（英文）Deciphering mechanism underlying neuro-vascular wiring by live-imaging using zebrafish

研究代表者

望月 直樹 (Mochizuki, Naoki)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：30311426

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 96,800,000円

研究成果の概要（和文）：生体機能の調節系には、神経系と血管系が存在する。両者ともに、解剖学的には中枢から抹消に至り、また抹消から中枢に向かうシステムとなっている。生体内で神経と血管が併走していることに生命の意義を見出しその併走メカニズムを探ることを本研究の目的とした。

ゼブラフィッシュの神経系と血管系を同時に可視化することにより、発生時に両者が併走する部位を明らかにした。また、血管が神経を誘導して両者が併走するメカニズムを突き止めた。

研究成果の概要（英文）：Physiological homeostasis of human bodies is mainly regulated by the neural system and the vascular system delivering endocrine hormones. Both systems are consisted of circuits between central to periphery and vice versa. Therefore, neurons and blood vessels are found to exist side by side in certain anatomical regions.

We tried to search for neuro-vascular wiring system in vivo using zebrafish embryos and identified several regions where blood vessels and neurons exhibit parallel growth during embryogenesis. In addition, we demonstrate a mechanism how artery regulate the parallel growth of motor neurons.

研究分野：循環器発生・細胞生物学

キーワード：イメージング 血管 神経 伴走 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

形態形成時には、臓器への酸素供給と神経支配をそれぞれ制御するためのネットワークとして血管-神経が並行して構築される現象(伴走)が見出されている。生体の生理的恒常性を維持するための主たるシステムとして、神経系と血管系がある。神経系も血管系も形成過程で、中枢から抹消へとつらなるヒエラルキーがあるために、両者の形態形成過程で、同時に同じ誘導因子あるいは、どちらか一方が他方を誘導するメカニズムが存在する可能性が示唆されていた。特に神経誘導・反発系である、Slit-Robo, semaphorin-plexin, ephrin-Eph が血管系でも機能していることが細胞レベルでは、証明されつつあり、生体で実際にこのような因子群が両者の走行を規定するかを確認する必要があると考えられた。

血管自身も収縮・弛緩のために直接神経支配を受けることから、伴走とともに血管-神経の相互調節系が機能していると考えられる。しかし、この伴走の成立機構ならびに分子生物学的な相互作用のメカニズムの解明には至っていない。血管-神経の伴走部位をまず同定しないと、どこに焦点をあてて伴走機構を解明するのかさえわかっていない状況であった。このために、まず生体で両者の発生・形成過程を同時に観察し、伴走部位を同定することが本研究の成功の可否を握る大きな鍵となる実験と考えていた。したがって本研究のために既に神経と血管同時可視化を単一個体で行えるゼブラフィッシュを準備していた。

2. 研究の目的

解剖学的な神経 血管の伴走部位をゼブラフィッシュで明らかにすることにより、機能的な伴走機構を解明することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 生体での血管・神経形成時の血管-神経伴走部位の同定を行う：伴走時に血管形成・神経形成のいずれかが先行する場合、あるいは両者が同時に形成される部位があると予想している。両者の形成部位を血管・神経同時可視化ゼブラフィッシュを用いて解剖学的に詳細に調べる。

血管・神経同時可視化トランスジェニックゼブラフィッシュの作製：神経特異的、血管特異的にそれぞれ緑色蛍光蛋白質(EGFP)と赤色蛍光蛋白質(mCherry)を発現するゼブラフィッシュを作製する。

(i) 神経特異的 EGFP 発現ゼブラフィッシュ：HuC プロモーター依存性に EGFP を発現するトランスジェニックライン(HuC:EGFP)と神経特異的 α -tubulin プロモーター依存性に EGFP を発現する(T α 1:EGFP) を既に飼育している。

(ii) 血管特異的に mCherry を発現するゼブラフィッシュ：上記緑色で示される神経走行と同時に血管を描出するために Fli1 プロモーター特異的に mCherry を発現するトランスジェニックライン Fli1:mCherry を飼育している。この両者の交配によって得られるトランスジェニックライン(HuC:EGFP, Fli1:mCherry ダブルトランスジェニック)は図 1 に示すように、同一個体内で血管・神経の走行を可視化できる。3 次元かつ時間軸を加えて生きたまま観察可能であるので血管-神経の伴走部位の同定には欠かせないモデルとなる。血管形成・神経形成のいずれかが先行する、或は血管-神経ネットワークが同時に形成される部位を同定可能である。同時可視化を発生時にタイムラプス観察することで、血管あるいは神経のどちらが先行して形成されるのか？あるいは、同時に形成されるのかを明らかにすることができると考えた。

血管-神経の相互依存性の確認：細胞の運動方向を自由に変えることのできる手法として Klaus Hahn 博士が細胞で確立した photoactivatable Rac1 (PA-Rac1) がある(Nature 461:104, 2009)。まず PA-Rac1 を血管に発現させてゼブラフィッシュに血管走行異常を誘導させることができるかを確認する(図 3)。この後、血管走行異常に引き続いて神経走行異常が起きるのかを確認することにより相互作用の有無を調べることができる。PA-Rac1 のゼブラフィッシュへの導入は既に報告されている(Dev. Cell 18: 226, 2010)。好中球に特異的に PA-Rac1 を発現させて好中球の遊走を photoactivation 依存性に誘導できることも示された。PA-Rac1 を血管特異的に高発現させるためには、Gal4/VP16 をまず血管特異的に発現させ、UAS の下流に PA-Rac1 遺伝子を挿入して転写効率を増加させる系を構築する。

(2) 相互依存性についての分子メカニズム解明：神経 血管が伴走するための両者同時あるいは神経から血管走行誘導、またその逆の誘導因子を同定することを試みる。

既知血管走行制御因子の神経走行への関与を検討する：スフィンゴシン 1 - 燐酸(S1P)トランスポーター(Spns2)の血管・神経走行への関与を変異体あるいはモルフォリンを用いて検討する。

ゼブラフィッシュ神経は EGFP、血管は mCherry でそれぞれラベルするので、FACS を用いて細胞を時期特異的に分取可能である。FACS によって分離した神経細胞・血管細胞の遺伝子発現をマイクロアレイで調べ、時期特異的に発現する分子を同定する。走行に影響しうる分子を選択する。

4. 研究成果

(1) 神経 血管伴走部位の同定

血管可視化のためにさらに Gal4/UAS システムを用いることができる Fli1:Gal4FF トランスジェニックフィッシュも作製した。神経系は Tg(huC:GFP)、血管内皮細胞 Tg(fli1:mCherry) をそれぞれ可視化できるので、両者を交配させて得られた胚で神経と血管をみたところ

(i) lateral line と parachordal vessel の併走

(ii) 鰓蓋の血管を取り巻く神経の存在

(iii) 大動脈の腹側を走行する運動神経の併走

(iv) 脂肪組織に投射する交感神経と血管の一部の併走

を観察することができた。

(2) 上記 (iii) (iv) についての詳細な分子メカニズムの検討を行った。

大動脈腹側には、リンパ管(胸管)が形成されることが報告されていた。このリンパ管の形成には、大動脈から分泌される Vascular endothelial growth factor-C (Vegfc) によるリンパ管内皮細胞表面の Vegfr3 受容体の活性化が重要と思われた。Tg(huc:GFP)で、大動脈腹側に神経が形成されるが、これが運動神経か感覚神経あるいは、交感神経であるかを調べるために、Tg(mnx:egfp 運動神経)で観察したところ、Huc:GFP でみられた神経とほぼ一致する神経形成を認めたことから、同神経が運動神経であることが確認できた。解剖学的には、リンパ管のさらに腹側に運動神経が大動脈、リンパ管と沿うように走行することがわかった。また時間軸で形成過程を観察すると、大動脈形成が運動神経の伸張に先んじること、リンパ管の走行部位の近傍に配置されることから、大動脈からの Vegfc が運動神経の伸張を制御していることが予想された。

このために、運動神経での Vegfr3 の発現を Tg(mnx:GFP)から FACS によって得られた細胞から RNA を精製して調べたところ運動神経が同受容体を発現していることがわかった。さらに、大動脈からの Vegfc による運動神経の Vegfr3 の活性化が両者の併走に必要であるかを、Vegfr3 の細胞外ドメインだけを発現する Vegfc トラップ蛋白質を大動脈で発現して走行に影響が見られるかを検討した。Vegfc トラップの発現により運動神経の大動脈との併走が消失したことから両者の併走に Vegfc-Vegfr3 シグナルが重要であることを明らかにすることができた。

-2 ゼブラフィッシュも生後3週目になると腹部に脂肪細胞の集積を認めるようになる。脂肪の分解にはPKAの活性化によるlipaseの活性化が必要であり、このPKAの活性化は、交感神経に依存していることが報告されていた。本研究では、まず脂肪に投射する交感神経系を dopamine beta hydroxylase プロモータ-(dbh)下流でGal4FFを発現するトランスジェニックフィッ

シュを作製 Tg(dbh:Gal4FF)し、これと Tg(uas:GFP)を交配させることで可視化した。さらに血管は Tg(fli1:mCherry)で可視化できるように、これらをさらに交配させることで交感神経と血管を同時に見る個体を作製した。また、脂肪は BODIPY558/568 で確認した。これにより、血管と併走して脂肪に投射する交感神経と、血管走行とは異なる空間的配置で投射する交感神経系を見出した。交感神経は交感神経鎖から、体節を背側から腹側に向って神経線維を伸張し、腹側に形成された脂肪組織に投射していた。脂肪細胞の形成と血管・神経の形成過程を時間軸で調べたところ、まず脂肪組織が形成され、血管が形成され、これに併走する交感神経が出来上がっていくことを突き止めた。また交感神経活性を可視化するために Tg(uas:GCamp7a)と交配させて、Ca²⁺の増減を交感神経で見ることにより、間接的に交感神経活性を可視化する個体を作製した。さらに、脂肪細胞でPKAの活性化を可視化するために、BACクローンを用いて脂肪組織でPKA活性化可視化プローブを発現するトランスジェニックラインを作製した。

(TgBAC(fabp:Gal4FF);(uas:PKA probe))。これらを交配することにより、交感神経活性化とPKA活性化を同時に可視化することが可能となった。PKA活性化可視化プローブの感度をさらに上げるために、LexOpシステムを利用するための Tg(LexOp:PKA probe)も樹立して、最終的に交感神経と血管配置、さらにPKAの脂肪での活性可視化を同一個体で可能となるラインを作製した。血管が交感神経の走行を規定するメカニズムについては検討中である。

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 15件)

(すべて査読有り)

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.** 2015 Apr 10. doi: 10.1111/dgd.12210.

Mikelis CM, Simaan M, Ando K, Fukuhara S, Sakurai A, Amornphimoltham P, Masedunskas A, Weigert R, Chavakis T, Adams RH, Offermanns S, Mochizuki N, Zheng Y, Gutkind JS. RhoA and ROCK mediate histamine-induced vascular leakage and anaphylactic shock. **Nat Commun.** 2015 Apr 10;6:6725. doi: 10.1038/ncomms7725.

Wakayama Y, Fukuhara S, Ando K, Matsuda M, Mochizuki N. Cdc42 mediates BMP-induced sprouting angiogenesis through Fmnl3-driven assembly of endothelial filopodia in zebrafish. **Dev. Cell** 32:109-22, 2015

Kashiwada T, Fukuhara S, Terai K, Tanaka T, Wakayama Y, Ando K, Nakajima H, Fukui H, Yuge S, Saito Y, Gemma A, Mochizuki N. b-catenin-dependent transcription is central to BMP-mediated formation of venous vessels. **Development**. 2015 Feb 1;142(3):497-509. doi: 10.1242/dev.115576.

Fukui H, Terai K, Nakajima H, Chiba A, Fukuhara S, Mochizuki N. S1P-Yap1 signaling regulates endoderm formation required for cardiac precursor cell migration in zebrafish. **Dev. Cell** 31: 128-136, 2014

Kwon HB, Fukuhara S, Asakawa K, Ando K, Kashiwada T, Kawakami K, Hibi M, Kwon YG, Kim KW, Alitalo K, Mochizuki N. The parallel growth of motoneuron axons with the dorsal aorta depends on Vegfc/Vegfr3 signaling in zebrafish. **Development**. 140(19): 4081-90, 2014

Ando K, Fukuhara S, Moriya T, Obara Y, Nakahata N, Mochizuki N. Rap1 potentiates endothelial cell junctions by spatially controlling myosin II activity and actin organization. **J Cell Biol.** 202(6): 901- 16, 2013

Wakayama Y, Miura K, Hisataka S, Mochizuki N. EphrinA1-EphA2 signal induces compaction and polarization of MDCK cells by inactivating ezrin through negative regulation of RhoA. **J. Biol. Chem.** 286(51): 44243-53, 2011

Nakano A, Kato H, Watanabe T, Min KD, Yamazaki S, Asano Y, Seguchi O, Higo S, Shintani Y, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Kaibuchi K, Mochizuki N, Kitakaze M, Takashima S. AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation. **Nat. Cell Biol.** 12(6): 583-590, 2010

[学会発表](計 20 件)

Koji A, Fukuhara S, Moriya T, Mochizuki N. A Cdc42-MRCK-myosin II signaling axis potentiates endothelial barrier function through formation of

circumferential actin bundles in Rap1 signal-activated endothelial cells. A small GTPase. The 17th International Vascular Biology Meeting. Wiesbaden, Germany. June 2-5, 2012

Nakajima H, Fukuhara S, Mochizuki N. In vivo imaging of YAP dynamics in zebrafish vascular development. The 18th International Vascular Biology Meeting. Kyoto, Japan Apr 14-17, 2014

[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

<http://www.z-cv.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

望月直樹 (Naoki Mochizuki)

国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号: 30311426

(2) 研究分担者

三浦浩一 (Koichi Miura)

国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号: 20360349

中嶋洋行 (Hiroyuki Nakajima)

国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号: 10467657

福井 一 (Hajime Fukui)

国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号: 80551506

高野晴子 (Haruko Takano)

国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号: 40532891