

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08496

研究課題名(和文)脳血管形成と細胞周期の協調的な制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)The cerebral angiogenesis coordinated with the cell cycle in zebrafish

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、血管内皮細胞の核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を用いて二光子顕微鏡によりタイムラプス観察を行い、血管内皮細胞の細胞周期が形態形成と協調的に制御されている可能性を見出した。本研究課題では、細胞周期を可視化するFucciを血管内皮細胞で特異的に発現する遺伝子組み換えゼブラフィッシュを新たに作成し、脳血管形成と細胞周期との協調的な制御メカニズムの解明を目指した。またいくつかの血管新生関連遺伝子を、熱応答反応を用いて異所的な発現を誘導可能な系統の作成も行い、これらの遺伝子が血管内皮細胞の細胞周期へ与える影響についても併せて解析することを目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、複数のFucci発現ラインの作成を行い、またいくつかの血管新生関連遺伝子を、熱応答反応を用いて異所的な発現を誘導する系統の作製に成功した。細胞周期を可視化するFucciの2つのレポーター遺伝子を、2A配列を介して同時に発現する系統では、Gal4-UASシステムを利用しており、Gal4の発現領域を変えることで血管系に限らず様々な組織の発生過程における細胞周期を可視化することが可能である。また血管新生関連因子(vegfa、shh)の発現を、局所的な熱応答反応により時間・空間的に制御可能な系統は、様々な血管系の形態形成過程や動静脈分化プロセスの解析にも利用できる。

研究成果の概要(英文)：We performed time-lapse imaging with a two-photon microscope using the transgenic zebrafish in which the fluorescence of EGFP specifically expressed in the nuclei of vascular endothelial cells, and found that the cerebral angiogenesis might coordinate with the cell cycle during vascular morphogenesis. In this study, we first established the new transgenic zebrafishes in which Fucci reporter genes were specifically expressed in the vascular endothelial cells to visualize the cell cycle in the living embryos, and then analyzed the coordination of the vascular morphogenesis and the cell cycle with time-lapse imaging of the transgenic embryos. Furthermore, we established other transgenic lines in which the expression of angiogenesis related genes, such as vegfa or shh, was spatiotemporally controlled by the irradiation of IR laser, and analyzed the effects of these genes on the cell cycle of vascular endothelial cells.

研究分野：血管発生学

キーワード：血管形成 細胞周期 ゼブラフィッシュ Fucci ライブイメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

血管系の発生過程は大まかに、脈管形成 (*vasculogenesis*) と血管新生 (*angiogenesis*) の二つのプロセスに分けて考えられているが (Risau et al, Nat, 1997)、初期の血管形態がどのようにして構築されるのかは長らく不明のままであった。約 60 年前に Padgett はヒト胎児の連続切片を再構築し脳血管系の動静脈形成過程を詳細に記載した (Padgett DH, Contribution to Embryology 212:207-260, 1948)。しかし連続切片の再構築法では同一個体を連続して観察できず、細かな血管の同定に無理があるなど方法論としての限界が存在する。また Padgett が記載したもっとも早い時期の胎児においてもすでに血管系の形成は進行しており、その全貌を記載することはかなわなかった。我々は、全発生過程が顕微鏡下で観察可能なゼブラフィッシュ (*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・ゼブラフィッシュと二光子顕微鏡によるタイムラプス・イメージング法を組み合わせることで、脳血管系の初期形成過程、眼を支配する初期血管系の形成過程、脳脊髄血管系の連結過程の解明に成功した。これらの研究を行う過程で、我々は血管内皮細胞の核で蛍光を発する遺伝子組み換え体のタイムラプス観察も併せて行い、結果 初期に頭部灌流血液の静脈路として機能する PHBC (primordial hindbrain channel) から後脳実質を貫き脳底動脈へとループしてつながる CtA (central artery) が萌出する直前に、PHBC を構成する内皮細胞の数が劇的に増加する現象を捉えることに成功した (図 1 参照)。このことは血管系がその後の血管新生に先んじて内皮細胞の細胞分裂を進行させている、すなわち血管系の形態形成と細胞周期が協調的に制御されていることを示しており、これを明らかにするために、脳血管形成過程での細胞周期の可視化し、

さらに血管新生関連因子の異所的な発現誘導を行うことで、脳血管形成と細胞周期の協調的な制御メカニズムを解明することが期待された。

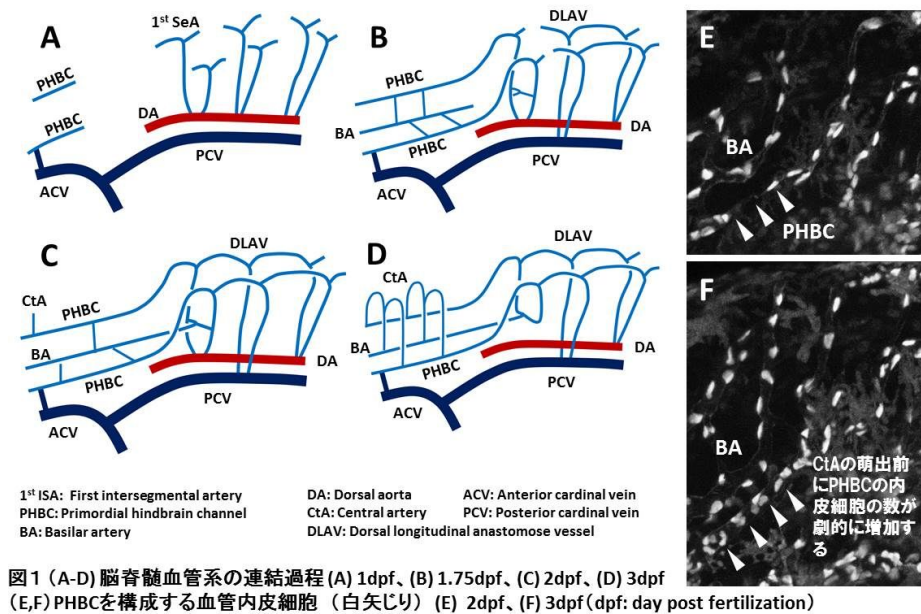


図1 (A-D) 脳脊髄血管系の連結過程 (A) 1dpf、(B) 1.75dpf、(C) 2dpf、(D) 3dpf (E,F) PHBCを構成する血管内皮細胞 (白矢じり) (E) 2dpf、(F) 3dpf (dpf: day post fertilization)

## 2. 研究の目的

我々は、これまでの研究過程で、初期の脳血管系がいかにして構築され、その後 どのようにして椎骨動脈系と統合されるか、その全過程を小型魚類のゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用いて明らかにすることに成功した。そして血管内皮細胞の核で特異的に蛍光を発する遺伝子組み換え体の観察から、血管内皮細胞が形態形成に対応して細胞周期を協調的に制御している可能性を見出した。そこで本研究課題では、細胞周期を可視化する *Fucci* を血管内皮細胞で特異的に発現した遺伝子組み換えゼブラフィッシュを新たに作成・イメージングし、脳血管形成における細胞周期との協調的な制御過程の全容を解明することを目的とした。またいくつかの

血管新生関連遺伝子を対象とし、熱応答反応を用いて異所的な発現を誘導することで、これらの遺伝子が血管内皮細胞の細胞周期へ与える影響についても併せて解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

細胞周期に影響を与えずに 生きたまま個体内で細胞周期を可視化する技術 (*Fucci*) は、理化学研究所の宮脇博士らによって 2008 年に報告された (図 2 参照: Sakaue-Sawano A, et al., *Cell*, 2008)。*Fucci* では、G<sub>1</sub> 期に蓄積するが S/G<sub>2</sub>/M 期に存在しない *Cdt1* 遺伝子と、S/G<sub>2</sub>/M 期に蓄積し G<sub>1</sub> 期には存在しない *Geminin* 遺伝子の配列の一部に蛍光タンパク質をそれぞれ結合することで細胞周期の可視化を達成した。本研究では、血管特異的に遺伝子を発現させる *flk1* 遺伝子の発現調節領域 (プロモーター) の下流に、*Fucci* の各プローブ (*mCherry-zCdt1* と *mVenus-zGeminin*) をつなげて、血管系での細胞周期をリアルタイムで可視化できる遺伝子組み換え体を作成した。また血管新生関連因子の *vegf* と *shh* に着目し、これらの遺伝子の細胞周期への影響を明らかにするために、自己開裂型配列の 2A peptide 配列を介して膜移行シグナルを付加した EGFP とつなげ、熱応答により 2 遺伝子を同時に発現誘導できる組み換え体を作成した。得られた胚を用いて、IR-LEGO 顕微鏡により赤外レーザーを血管周囲の神経組織や脊索に照射することで、局所的な熱応答反応を引き起こし、時間・空間的に制御した異所的な遺伝子発現を誘導することが可能となる (Kimura et al., *ATVB*, 2013)。*Fucci* を共焦点顕微鏡またはライトシート顕微鏡でタイムラプス観察イメージングすることで評価する。

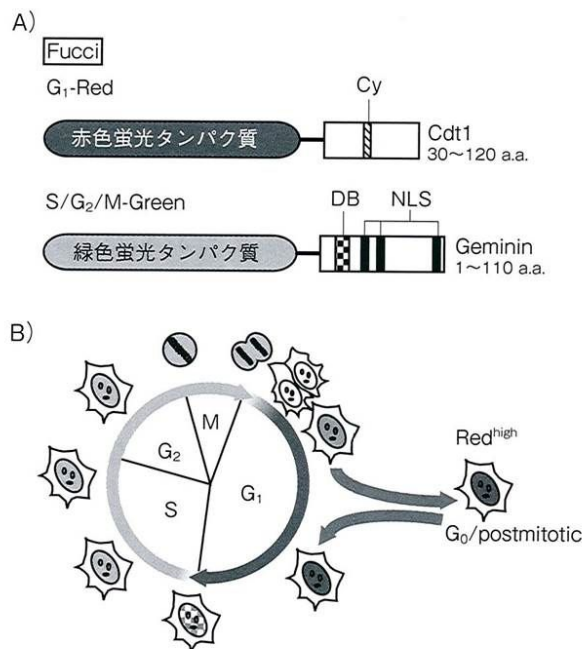


図2 *Fucci*の概略 (実験医学 Vol.30(2):181-190, 2012)

### 4. 研究成果

血管系で特異的に *Fucci* を発現する遺伝子組み換え体の作成では、DNA コンストラクトとして、血管系で特異的に発現を誘導する *flk1* 遺伝子のプロモーターを用いて *Fucci* を直接発現させるもの (*flk1:mCherry-zCdt1*; *flk1:mVenus-zGeminin*) と、Gal4-UAS の系を介したもの (*UAS:mCherry-zCdt1*; *UAS:mVenus-zGeminin*) の計 4 種類を作成し、1 細胞期の受精卵へインジェクションを行った。その結果、*flk1:mCherry-zCdt1* と *flk1:mVenus-zGeminin* では、founder が得られなかったが、Gal4-UAS の系を介したもの (*UAS:mCherry-zCdt1*; *UAS:mVenus-zGeminin*) では、founder をそれぞれで得ることに成功した。そして既に作成してあった *flk1:GFF* (GFF:Gal4 の改変体) の系統と新たに作成した *UAS:Fucci* の系統を交配することで、血管特異的に *Fucci* を発現する系統を作成することに成功した。さらにこの系統の胚をライトシート顕微鏡で観察したところ、細胞分裂期の血管内皮細胞で緑色蛍光が、またそれ以外の細胞周期の血管内皮細胞で赤色蛍光が発現しており、これらの発現が、一部の細胞では発生が進行する過程で切り替わっていることも確認された。しかしながら細胞分裂期に発現を認めるはずの

Geminin に連結した緑色蛍光が、発生が進む過程で発現が消失してしまい十分に観察することができなかった。原因としては、当初の方法では3つの組み換え体が揃ったトリプルトランスジェニック胚を作製する必要があり、すべてのレポーター遺伝子を十分発現している胚の取得が困難であることが原因として想定された。この問題点を解決するために、より効率的に血管系でレポーター遺伝子を発現させ容易にライン化できる強力かつ長さの短いプロモーターの作成を試みた。すなわちこれまで使用してきた *flk1 (kdr1)* のプロモーターの発現調節に関係しない領域を削り 5kbp まで短くしたコンストラクト (*kdr1\_shortP*) を作成した。*kdr1\_shortP:EGFP* を1細胞期の受精卵にインジェクションしたところ非常に高効率でトランジェントでの EGFP の発現が確認できた。また F0 世代のスクリーニングでも 20-30% の高確率で founder が得られた。さらにレポーター遺伝子である *Fucci* の2つのプローブも、自己開裂型の 2A ペプチド配列を利用してつなげること (*mCherry-zCdt1-P2A-mVenus-zGeminin*) で、単一の組み換え体で細胞周期を血管系で可視化し、かつ原則 1:1 で均等にレポーター遺伝子の発現が誘導される系統の作成を目指した。研究期間内では、この DNA コンストラクトを新たに作成し、受精卵へのインジェクションを行いトランジェントでの血管特異的な *Fucci* の発現を確認するところまで成功しており、現在 founder 同定のために F0 世代のスクリーニングを進めている。founder が同定され次第、タイムラプス・イメージングにより初期の血管形成と細胞周期の協調的な制御システムを可視化してその詳細を明らかにする。

一方、熱反応で遺伝子誘導可能な DNA コンストラクトの作成では、*hsp* の発現制御領域下流に、膜移行シグナルを付加した *EGFR(EGFPCAAX)* と P2A 配列を介して各血管新生関連因子(*vegfa*, *shh*, *mCherryCAAX* (control 用)) の cDNA 配列をつなげたコンストラクトの作成を行った。作成した DNA コンストラクトを受精卵にインジェクションし、F0 世代のスクリーニングを行い、3系統(*hsp:EGFPCAAX-P2A-mCherryCAAX*, *hsp:EGFPCAAX-P2A-vegfa*, *hsp:EGFPCAAX-P2A-shha*) すべてで founder を得ることに成功した。今後 *Fucci* の系統が作成され次第、IR-LEGO 顕微鏡により血管周囲の神経組織や脊索で異所的な発現誘導を行い、その後の細胞周期への影響を評価していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 齋藤美帆, 木村英二, 人見次郎	4. 巻 70
2. 論文標題 マウス胚の頭部初期血管系の形成過程の形態学的解析	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 岩手医学会誌	6. 最初と最後の頁 91-99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashiura T, Kimura E, Fujisawa S, Oikawa S, Nonaka S, Kurosaka D, Hitomi J	4. 巻 12
2. 論文標題 Live imaging of primary ocular vasculature formation in zebrafish	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0176456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0176456. eCollection 2017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村 英二
2. 発表標題 脳脊髄血管系をつなぐ内皮細胞の起源
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金澤 潤、燕 軍、木村 英二、人見 次郎
2. 発表標題 肺分葉異常の2例
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村嶋 亜紀、及川 小百合、木村 英二、人見 次郎
2. 発表標題 薬剤誘導型遺伝子改変マウスを用いた頭部血管発生機構の解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Bo-Tsung Wu, Shih-Hsien Wen, Yasuhiro Kamei, Atsuko Shimada, Hiroyuki Takeda, Eiji Kimura, Yung-Shu Kuan
2. 発表標題 Zebrafish habenula neurogenesis requires ngn1 cell-autonomously.
3. 学会等名 the 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2017年

〔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
研究 分担 者	人見 次郎  (Hitomi Jiro)  (00218728)	岩手医科大学・医学部・教授    (31201)	