

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16499

研究課題名（和文）Angiopoietin/Tie1による初期リンパ管新生制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Regulation of primary lymphangiogenesis through Angiopoietin/Tie

研究代表者

諸岡 七美（Morooka, Nanami）

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：40817110

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、ゼブラフィッシュ変異体の解析により、受容体型チロシンキナーゼTie1が、初期リンパ管新生、特に静脈内皮細胞の分化・増殖・遊走に重要であることを明らかにした。また、ライブイメージングによって、Tie1が静脈内皮細胞の核を含めた細胞全体の運動能の獲得に必須である可能性を新たに見出した。さらに、ゼブラフィッシュのAngiopoietin1がTie1と結合しシグナルを伝達すること、また、Tie1の下流で複数のリンパ管関連因子や遊走関連因子が制御されることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発生期において機能的なリンパ管が形成されるためには、複数のシグナル経路によって内皮細胞の応答が調節されることで、形態形成が精密に制御される必要がある。本研究では新たに、初期リンパ管新生におけるAngiopoietin/Tie1シグナル特有の細胞応答や、その下流で制御される新たな因子についても明らかにすることができ、リンパ管形成機構についての新たな知見を得ることができた。また、この知見は発生期だけでなく、成体や病的環境におけるリンパ管形成・維持にも応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：By analyzing zebrafish mutants, we found that the receptor tyrosine kinase Tie1 is important for the primary lymphangiogenesis, especially for the lymphatic differentiation, proliferation, and migration of venous endothelial cells. Live imaging analysis showed that Tie1 is essential not only for forming protrusions of an endothelial cell but also for motility of an entire cell, including cell nucleus, towards the migration direction. In vitro analysis suggest that zebrafish Tie1 is activated by Angiopoietin1. Furthermore, we clarified novel factors for lymphangiogenesis and migration controlled under Angiopoietin/Tie signaling.

研究分野：血管・リンパ管生物学

キーワード：リンパ管 Angiopoietin/Tie 血管

1. 研究開始当初の背景

リンパ管は全身に張り巡らされた脈管器官で、組織において毛細血管から漏出した組織液のうち、余剰分を再吸収・排出し血管系へと戻す。また、リンパ管は腸管での脂肪成分の吸収や、免疫細胞の循環経路として働くことも知られている。

哺乳類のリンパ管の発生は大きく二つの段階を経て進行する(図1)。まず、主静脈の一部の細胞が、転写因子 Prox1 陽性のリンパ管内皮細胞へと分化し、これが静脈から出芽して全身へと遊走することで、初期のリンパ管構造である原始リンパ叢が形成される(初期リンパ管新生)。その後、原始リンパ叢のリモデリング(二次的リンパ管新生や融合・剪定)が起こることで成熟し、全身に機能的なリンパ管ネットワークへと形成される。初期のリンパ管新生には、受容体型チロシンキナーゼ Vascular Endothelial

Growth Factor Receptor (VEGFR) 3 と、そのリガンドである VEGF-C が関与することが報告されていた(Karkkainen et al., 2004, Nat. Immunol.)。一方で、別の受容体型チロシンキナーゼである Tie (Tie1 および Tie2) と、リガンド Angiopoietin (哺乳類では Ang1-4 が存在する)も、リンパ管発生に必須のシグナルとして知られてきた。中でも Tie1 と Ang2 はマウスにおいて、リンパ管発生中期以降に起こるリモデリング過程に重要であることが報告されていた(Dellinger et al., 2008, Dev. Biol.; Shen et al., 2014, Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.)。一方、初期リンパ管新生における Ang/Tie の役割は、Ang1 や Tie2 のノックアウト(KO)マウスが、リンパ管発生が開始する前に心血管に異常をきたして胎生致死となり、解析不可能なため十分に検討されてこなかった。

ゼブラフィッシュは、胚が透明でイメージングに適した脊椎動物であることから、リンパ管発生を研究するための主要なモデル生物として位置付けられている。ゼブラフィッシュの初期リンパ管新生においても、マウスと同様に、後主静脈の内皮細胞が Prox1 陽性細胞へと分化し、静脈から出芽する。しかしマウスとは異なり、後主静脈からの出芽のうち約半数のケースでのみ、出芽細胞が背側に遊走して脊索傍のリンパ管を形成し、残り半数のケースでは、出芽細胞が節間動脈に吻合して、節間静脈を形成する(図2)。この過程には、VEGF-C/VEGFR-3 が必須であることが報告されていた(Shin et al., 2016, Development)。一方で我々は、ゼブラフィッシュ Ang/Tie 遺伝子のうち、マウスにおいてリンパ管・血管発生に関与する遺伝子 (*ang1*, *ang2a*, *ang2b*, *tie1*, *tie2*) の KO fish の作製および、網羅的な解析を行ったところ、*ang1* および *tie1* の KO fish で後主静脈からの出芽が減少し、その結果、リンパ管の形成が抑制されることを新たに見出していた(図2)。この結果は、Ang/Tie シグナルがゼブラフィッシュの初期リンパ管新生に必須の役割を果たすことを示している。KO マウスの場合とは異なり、全ての Ang および Tie の KO fish は、リンパ管発生期において生存可能であったことから、リンパ管新生メカニズムを Ang/Tie シグナルを含めて正確に理解するためには、ゼブラフィッシュを用いた研究がより有用であると考えた。

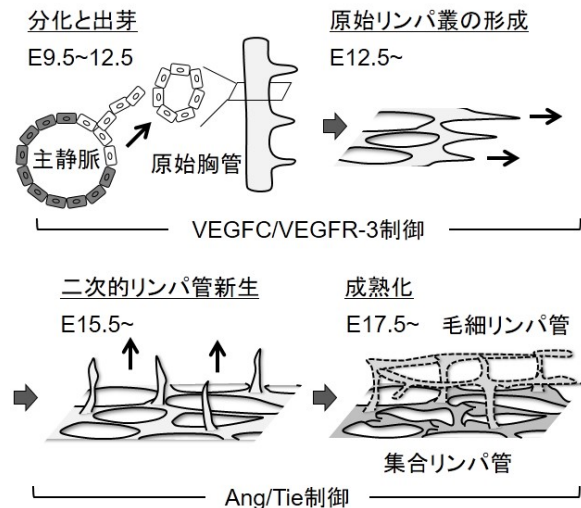
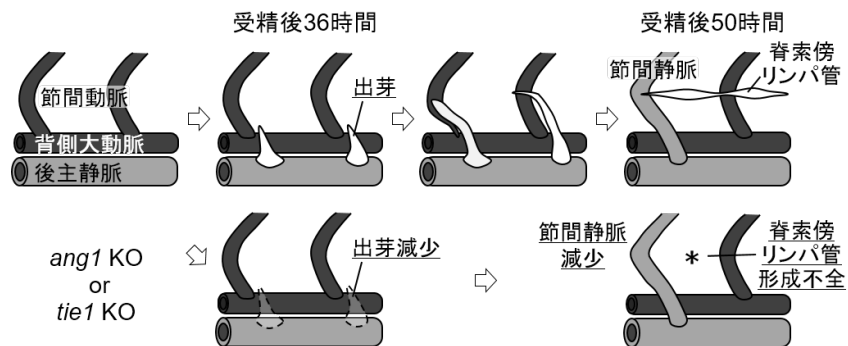


図1 哺乳類リンパ管の発生過程

図2 ゼブラフィッシュの初期リンパ管新生と、*ang1* KO, *tie1* KO fish の表現型



2. 研究の目的

発生初期のリンパ管新生では、既存の静脈から一部の細胞がリンパ管内皮細胞へと分化し、出芽が起きる。しかし、安定型の静脈内皮細胞が、出芽型のリンパ管内皮細胞へと誘導されるメカニズムは正確には解明されていない。我々はゼブラフィッシュ変異体の解析から、初期のリンパ管新生に Ang/Tie が重要であることを見出した。しかし、Ang/Tie シグナルが、どのように出芽型リンパ管内皮細胞

を誘導するかについては全くわかっていなかった。そこで本研究では、リンパ管新生における Ang/ Tie シグナルの役割を明らかにすることで、出芽型のリンパ管内皮細胞が誘導されるメカニズムを明らかにできるのではないかと考えた。まず、(1) Tie1 によってどのような細胞応答が制御されるか明らかにする。次に、(2) ゼブラフィッシュ Tie 受容体がシグナル伝達を誘導するかを明らかにするため、そのリガンドおよびリン酸化の有無を明らかにする。さらに、(3) Tie1 の下流で調節されるシグナルを明らかにすることで、Ang/Tie シグナルがどのようにして出芽をコントロールするのかを明らかにする。これらを明らかにすることによって、初期のリンパ管新生において、安定型の静脈内皮細胞が、出芽型のリンパ管内皮細胞へと誘導されるメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

課題(1)では、リンパ管の発生過程を生きたまま観察することのできる、ゼブラフィッシュの利点を活かして、ライブイメージング観察をおこない、Tie1 によって制御される静脈内皮細胞の細胞応答を詳細に解析した。課題(2)では、ゼブラフィッシュにおける Ang/Tie の結合特異性を調べるために、培養細胞にゼブラフィッシュの Ang および Tie の組換え蛋白質を発現させ、プルダウンアッセイによって各 Ang-Tie 間の相互作用の有無を検討した。また、培養細胞に Tie 受容体を強制発現させ、Ang を作用させることで、Tie 受容体のリン酸化が起こるかを検討した。さらに、*ang1, ang2a, ang2b* のトリプル KO fish を作製し、*in vivo* での確認もおこなった。課題(3)ではまず、ゼブラフィッシュのリンパ管発生に関わることが知られているシグナル分子や転写因子について、免疫染色での比較をおこなった。さらに、野生型および *tie1* KO fish の内皮細胞を単離し、RNA シークエンスをおこない、Tie1 の下流で制御される因子の探索をおこなった。

4. 研究成果

我々は、ゼブラフィッシュを用いた変異体の解析により、*tie1* KO fish の体幹部において、リンパ管形成不全が認められること、その原因として、後主静脈からの出芽が減少することを見出していた。そこでまず、これらについて定量的な解析をおこなった。野生型では、受精後 5 日目胚における体幹部リンパ管の形成率は 100%であった。これに対し、*tie1* KO fish では 10%程度のリンパ管形成率に留まった。また、全ての KO 個体が腸・心臓・目の周囲に浮腫が認められた。次に、発生を遡り、受精後 2 日目胚の解析をおこなうと、後主静脈からの出芽数の優位な減少が認められ、その結果として、リンパ管の前駆構造である脊索傍のリンパ管形成率の減少、および、節間静脈の形成不全が優位に認められることを確認した。もう一つの Tie 受容体である Tie2 の関与を調べるために、*tie1, tie2* ダブル KO fish の解析もおこなったが、その表現系は *tie1* 単独 KO と差が認められなかったことから、ゼブラフィッシュ体幹部の初期リンパ管新生は、Tie1 によって制御されることが明らかとなった。

(1) Tie1 による細胞応答の解析

Tie1 によってどのような細胞応答が制御され、初期リンパ管新生が誘導されるかを調べるために、ライブイメージングを駆使して時空間的に詳細な解析をおこなった。後主静脈からの出芽が生じる受精後 36~56 時間胚のタイムラプス観察をおこなうと、野生型では、受精後 50 時間前後で、内皮細胞が背側へ突起を伸ばし、その核も背側へと遊走するのに対し、*tie1* KO の静脈内皮細胞は、背側へ突起を伸ばすにも関わらず、ほとんどの核が後主静脈に留まることを発見した(図3)。これは、VEGFR3 のノックダウン個体において、静脈内皮細胞の突起が全く認められないこととは、異なる細胞応答であった(図3)。*tie1* KO fish では、出芽が開始から 5 時間の間で、先導細胞の移動距離と速度が優位に減少していたことから、Tie1 が静脈内皮細胞の遊走を、VEGF-C/VEGFR3 とは異なる様式で制御する可能性を示すことができた。また、静脈から背側へ出芽する内皮細胞数、および分裂回数も優位に減少したことから、Tie1 は静脈内皮細胞の増殖を制御することも明らかとなった。

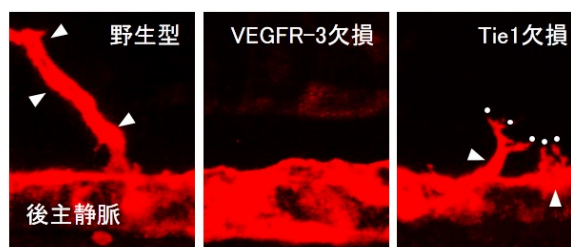


図3 ゼブラフィッシュ体幹部のリンパ管新生(48時間胚) 野生型は内皮細胞(矢頭)が出芽・遊走するのに対し、VEGFR-3欠損個体では出芽は全く見られない。Tie1欠損個体では内皮細胞が突起(丸印)を出すが出走しない。

(2) ゼブラフィッシュ Tie1 のリガンドおよびリン酸化の解析

Tie 受容体は Ang ファミリー分子の結合により、細胞外刺激を細胞内に伝達する。しかし、哺乳類の Tie1 は Ang1, Ang2 どちらとも結合せず、シグナル伝達の直接の担い手ではないとされてきた。そこで、ゼブラフィッシュの Tie1 (*zTie1*) が、リガンド(*zAngs*) と結合するか調べるために、*zAngs, zTies* の組換え蛋白質を作製し、プルダウンアッセイをおこなった。その結果、*zTie1* は *zAng1, 2a, 2b* の中でも、*zAng1* と特異的に結合することが明らかとなった。また、*zTie1* を強制発現させた細胞に、Ang マルチマーである COMP-Ang1 を作用させると、*zTie1* がリン酸化されたことから、ゼブラフィッシュの Tie1 は受容体型チロシンキナーゼとして働く可能性を示すことができた。

確かに、*in vivo*においても、*ang1* KO fish が胸管形成および後主静脈からの出芽に異常を示し、*ang1*, *ang2a*, *ang2b* のトリプル KO fish は、単独 KO fish と同様の表現系を示したことから、ゼブラフィッシュでは、Ang1によってTie1が活性化し、リンパ管発生を制御すると考えられる。

(3) Tie1 の下流因子の探索

ゼブラフィッシュ体幹部の初期リンパ管新生には、VEGF-C/VEGFR3 の下流で ERK のリン酸化が誘導されることが報告されていた(Shin et al., 2016, Development)。そこで、phospho-ERK の免疫染色をおこなった結果、*tie1* KO fish でも ERK のリン酸化が減少することが明らかとなった。また、野生型個体に MEK inhibitor である SL327 を低濃度で作用させると、*tie1* KO fish と類似した出芽不全を示すことも確認した。さらに、ERK の下流で制御されることが知られる、転写因子 Prox1 の蛋白質発現も *tie1* KO fish で優位に減少することが分かった。これらの結果は、Tie1 の下流で MAPK 経路が調節される可能性、および、Tie1 が Prox1 の発現調節を介してリンパ管の分化を制御する可能性を示唆している。

さらに我々は、Tie1 の下流で制御される新たな因子を探索するために、*tie1* KO fish の内皮細胞を単離して、RNA シークエンスを実施した。その結果、複数の静脈・リンパ管関連因子、および、遊走、増殖関連因子が減少することが明らかとなった。

本研究の成果によって、異なるシグナル経路が異なる細胞応答を制御することで、初期リンパ管新生が精密に制御される可能性を示すことができた。さらに、静脈内皮細胞の分化・遊走・増殖を誘導するための、新たな分子メカニズムを明らかにできた。本研究の結果をもとに更なる研究を進めることで、初期リンパ管新生の理解と発展に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 諸岡 七美, 中嶋 洋行, 望月 直樹
2. 発表標題 ゼブラフィッシュのリンパ管発生におけるAngiopoietin/Tieシグナルの役割
3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 諸岡七美
2. 発表標題 リンパ管発生におけるAngiopoietin/Tie シグナルの役割
3. 学会等名 第6回 血管生物若手研究会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------