

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670107

研究課題名(和文)血管内皮細胞とペリサイトの双方向性シグナルによる血管機能制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of vascular functions by bi-directional signaling between endothelial cells and pericytes

研究代表者

福原 茂朋 (FUKUHARA, SHIGETOMO)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：70332880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生きたまま内皮細胞と壁細胞(ペリサイト・血管平滑筋細胞)をライブで可視化できるゼブラフィッシュを樹立し、壁細胞が内皮細胞を被覆し血管機能を制御する機構について解析した。その結果、壁細胞は、動脈内皮細胞からのシグナルによって動脈血管周囲で発生し、その後、血管上を移動しながら活発に増殖することで血管全体を被覆することが示された。また、壁細胞の遊走・増殖にはPlatelet-derived growth factorシグナルが関与することが示唆された。さらに、系譜解析から頭部血管を被覆する壁細胞は神経堤細胞と中胚葉、体幹部の血管を被覆する壁細胞は中胚葉に由来することが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanism by which mural cells (MCs) such as pericytes and vascular smooth muscle cells develop and cover endothelial cells (ECs) to regulate vascular stability and homeostasis by generating transgenic zebrafish lines that allow live imaging of MCs and by lineage tracing in vivo. MCs developed around the preformed arterial EC tubes possibly by arterial EC-derived signal. Subsequently, these nascent MCs actively proliferated and migrated along the EC tubes to cover entire vessels in response to platelet-derived growth factor signaling. The MCs covering the cranial vessels were derived from either neural crest cells or mesoderm, while those covering the vessels in the trunk were derived from mesoderm. Thus, live imaging and lineage tracing successfully enabled us to clarify precisely how MCs cover the EC tubes and to identify the origins of MCs.

研究分野：血管細胞生物学

キーワード：ペリサイト 血管内皮細胞 シグナル 壁細胞 血管機能

### 1. 研究開始当初の背景

血管は、内腔に一層のシートを形成する血管内皮細胞とその内皮細胞シートを被覆する壁細胞（ペリサイトや血管平滑筋細胞）により構成されている。細動脈、毛細血管、細静脈などの比較的細い血管では、ペリサイトが血管内皮細胞に直接接着している。これら血管では、血管内皮細胞とペリサイトが双方向性にシグナルを伝達し（ペリサイト→内皮細胞、内皮細胞→ペリサイト）、血管成熟化および血管機能を制御している。しかし、ペリサイトがどこから発生し、如何に血管を被覆するのか、また、内皮細胞とペリサイトの双方向性シグナルが、如何に血管成熟化・血管機能を制御しているのかという疑問については不明な点が数多く残されている。その主な原因として、生体内における内皮細胞とペリサイトをライブで直接観察し、これら細胞の動態を解析する手段が皆無であったことが挙げられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、ゼブラフィッシュをモデル動物として用い、蛍光イメージング技術を駆使して、生きたまま生体内の内皮細胞及び壁細胞（ペリサイト・血管平滑筋細胞）の動態を観察できる系を開発する。それにより、内皮細胞とペリサイトの双方向性シグナルが血管成熟化を誘導し、血管機能を制御する分子メカニズムの解明を目指す。また最近、血管新生におけるペリサイトの役割が示唆されている。そこで、内皮細胞とペリサイトの双方向性シグナルが血管新生を制御するメカニズムについても明らかにする。この研究目標を達成するため、本研究では主に以下の3点に焦点を当てて解析を行う。

- (1) 生体における血管内皮細胞と壁細胞（ペリサイト・血管平滑筋細胞）の挙動をライブイメージングにより解析
- (2) ペリサイト由来シグナルが血管構造の安定性及び血管新生を制御する分子機序の解析
- (3) 内皮細胞由来シグナルがペリサイトの機能を制御する分子機序の解析

### 3. 研究の方法

- (1) トランスジェニックゼブラフィッシュの樹立  
ゼブラフィッシュを用いた動物実験は、独立行政法人国立循環器病研究センターの実験動物委員会での承認を受け、当センターの動物実験の指針を順守して実験を遂行した。トランスジェニック（Tg）ゼブラフィッシュは、遺伝研の川上浩一博士らが開発した Tol2 転移システムを用いて樹立した。

ペリサイトで GFP、mCherry および

Gal4FF（Gal4 の DNA 結合領域と Herpes simplex virus protein 16 由来転写活性化ドメインの融合タンパク質）を発現するゼブラフィッシュを樹立するため、*pdgfr* 遺伝子を含む BAC クローン（CH1073-606116）を BacPac resources より入手し、BAC recombineering 技術を用いて、*pdgfr* の ATG の下流に上記タンパク質をコードした遺伝子を挿入した。その後、ベクターに Tol2 配列を挿入後、Tol2 トランスポゼース mRNA とともにゼブラフィッシュの受精卵にインジェクションし、ペリサイトで GFP、mCherry、Gal4FF を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ *TgBAC(pdgfrb:GFP)*、*TgBAC(pdgfrb:mCherry)*、*TgBAC(pdgfrb:*

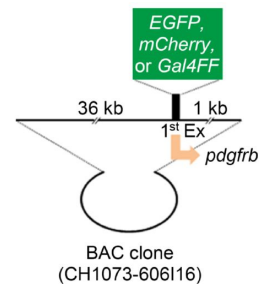


図1 壁細胞を可視化するゼブラフィッシュの樹立

*Gal4FF*)を樹立した（図1）。

- (2) ゼブラフィッシュ胚の in vivo イメージング解析  
ゼブラフィッシュ胚を 0.016%トリカインで麻醉し、1%低融点アガロースの入った 35 mm glass-base ディッシュにマウントした。ディッシュを 0.016%トリカイン入り E3 胚培地で満たし、オリンパス FV1000/FV1200 共焦点蛍光顕微鏡を用いてイメージング解析を行った。
- (3) モルフォリノオリゴによる遺伝子ノックダウン  
下記モルフォリノオリゴ（MO）を、1細胞期受精卵にインジェクションし、標的遺伝子をノックダウンした。*tnn2a* (2 ng)、*foxd3* (4 ng)、*tfap2a* (4 ng)、*tbx6* (5 ng)、*hand2* (5 ng)。
- (4) ペリサイトの系譜解析  
ペリサイトの起源を解析するため、神経堤細胞で Cre リコンビナーゼを発現する *Tg(sox10:Cre)*、中胚葉細胞で Cre リコンビナーゼを発現する *Tg(tbx6:Cre)* を使用した。具体的には、*TgBAC(pdgfr:Gal4FF);Tg(UAS:loxP-mCherry-loxP-mVenus)* と上記 Cre リコンビナーゼ発現ゼブラフィッシュを交配し、神経堤細胞および中胚葉由来ペリサイトを同定した（図2）。

TgBAC(*pdgfrb:Gal4FF*)  
;Tg(UAS:*loxP-mCherry (mC)*-*loxP-mVenus (mV)*)

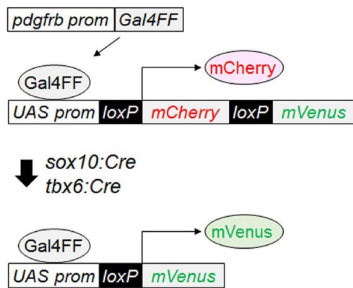


図1 ペリサイトの系譜解析

#### 4. 研究成果

(1) ペリサイト・血管平滑筋細胞のライブイメージングを可能にするゼブラフィッシュの樹立

これまでに Platelet-derived growth factor (Pdgf) のβ型受容体 (Pdgfrb) がペリサイトおよび血管平滑筋細胞に発現することが知られている。そこで、*pdgfrb* プロモーター制御下で GFP、mCherry、Gal4FF を発現する *TgBAC(pdgfrb:GFP)*、*TgBAC(pdgfrb:mCherry)*、*TgBAC(pdgfrb:Gal4FF)*; *Tg(UAS:GFP)* ゼブラフィッシュを樹立した(図1)。これらゼブラフィッシュの幼魚および稚魚の血管を観察したところ、血管周囲で蛍光タンパク質を発現する細胞が確認できた。また、これら蛍光タンパク質発現細胞を FACS により単離し、RT-PCR 解析を行ったところ、これら細胞にはペリサイトおよび血管平滑筋細胞のマーカー遺伝子が発現していることが分かった。これにより、生体内のペリサイトおよび血管平滑筋細胞を蛍光タンパク質で可視化できる

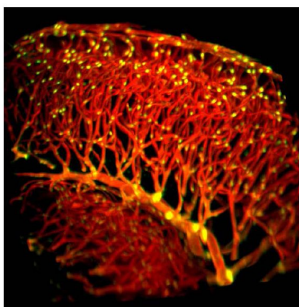


図3 ゼブラフィッシュの脳血管  
緑：ペリサイト、赤：内皮細胞

ゼブラフィッシュの樹立に成功した。

(2) ペリサイトが頭部血管を被覆するメカニズム

*TgBAC(pdgfrb:GFP)* と血管内皮細胞 Myr-mCherry を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュのライブイメージングを行い、頭部血管を被覆する壁細胞がどのように発生し、どのように内皮細胞を被覆するのかライブイメージングにより解析した。その結果、36 hpf (hour post-fertilization) の時期に、脳実質外に存在する脳底動脈周囲で壁細胞が発生することが分かった。これら GFP 陽性細胞は、血管平滑筋細胞を可視化す

る *TgBAC(tagln:GFP)* では観察できなかったことから、血管平滑筋細胞でなくペリサイトであることが示された。また、脳底動脈周囲で発生したペリサイトは、60 hpf の時期に内皮細胞上を移動することで脳実質内に進入し、また、その過程で活発に増殖することで中脳動脈を被覆することが分かった。120 hpf のステージでは、壁細胞は動きを止め、中脳動脈全体を取り巻いていたことから、中脳動脈を被覆するペリサイトの発生は 120 hpf までに完了することが分かった。

血管内皮細胞から産生された Pdgf は、ペリサイトに発現する *Pdgfrb* を活性化することで、ペリサイトの血管周囲への動員に関与することが示唆されている。そこで、*Pdgfrb* の変異体ゼブラフィッシュ (*sa16389*) を用いて、ペリサイトの頭部血管周囲への動員に *Pdgf/Pdgfrb* シグナルが関与するか検討した。その結果、*Pdgfrb* 変異体ゼブラフィッシュでは、脳室外の脳底動脈周囲におけるペリサイトの発生は正常であったのに対し、その後のペリサイトの脳室内への移動と増殖が阻害されており、その結果として中脳動脈を被覆するペリサイトの数が減少した。以上の結果から、*Pdgf/Pdgfrb* シグナルはペリサイトの発生には必要ないが、その後のペリサイトの遊走と増殖に関与することが分かった。

内皮細胞で細胞間接着をマークする *Pecam1-GFP* を発現し、ペリサイトで mCherry を発現するゼブラフィッシュのライブイメージングを行うことで、ペリサイトが頭部血管上を移動するときの細胞動態を解析した。その結果、ペリサイトが頭部血管上を移動する際、内皮細胞間接着上を移動することが分かった。具体的には、ペリサイトは内皮細胞の細胞間接着部位に沿って突起を伸ばすこと、また、その突起の一部が内皮細胞の細胞間接着部位上で広がり足場となる接着構造を形成すること、そして、ペリサイトはその構造を足場に細胞体を移動させることが分かった(図4)。現在、ペリサイトが内皮細胞の細胞間接着部位を移動するメカニズムと意義について解析を進めている。

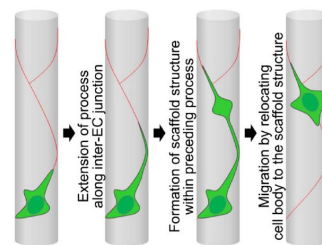


図4 ペリサイトが血管上を移動するメカニズム

(3) 血管平滑筋細胞が体幹部の大血管を被覆するメカニズム

壁細胞が体幹部の大血管(背側大動脈および後主静脈)を被覆する様子を *TgBAC(pdgfrb:GFP)* ゼブラフィッシュのライブイメージングにより解析した。その結果、36 hpf の時期

に背側大動脈の腹側で GFP 陽性の細胞が出現すること、また、これら細胞はその後、活発に増殖・遊走することで背側大動脈全体を被覆することが分かった。また、これら細胞は、血管平滑筋細胞を可視化する *TgBAC (tagln:GFP)* ゼブラフィッシュでも GFP 陽性として認められたことから血管平滑筋細胞であることが分かった。しかし、少なくとも 7 dpf (7 day post-fertilization) までの時点では、後主静脈周囲における壁細胞の発生は観察されなかった。このことから、体幹部の大血管を被覆する血管平滑筋細胞は、背側大動脈周囲で発生することが示唆された。また、Vegf の受容体である *kdr1/kdr* を MO によりノックダウンし背側大動脈の形成を阻害すると大血管周囲における血管平滑筋細胞の発生が抑制された。以上の結果から、背側大動脈の動脈内皮細胞が背側大動脈周囲における血管平滑筋細胞の発生を制御していることが示唆された。

#### (4) 壁細胞が節間血管を被覆するメカニズム

*TgBAC(pdgfrb:GFP);Tg(fli1a:Myr-mCherry)* (壁細胞で GFP、内皮細胞で Myr-mCherry を発現するゼブラフィッシュ)を用いて、体幹部の節間血管を壁細胞が被覆する様子を観察した。その結果、節間血管を被覆する壁細胞には、背側大動脈から移動してくる細胞と節間血管周囲で発生する細胞の 2 種類があることが分かった。また、興味深いことに、節間血管周囲における壁細胞の発生は、主に動脈内皮細胞周囲で起こることが示された。これら知見から、節間血管における壁細胞の発生にも動脈内皮細胞が関与する可能性が示唆された。

#### (5) 壁細胞の系譜解析

ゼブラフィッシュの血管を被覆する壁細胞の origin を明らかにするため、神経堤細胞で Cre リコンビナーゼを発現する *Tg(sox10:Cre)*、中胚葉細胞で Cre リコンビナーゼを発現する *Tg(tbx6:Cre)*を用いて系譜解析を行った(図 2 および「研究方法」の項参照)。その結果、体幹部の壁細胞は中胚葉に由来することが示された。また、頭部では、前脳の一部の血管を被覆するペリサイト、網膜血管や下顎動脈、大動脈弓を被覆するペリサイトは神経堤細胞由来であり、それ以外の血管の多くは中胚葉由来であることが示唆された。

#### 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 13 件) 全て査読あり

Ando K., Fukuhara S.  
(Co-corresponding author), Izumi N.,  
Nakajima H., Fukui H., Kelsh R.N.,

Mochizuki N. Clarification of mural cell coverage of vascular endothelial cells by live imaging of zebrafish. **Development** 143 : 1328-1339 (2016).

Chávez-Vargas L., Adame-García S.R., Cervantes-Villagrana R.D., Castillo-Kaul A., Bruystens J.G.H., Fukuhara S., Taylor S.S., Mochizuki N., Reyes-Cruz G., Vázquez-Prado J. Protein kinase A (PKA) Type I interacts with P-Rex1, a Rac guanine nucleotide exchange factor: Effect on PKA localization and P-Rex1 signaling. **J. Biol. Chem.** 291: 6182-6199 (2016).

Yokota Y., Nakajima H., Wakayama Y. Muto A., Kawakami K. Fukuhara S., Mochizuki N. Endothelial Ca<sup>2+</sup> oscillations reflect VEGFR signaling-regulated angiogenic capacity in vivo. **eLife** 4 : e08817 (2015).

Kim J.-D., Park K.-E., Ishida J., Kako K., Hamada J., Kani S., Takeuchi M., Namiki K., Fukui H., Fukuhara S., Hibi M., Kobayashi M., Kanaho Y., Kasuya Y., Mochizuki N., Fukamizu A. PRMT8 as a phospholipase maintains dendrite formation of Purkinje cells. **Science Advances** 1: e1500615 (2015).

Sugihara K., Nishiyama K., Fukuhara S., Uemura A., Arima S., Kobayashi R., Kohn-Luque A., Mochizuki N., Suda T., Ogawa H., Kurihara H. Autonomy and non-autonomy of angiogenic cell movements revealed by experiment-driven mathematical modeling. **Cell Reports** 13: 1814-1827 (2015).

Hongu T., Funakoshi Y., Fukuhara S., Suzuki T., Sakimoto S., Takakura N., Ema M., Takahashi S., Itoh S., Kato M., Hasegawa H., Mochizuki N., Kanaho Y. Arf6 regulates tumor angiogenesis and growth through HGF-induced endothelial  $\beta$ 1 integrin recycling. **Nat. Commun.** 6: 6925 (2015).

Mikelis C.M., Simaan M., Ando K., Fukuhara S., Sakurai A., Amornphimoltham P., Masedunskas A., Weigert R., Chavakis T., Adams R., Offermanns S., Mochizuki N., Zheng Y., Gutkind J.S. RhoA and ROCK mediate histamine-induced vascular leakage and anaphylactic shock. **Nat. Commun.** 6: 6725 (2015).

Wakayama Y., Fukuhara S. (Corresponding author), Ando K., Matsuda M., Mochizuki N. Cdc42 mediates Bmp-induced sprouting angiogenesis through Fmn13-driven assembly of endothelial filopodia in

zebrafish. **Dev. Cell** 32: 109-122 (2015).  
Kashiwada T., Fukuhara S.  
(Co-corresponding author), Terai K.,  
Tanaka T., Wakayama Y., Ando K.,  
Nakajima H., Fukui H., Yuge S., Saito Y.,  
Gemma A., Mochizuki N.  
 $\beta$ -Catenin-dependent transcription is  
central to Bmp-mediated formation of  
venous vessels. **Development** 142:  
497-509 (2015).

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:  
333-340 (2015).

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

Fukuhara S. (Co-corresponding author),  
Zhang J., Yuge S., Ando K., Wakayama  
Y., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A.,  
Mochizuki N. Visualizing the cell-cycle  
progression of endothelial cells in  
zebrafish. **Dev. Biol.** 393: 10-23 (2014).  
Odagiri H., Kadomatsu T., Endo M.,  
Masuda T., Morioka M.S., Fukuhara S.,  
Miyamoto T., Kobayashi E., Miyata K.,  
Aoi J., Horiguchi H., Nishimura N.,  
Terada K., Yakushiji T., Manabe I.,  
Mochizuki N., Mizuta M., Oike Y. The  
secreted protein ANGPTL2 promotes  
metastasis of osteosarcoma cells through  
integrin  $\alpha_5\beta_1$ , p38 MAPK, and matrix  
metalloproteinases. **Sci. Signal.** 7: ra7  
(2014).

〔学会発表〕(計 8 件)

福原茂朋、望月直樹、演題名「血管新生  
の蛍光イメージング」第 37 回日本炎症・  
再生医学会、シンポジウム 9 「炎症と血  
管・リンパ管新生」、京都市勤業館 みや  
こめっせ、平成 28 年 6 月 17 日

福原茂朋、望月直樹、演題名「血管新生  
におけるメカノトランスダクション機  
構の役割」第 55 回日本生体医工学会大  
会、オーガナイズドセッション「血管メ  
カノバイオロジー研究の最前線」、富山  
国際会議場、平成 28 年 4 月 28 日

Shigetomo Fukuhara. “Unveiling the  
cellular and molecular mechanism  
underlying vascular development by  
fluorescence-based bio-imaging in  
zebrafish” 10th World Congress for  
Microcirculation. Kyoto. September 27,  
2015

福原茂朋、望月直樹、演題名「Dynamic  
regulation of endothelial barrier function」第  
21 回日本遺伝子治療学会学術集会、ジョ  
イントシンポジウム、大阪、平成 27 年 7  
月 25 日

福原茂朋、望月直樹、演題名「In vivo 細  
胞生物学研究による血管構築メカニズ  
ムの解析」第 67 回細胞生物学会大会、  
シンポジウム、東京、平成 27 年 7 月 2  
日

Shigetomo Fukuhara. “Unveiling the  
cellular and molecular mechanism of  
vascular development by  
fluorescence-based bio-imaging in  
zebrafish” The Joint Meeting of the 120th  
Annual Meeting of The Japanese  
Association of Anatomists and the 92nd  
Annual Meeting of The Physiological  
Society of Japan. Symposium. Kobe  
International Conference Center. March 21,  
2015

福原茂朋、演題名「血管新生メカニズ  
ムの蛍光生体イメージング解析」生理研  
究会 2014 「心血管膜輸送分子の構造・機  
能・病態の統合的研究戦略」、岡崎、平  
成 26 年 9 月 4 日

Shigetomo Fukuhara. Naoki Mochizuki.  
“Visualization of  $\beta$ -catenin transcriptional  
activity in endothelial cells uncovers a novel  
role for  $\beta$ -catenin in venous vessel  
development in zebrafish” The 18th  
International Vascular Biology Meeting  
(IVBM2014), Symposium 10  
“Developmental Angiogenesis” Kyoto.  
April 15, 2014

〔図書〕(計 3 件)

福原茂朋. 血管新生, 『生体の科学』特  
集「細胞シグナル操作法」, 金沢一郎記  
念医学医療振興財団, 66(5): 520-521,  
2015

福原茂朋. 血管系におけるアンジオポエ  
チン-Tie 受容体システムの役割,  
Thrombosis Medicine, 先端医学社, 5(3):  
18-24, 2015

福原茂朋, 若山勇紀, 柏田健, 安藤康史,  
望月直樹. ゼブラフィッシュを用いた in  
vivo 細胞生物学研究～血管研究を例に  
～, 生体の科学, 金沢一郎記念医学医療  
振興財団, 66(4): 375-381, 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福原 茂朋 (FUKUHARA, Shigetomo)

国立研究開発法人国立循環器病研究セン  
ター研究所・室長

研究者番号：70332880