

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590222

研究課題名(和文) 発生初期過程における血管芽細胞分化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of the novel genes associated with vascular morphogenesis

研究代表者

木村 英二 (Kimura, Eiji)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：50405750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：血管系は決まったタイムコースに従い、安定した形態を構築するが、関与する遺伝子群は十分に明らかになっていない。我々は、ETSrp遺伝子の発現を抑制したゼブラフィッシュ胚を用いて、遺伝子発現変動をマイクロアレイ法で解析し、結果1.5倍以上の発現上昇を示した165遺伝子の同定に成功した。32遺伝子に関しては詳細な発現パターンをZFINデータベース上で確認し、血管形成領域で特異的に発現している11遺伝子を同定した。ほか新たに68遺伝子を選定し発現パターンを確認し、新規の発現パターンを3遺伝子で得ることに成功した。上記の14遺伝子に対しては、今後 遺伝子破壊体を作成し、血管形成との関連を解析していく。

研究成果の概要(英文)：Vascular formation progressed with a regular time course to form a uniform structure. However the associated genes of vascular morphogenesis are still poorly uncovered. To address this issue, we performed microarray analysis of etsrp/etv2 deficient zebrafish embryos. As a result, we identified 165 genes that were up-regulated greater than 1.5 fold by silencing etsrp/etv2 expression. Furthermore, we analyzed their expression patterns to evaluate whether these genes were associated with the cranial and/or truncal vascular formation by in silico analysis using ZFIN database, and selected 11 genes which were expressed in the specific region associated with the vascular formation. We also performed in situ hybridization for 68 selected genes which precise expression patterns were not obtained, and succeeded to demonstrate three new expression patterns. We are now planning to knock out these genes using CRISPR/Cas9 system to analyze their function for the vascular formation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：血管形成 ゼブラフィッシュ マイクロアレイ etsrp/etv2

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 (Risau et al, Nat 386:671-4, 1997)。そして 100 年前に Thoma や Evans により提唱された、未分化な血管網の中から血流によって動・静脈が選択されるというネットワークモデルが、初期の動静脈分化を決するメカニズムとして信じられてきた。しかしながら、この説明は血管系の変異性の説明には適しているが、同時に血管系の示す規則性や恒常性を説明し得ない。このことから我々は、血管系を構築する遺伝的に制御されたシステムの存在を想定した。

この問題を解決するための材料として、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*) に着目した。そして Microangiography 法で血管系アトラスを完成させ (Isogai et al. Dev Biol 230:278-301, 2001)、血管内皮が特異的に蛍光を発するトランスジェニック・ゼブラフィッシュの系統 *Tg(fli1:EGFP)y1* 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、体幹部での血管系の形成過程を明らかにした。(Isogai et al. Dev 130:5281-5290, 2003)。

そして同様の方法を用い、体幹部とは独立した脳血管系の初期形成過程に解析を行い、新しい知見を得ることに成功した。ではいかなるメカニズムによって、血管芽細胞は間葉系の細胞から分化して機能的な血管系を構築していくのか。この過程に関与する遺伝子群の解析は十分に行われていない。そこで我々は、この初期の血管が細胞分化・動静脈分化に関与する遺伝子群の同定を目指して、本研究課題を開始した。

2. 研究の目的

いかなるメカニズムによって、血管芽細胞は間葉系の細胞から分化し、動静脈へと分化し、そして機能的な血管系を構築していくのか。この問題を解明するために、我々は血管芽細胞分化の上流に位置すると考えられている *ETSrp/etv2* 遺伝子に注目した。この遺伝子は、2005 年にヘマンジオプラスト (血球血管芽細胞) を欠失する *cloche* 遺伝子突然変異体のマイクロアレイ解析から同定された (Sumanas et al. blood 106:534-541, 2005)。*ETSrp/etv2* 遺伝子の morpholino antisense oligo (MO) を受精卵に注入し発現を抑制して血管系形成への影響を評価した結果、12 体節期において *fli1* 陽性細胞の出現が一部を除き認められなくなった。すなわち、鰓弓の軟骨を形成する細胞群では *fli1* の発現が維持されていたが、頭部と体幹部で血管芽細胞へ分化する細胞群では、その発現が

著しく阻害されていた。一方 18 体節期では、頭部・体幹部で血管芽細胞へ分化した細胞が一部確認された。すなわち血管芽細胞への分化は、*ETSrp/etv2* 遺伝子の発現抑制により著しく阻害されるが、発生がすすむにつれて緩やかではあるが再開していることが判明した。この結果は、*ETSrp/etv2* 遺伝子が血管芽細胞の分化に重要な役割を果たしており、かつ機能的に補完する因子、あるいは何らかのフィードバック機構を有している可能性を示唆していた。

以上の点を踏まえて、我々は *ETSrp/etv2* 遺伝子の発現を抑制したゼブラフィッシュ胚での遺伝子発現変動をマイクロアレイ法で、血管形成が開始される 12 体節期の胚を用いて解析した。その結果、1.5 倍以上変動し再現性 (n=2) を示した 466 プローブ配列 (上昇:191、下降:275) の同定に成功した。発現が下降した遺伝子群には、血管芽細胞で有意に発現する *ETSrp/etv2* の下流に位置する遺伝子群が含まれていることが想定される。一方、発現の上昇した遺伝子群では、血管芽細胞への分化を促す血管周囲組織からの分化誘導因子や、血管芽細胞への分化を阻害された間葉系の細胞で有意に発現している遺伝子、あるいは *ETSrp/etv2* 遺伝子の発現を誘導するフィードバック機構に関与する遺伝子が含まれていることが想定された。これまで *ETSrp/etv2* 遺伝子の mRNA を注入し発現の上昇した遺伝子群 (*ETSrp/etv2* の下流遺伝子) の同定を試みた研究結果はいくつか報告されているが (Wong et al. Dev Dyn 238:1836-50, 2009; Gomez et al. Plos one 4:e4994, 2009) *ETSrp/etv2* 遺伝子の誘導に関与するような遺伝子群の解析研究の報告はいまだなされていない。

そこで本研究課題では、これらの *ETSrp/etv2* 遺伝子の抑制より発現が上昇した 191 プローブ配列を対象に機能解析を行い、血管芽細胞の *in vivo* での分化メカニズムにおいて重要な役割を担う遺伝子の同定、すなわち血管芽細胞へ分化する手前の間葉系細胞や血管周囲組織で発現し、*ETSrp/etv2* 遺伝子の発現に関与する遺伝子群の探索を行った。また血管形成関連遺伝子を同定したのち、個体内において 1 細胞レベルで血管内皮細胞での遺伝子発現制御を行うことで詳細な機能解析が可能となる。赤外レーザーを利用して、個体内において 1 細胞レベルでその発現を制御可能な方法の開発も併せて行った。

3. 研究の方法

本研究では、血管芽細胞の分化メカニズムの鍵となる遺伝子を発見することを目的としている。その出発点として、血管芽細胞分化の上流に位置する *ETSrp/etv2* 遺伝子の発現を抑制した際の遺伝子の発現変動をマイ

クロアレイ解析 (アジレント社・Agilent Zebrafish 44k・1色蛍光法)した結果、1.5倍以上変動し再現性(n=2)を示した466プローブ配列(上昇:191、下降:275)を同定した。これらの遺伝子リストでは、過去に血管系での発現が報告された遺伝子群(*fli1a*, *kdr1*, *tie1*, *tie2*, *scl/tal1*, *lmo2*, *itgb1b*)の発現は低下しており、血管系関連遺伝子の発現変動は的確に評価されていることが確認された。DNAプローブの塩基配列(60塩基)やAccession番号が付記されているこのプローブリストを出発点とし以降の解析を進めた。

(1)ゼブラフィッシュのRefseqデータベースを用いたBlast解析によるannotationの確定ならびにデータベース上の発現パターンの取得

ゼブラフィッシュのRefseqデータベースを用いてBlast解析(e value:1xe-17)することで、1.5倍以上の発現上昇を示した191のプローブ配列のannotationを確定した。研究室のコンピュータにゼブラフィッシュの遺伝子情報のデータベースを構築し、Local blastシステムを利用し集約的に解析した。Annotationが確定した遺伝子に関しては、ゼブラフィッシュのデータベースであるZFIN(http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?Mlval=aa-ZDB_home.apg)上に、詳細な発現パターンの情報があるかを確認した。詳細な発現パターンが得られた遺伝子に関しては、すべての画像を取得し、血管形成との関連を、その発現領域を比較することで検討した。

(2) whole-mount *in situ* hybridization法による発現部位の同定

*in silico*解析でannotationが確定し、ZFINデータベース上に発現パターンを認めなかった遺伝子を対象に、その遺伝子が血管で発現しているのか、血管周囲組織で発現しているのかを、12体節期の胚を用いて*in situ* hybridization法で解析した。解析対象遺伝子を絞り込む目的でヒト・マウス・メダカの遺伝子データベースを用いてtblastx解析を行い、種間での保存性を検討した。保存性が確認された遺伝子に対して、その一部をサブクローニング後、DIG標識したアンチセンスRNAを合成し、*in situ* hybridization法を行い、発現パターンを取得し血管形成との関連を検討した。

(3)個体内における1細胞レベルの遺伝子発現制御法の開発

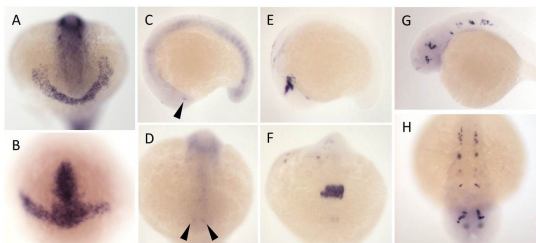
赤外線レーザー照射により局所的に熱応答を誘導するIR-LEGO顕微鏡を用いて、内皮細胞での遺伝子発現誘導を試みた。内皮細胞を効率的に同定するために、血管内皮細胞で特異的に蛍光を発する遺伝子組み換え体*Tg(fli1:nEGFP)y7*を用いた。Heat shock proteinの発現制御領域に、赤色蛍光

(mCherry)の塩基配列をつなげた遺伝子組み換え体*Tg(hsp:mCherry)k2*を作成し、赤外線レーザーを照射し、熱応答を誘導した。遺伝子発現の成否は、赤色蛍光の観察により判定した。

4. 研究成果

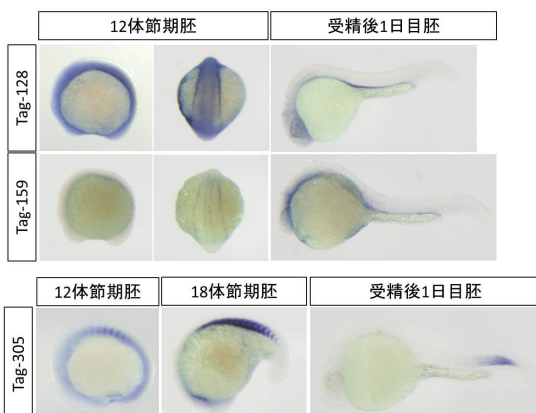
(1)ゼブラフィッシュのRefseqデータベースを用いてBlast解析しannotationを確定した結果、重複遺伝子が除外され165遺伝子が解析対象として同定された。これらのうち32遺伝子で、ZFINデータベースに詳細な発現過程での発現パターンの報告を認めた。発現パターンと血管形成領域を比較検討した結果、血管形成との関連が想定された11遺伝子を抽出することに成功した。

これらの遺伝子群は、1)頭部の血管形成領域の神経組織や間質に特異的に発現している遺伝子(Tag-7, 339, 366, 206)、2)脳動脈の形成領域で発現を示す遺伝子(Tag-260)、3)脳静脈の形成領域に近接した神経組織で発現を示す遺伝子(Tag-22, 57)、4)伸展する血管が接触する脳幹-脊髄の腹側領域で特異的な発現を示す遺伝子(Tag-255, 304, 488)、5)脊索で特異的な発現を示す遺伝子(Tag-352)の5パターンに大きく分類することができた。



血管形成との関連が想定された発現パターンを示した遺伝子群の例(画像データはZFINより引用):頭部での発現(A,B)、動脈(C,D)や静脈(E,F)に一致した発現、脊髄の腹側に限局した発現(G,H)

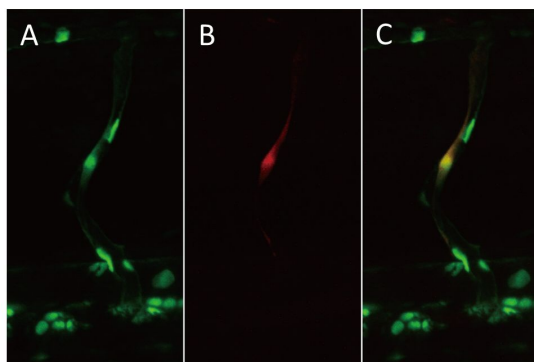
(2)詳細な発現パターンが得られなかった遺伝子群に対しては、種間の保存性なども考慮したうえで68遺伝子を選定し、遺伝子断片をベクターにクローニングして、DIG標識のRNAプローブを合成した。12体節期の胚を



用いて whole-mount *in situ* hybridization 法を行い、発現パターンを確認した。その結果、前腎管や体節での発現を認めたゼブラフィッシュにおける新規の遺伝子発現パターンを 3 つの遺伝子 (Tag-128, 159, 305) で得ることに成功した。

以上の結果を踏まえて、現在 上記 14 遺伝子を対象に TALEN 法、あるいは CRISPR/Cas9 法を用いて、遺伝子破壊体の作製を進めており、血管形成との関連の解析を進めている。これにより、新たな関連遺伝子の同定と動脈分化メカニズムの解明へとつながっていくことが期待される。

(3) IR-LEGO 顕微鏡による 1 細胞レベルでの血管内皮細胞における遺伝子発現誘導に成功した。照射条件を最適化することで約 60%の細胞で遺伝子発現が 1 細胞レベルで誘導された。血管周囲の非特異的な誘導が問題点として残っており、この改善を進めている。また応用例として、標識した細胞の追跡実験や破壊実験を行い、脳と脊髄をつなぐ第一節間動脈の役割を明らかにした。以上の結果を、ATVB に投稿し発表した。



赤外レーザーによる 1 細胞レベルでの血管内皮細胞における遺伝子発現誘導：(A) EGFP、(B) mCherry (赤外レーザー照射により誘導)、(C) 重ね合わせ

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 1 件)

Kimura E, Deguchi T, Kamei Y, Shoji W, Yuba S, Hitomi J: Application of Infrared Laser to the Zebrafish Vascular System: Gene Induction, Tracing, and Ablation of Single Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:1264-1270. 査読有

[学会発表](計 14 件)

Eiji Kimura, Yasuhiro Kamei: In vivo gene manipulation in the targeted single cells using an infrared laser. The 91th Annual Meeting of the

Physiological Society of Japan, 16-18th Mar 2014, Kagoshima (招待講演)

木村英二、人見次郎: 個体内における 1 細胞レベルでの遺伝子発現制御法の開発. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014 年 3 月 27-29 日 栃木ポスター

木村英二、藤澤志津子、小泉元彦、谷藤吾朗、人見次郎: Etsrp/etv2 遺伝子を抑制したゼブラフィッシュ胚を用いた新規血管形成関連遺伝子群のマイクロアレイ法による探索 第 36 回 日本分子生物学会 2013 年 12 月 3-6 日 神戸ポスター

木村英二、磯貝純夫、人見次郎: 内頸動脈系と椎骨動脈系は発生過程においていかにして連結されるのか 第 21 回 日本血管生物医学会学術集会、2013 年 9 月 24-26 日 大阪 口頭発表

Eiji Kimura, Tomonori Deguchi, Yasuhiro Kamei, Wataru Shoji, Shunsuke Yuba, Jiro Hitomi: Gene induction, tracing, and ablation of the targeted single endothelial cells using IR-LEGO system. 19th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting Sep 20-21 2013, Sendai Poster

Atsuko Shimada, Takuya Kaneko, Teruhiro Okuyama, Yasuko Isoe, Eiji Kimura, Aiko Kawasumi, Chikashi Nagayama, Misako Saida-Taniguchi, Atsushi Shimizu, Hitoshi Yokoyama, Yoshihiro Morishita, Toshinori Hayashi, Hiroko Urawa, Koji Tamura, Masato Kinoshita, Kiyoshi Naruse, Hiroyuki Takeda, Hideaki Takeuchi, Yasuhiro Kamei: Application of IR-LEGO (Infrared Laser-Evoked Gene Operator) to the model animals and plants as Collaborative research projects in NIBB. 19th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting Sep 20-21 2013, Sendai Poster

木村英二、出口友則、亀井保博、東海林互、弓場俊輔、人見次郎: 血管内皮細胞を標的とした 1 細胞レベルでの遺伝子発現誘導系の樹立 第 642 回岩手医学会 2013 年 9 月 17 日 盛岡 口頭発表

Hitomi J, Isogai S, Kimura E: New anatomical findings in the cranial vascular development of the zebrafish. International Symposium: Anatomical Science for advance in health and

clinical therapy Aug 27-28 2013,
Sendai 招待講演

Yasuhiro Kamei, Hiroko Urawa,
Kazuhiko Yamamoto, Takuya Kaneko,
Eiji Kimura, Misako Saida-Taniguchi,
Tomomi Suzuki, Akira Nagatani,
Atsuko Shimada, Hiroyuki Takeda:
Application of IR-LEGO (Infrared
Laser-Evoked Gene Operator) to the
Model Animals and Plants as
Collaborative Research Projects in
NIBB. The 35th Annual Meeting of the
Molecular Biology Society of Japan,
Dec 11-14 2012, Fukuoka Poster

Eiji Kimura, Tomonori Deguchi,
Yasuhiro Kamei, Wataru Shoji,
Shunsuke Yuba, Jiro Hitomi:
Spatio-temporally regulated gene
expression in the targeted single
endothelial cells using the IR-LEGO
system. The 35th Annual Meeting of
the Molecular Biology Society of Japan,
Dec 11-14 2012, Fukuoka Poster

Eiji Kimura, Tomonori Deguchi,
Yasuhiro Kamei, Wataru Shoji,
Shunsuke Yuba, Jiro Hitomi:
Spatio-temporally regulated gene
induction in the targeted single
endothelial cells using an infrared
laser. The 20th Japanese Society of
Vascular Biology and Medicine in
cooperation with the 10th
Korean-Japan Joint Symposium on
Vascular Biology, Dec 5-7 2012,
Tokushima Oral

Eiji Kimura, Sumio Isogai, Jiro
Hitomi: Integration of the internal
carotid arteries and vertebral arteries
in zebrafish. Developmental Vascular
Biology Workshop V, Oct 14-18 2012,
Montrey Poster

Misako Saida-Taniguchi, Takuya
Kaneko, Atsuko Shimada, Hiroyuki
Takeda, Eiji Kimura, Hiroko Urawa
and Yasuhiro Kamei:
IR-laser-mediated gene induction
system. 18th Japanese Medaka and
Zebrafish Meeting, Sep 22-23 2012,
Kyoto Poster

亀井保博, 浦和博子, 山本和彦, 兼子拓
也, 木村英二, 出口友則, 弓場俊輔, 北
野健, 尾田正二, 三谷啓志, 齋田-谷口美
佐子, 鈴木友美, 長谷あきら, 島田敦子,
武田洋幸, 岡田清孝: 赤外レーザーによ

る遺伝子発現システム (IR-LEGO) の
様々なモデル生物への応用 第34回日
本分子生物学会年会、2011年12月13
16日、横浜 ポスター

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 英二 (KIMURA, Eiji)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号: 50405750

(2) 研究分担者

磯貝 純夫 (ISOGAI, Sumio)
岩手医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 60212966

人見 次郎 (HITOMI, Jiro)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00218728

(3) 連携研究者

()

研究者番号: