

連載講座

ヒトを知るモデル動物としてのゼブラフィッシュ-5

イメージングによる循環器発生機構の解明

中嶋 洋行 望月 直樹

Key words : 中胚葉, 造血幹細胞, 血流, ニッチ, 血管新生

循環器疾患の病態解明のためのゼブラフィッシュの有用性は、遺伝子や分子の機能を個体で調べられるだけでなく、個々の細胞の振る舞いを調べることが可能な点である。細胞外環境と細胞内情報伝達系の制御に従って臓器形成や維持がなされているのか？ 個々の細胞や細胞周囲との協調や競合はいかに調節されているのか？ などをイメージングにより観察することができる有用なモデルである。特に循環器(心臓, 脈管)形成は、他臓器形成に先行する。酸素や栄養素の供給が不可欠だからである。

I 循環器研究での有用性： イメージング機器の進歩と共に発展

ゼブラフィッシュの有用性は、透明、体外発育、遺伝子易操作性である。特に心臓血管形成でゼブラフィッシュを利用するメリットは、イメージング技術(スピニングディスク型共焦点顕微鏡, ライトシート顕微鏡)を駆使した実時間での細胞動態が観察できることと考える^{1,2)}。特に心臓が拍動していても三次元構築をしなければ、ビデオレートでのイメージング(30 frame per second)が可能であり、ヒトの目で見ても違和感なく動きが評価できる。ROI(region of interest)を小さくすることや画像解像度を上げ、画像転送速度を考慮することで詳細な解析が可能である。

Single cell RNA 解析が一般化しつつあるが³⁾, クラスターの局在をイメージングで突き止めることにより、分子の動きを詳細に理解可能となる。複数の蛍光を使用し分子の発現部位を解析し、蛍光により細胞を分取して蛍光陽性細胞の遺伝子発現を解析することで、細胞が局在する部位での機能を推定することが可能である。本稿では、トランスジェニック個体は *Tg*(プロモーター領域: プローブ名) とし、変異体は遺伝子名^{施設名}の記載とする。詳しくは下記を参照されたい。

<https://zfin.org/action/fish/search>

II 循環臓器発生

1. 中胚葉から発生する心臓・脈管・血球

Draculin プロモーター活性化細胞が中胚葉由来の細胞として、発生時に追跡可能である。心筋細胞、血管内皮細胞、血球細胞への Draculin⁺細胞の分化は確認されている⁴⁻⁶⁾。心筋前駆細胞が集積し、心房筋・心室筋分化する⁷⁾。血管は血管内皮細胞・周細胞で構成される。血球は造血幹細胞からの分化による赤血球・白血球・血小板形成により、これらの血球が心臓の拍動により駆出されることで循環が成立する。したがって、中胚葉細胞が主体となった循環を初期発生時に構築する。一方、中胚葉だけでは循環臓器の構成細胞の増殖や分化、遊走が調節されているわけではな

Deciphering molecular mechanism underlying circulation

Nakajima Hiroyuki, Mochizuki Naoki : 国立循環器病研究センター研究所細胞生物学部 (〒564-8565 大阪府吹田市岸部新町 6-1)

0370-9531/06/¥500/ 論文/JCOPY

血管内皮細胞にも発現することを見いだしており、発生過程での *isl1* 陽性内皮細胞についても検討中である(図)。

心筋細胞は心臓の血管やリンパ管形成とは切り離せない^{12,13)}。心筋細胞から分泌される *Cxcl12* が血管内皮細胞に発現する *Cxcr4* を活性化することで、血管内皮細胞の血管表面での伸長に関わることも明らかにされている¹⁴⁾。この *Cxcl12*-*Cxcr4* シグナルによる血管内皮細胞の運動調節系は、発生のみならず、心臓再生能を有するゼブラフィッシュでは成魚でも機能している¹⁵⁾。心内膜内皮細胞が心筋層を貫通して心外膜に遊走し、その後、心筋表面を覆うように血管網が発達していくのがゼブラフィッシュの冠血管形成である。

心内膜内皮細胞は、冠血管内皮細胞のもととなるだけではなく、内皮間葉系転換(EndoMT)により、心房・心室間の房室弁形成の原細胞でもある。心内膜内皮細胞は、心拍動により拍出される血球による剪断応力を直接受ける部位であると共に、乱流が生じることによる様々な力を直接受ける細胞でもある。特に房室間は原始心筒の中間で両腔(心房と心室)が絞られる形になるために血流による物理作用を受け、 Ca^{2+} を介した細胞内情報伝達系を活性化することで、EndoMT に従って弁形成に至ることがわかった¹⁶⁾。

心筋細胞は単なる収縮機能だけでなく、内分泌機能を有する細胞としても機能しているが¹⁷⁾、分泌される因子が血流で運ばれるのか？ 近傍の細胞に作用するのか？ によって、心筋の機能と遠隔臓器への影響、周囲細胞への影響が分かれる。臓器形成には、実質細胞と間質細胞の相互作用の重要性だけではなく、循環器ならではの物理的な刺激や血流による直接の作用も考えた研究も大事である。

3. 脈管発生

脈管は血管とリンパ管から成り、前者は動脈・毛細血管・静脈で構成される。血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞がまずネットワークを形成するが、臓器ごとにその性質が異なることから臓器特異的脈管構築が提唱されている。ゼブラフィッシュでは、脳、体幹で形成機構が先行している。血管内皮細胞特異的なプロモーター(*fli1*,

kdrl)、リンパ管内皮特異的なプロモーター(*lyve1*)下流に蛍光タンパク質を発現させることで、脈管の形態と形成様態が明らかにされてきた。リンパ管内皮細胞が静脈内皮細胞から分化して、体幹のリンパ管がゼブラフィッシュでは形成される¹⁸⁾。

特にゼブラフィッシュの節間血管は、血管新生研究のモデルとしてマウスの網膜血管発生モデルと共に汎用されてきた。筆者らも血管新生における低分子量 GTP 結合タンパク質 *Cdc42* 活性化とフィロポディア形成のメカニズム、大動脈から節間血管が分枝する際の Ca^{2+} 活性化などを、*Cdc42* 活性化可視化プローブ、 Ca^{2+} 可視化プローブを用いることで血管新生メカニズムの一端を明らかにした^{19,20)}。これらは vascular endothelial growth factor (VEGF) 依存性の現象であり、増殖因子シグナルによって内皮細胞の増殖、分化、遊走が調節されることを解明することにつながっている。

一方、心臓の弁形成機構でも紹介したが、血流に曝されている血管内皮細胞は、剪断応力を常に受けることで血管内皮細胞が安定化することも示した。特に剪断応力依存性の血管安定化には、Yap が結合していた分子 AMOT と解離し、核内に移行することが必須であることを突き止めた²¹⁾。本実験では、*Tg(fli1:Gal4db-TEAD2DN-2A-mC)*^{ncv3} を独自に作製して、Yap と *Wwtr1* が核内移行すると *Tg(UAS:GFP)* のレポーターによる GFP の発現を可視化する Tg フィッシュを活用した。

情報伝達活性化可視化 Tg としては、Wnt シグナル陽性細胞(β カテンinが核内移行する細胞)を発生時の血管で観察すると、後主静脈の腹側で将来、腹側静脈を形成する静脈内皮細胞で特異的に活性化していることを明らかにした²²⁾。

Tg(fli1:Gal4db-TdeltaC-2A-mCherry) と *Tg(UAS:GFP)* を観察すると、 β カテンinが核内移行すると GFP を発現するために、GFP 陽性細胞が Wnt シグナル活性化細胞として検出できる。興味深いことに、これらの細胞は CHT (caudal hematopoietic tissue) の中で腹側に位置するのに対して、*isl1*⁺ 細胞は背側に局在することから、機能的にも異なる細胞群であることが判明しつつある(投稿準備中)。

血管は内皮細胞のみならず、外側を周細胞あるいは血管平滑筋細胞が覆うことにより血管内皮を裏打ちすることで堅牢な血管が構築される^{23,24)}。内皮細胞と周細胞は相互作用により血管が維持されている[内皮細胞から platelet-derived growth factor (PDGF) が周細胞に発現する PDGFR 受容体を活性化し、周細胞から分泌される angiopoietin-1 が内皮細胞に発現する Tie 受容体を活性化する]。脳の周細胞は血液脳関門を構成するうえでも重要な機能を果たしていることから、今後更に神経・脳と血管維持調節機構の解明は必要になる。

4. 造血幹細胞—血球

血球形成も哺乳類と同様に造血幹細胞に依存する。造血幹細胞は、20 hpf (hours post-fertilization) では体幹から尾部にかけての intermediate cell mass (ICM) に出現する。更に 36 hpf では aorta-gonad mesonephros (AGM) 領域に集積し、hemogenic endothelial cells として将来の血球と血管内皮細胞に分化する能力を有する幹細胞として大動脈腹側に局在する。血球となる造血幹細胞は 4 dpf (days post-fertilization) では CHT に移動し、静脈血管内皮細胞ニッチで血管内皮細胞との相互作用を受ける。最終的には、胸腺と腎臓に幹細胞が移動することで血球系幹細胞が維持される²⁵⁾。

造血幹細胞形成過程のなかで、hemogenic endothelium となること、更には、CHT への移動には血流が必要なこと、CHT で静脈血管内皮細胞ニッチで育成されることを考えると、心臓・血管・血球が協調的に形成されることの重要性は明らかである^{26,27)}。Cloche (npas4l) 変異体では、血管内皮細胞、血球が形成されないことから、血管形成と血球形成シグナルの共通点が明らかである²⁸⁾。

筆者らは、発生段階で *isl1*⁺ 細胞が尾側の静脈内皮細胞に発現していることを見だし、この *isl1*⁺ 細胞が CHT 形成に重要であり、造血幹細胞のニッチ細胞として機能することを見だしている(投稿準備中)。CHT はその後消失して、造血の場が胸腺と腎臓に移動するために CHT 形成は一時的であるが、この時期に造血幹細胞がニッチ

で育成されることが重要であることが推察される。

5. 成魚での血管・心臓の可視化個体

主に、ゼブラフィッシュの発生初期に胚が透明であることの利点を活かしたイメージングの優位性により、研究が発展してきた。しかし、一度確立した血管の維持機構の解明や他の臓器組織との相互調節機構や解剖・組織学的な検討は、成魚では困難であった。透明化を目指したゼブラフィッシュ (Casper) の開発も行われてきたが²⁹⁾、胚と比較してもイメージングに耐え得る十分な透過性は達成されていない。近年、成魚でも透明であり、脳神経の活性化が可視化できる *Danionella translucida* が報告されており³⁰⁾、全身が透明であることから、心臓再生、脳血管や体幹の血管維持機構、加齢による血管変化などにも使用範囲が拡大していくと予想し、筆者らも循環器のイメージングによる研究に活用する計画を立てている。

おわりに

循環器疾患研究におけるゼブラフィッシュの有用性、特にイメージングによる機能解析を筆者らのデータを中心に紹介した。技術革新に伴い新たな知見が得られるようになっており、本連載の他の分野のゼブラフィッシュをモデルとして用いた研究を紹介していただいている研究者と共に更なる技術革新を実現し、遺伝子・分子・細胞・臓器を多くの捉え方で機能を明らかにしていくことが生命の本質に迫る研究になると考え、今後も皆で研究を進めるようにしていきたい。

●文 献

- 1) Huisken J, Stainier DY : *Development*. **136** : 1963–1975, 2009
- 2) Chang BJ, Manton JD, Sapoznik E et al : *Nat Methods*. **18** : 829–834, 2021
- 3) Farnsworth DR, Saunders LM, Miller AC : *Dev Biol*. **459** : 100–108, 2020
- 4) Mosimann C, Panáková D, Werdich AA et al : *Nat Commun*. **6** : 8146, 2015
- 5) Prummel KD, Hess C, Nieuwenhuize S et al : *Nat Commun*. **10** : 3857, 2019
- 6) Sumanas S, Joriniak T, Lin S : *Blood*. **106** : 534–541, 2005
- 7) Schoenebeck JJ, Keegan BR, Yelon D : *Dev Cell*. **13** : 254–267, 2007
- 8) Bakkers J : *Cardiovasc Res*. **91** : 279–288, 2011

- 9) Guner-Ataman B, Paffett-Lugassy N, Adams MS et al : *Development*. **140** : 1353-1363, 2013
- 10) Fukui H, Miyazaki T, Chow RW et al : *Elife*. **7** : e29106, 2018
- 11) Fukui H, Terai K, Nakajima H et al : *Dev Cell*. **31** : 128-136, 2014
- 12) Harrison MR, Feng X, Mo G et al : *Elife*. **8** : e42762, 2019
- 13) Klaourakis K, Vieira JM, Riley PR : *Nat Rev Cardiol*. **18** : 368-379, 2021
- 14) Harrison MR, Bussmann J, Huang Y et al : *Dev Cell*. **33** : 442-454, 2015
- 15) Itou J, Oishi I, Kawakami H et al : *Development*. **139** : 4133-4142, 2012
- 16) Fukui H, Chow RW, Xie J et al : *Science*. **374** : 351-354, 2021
- 17) Becker JR, Chatterjee S, Robinson TY et al : *Development*. **141** : 335-345, 2014
- 18) Hogan BM, Schulte-Merker S : *Dev Cell*. **42** : 567-583, 2017
- 19) Wakayama Y, Fukuhara S, Ando K et al : *Dev Cell*. **32** : 109-122, 2015
- 20) Yokota Y, Nakajima H, Wakayama Y et al : *Elife*. **4** : e08817, 2015
- 21) Nakajima H, Yamamoto K, Agarwala S et al : *Dev Cell*. **40** : 523-536, 2017
- 22) Kashiwada T, Fukuhara S, Terai K et al : *Development*. **142** : 497-509, 2015
- 23) Ando K, Wang W, Peng D et al : *Development*. **146** : dev165589, 2019
- 24) Ando K, Fukuhara S, Izumi N et al : *Development*. **143** : 1328-1339, 2016
- 25) Orkin SH, Zon LI : *Cell*. **132** : 631-644, 2008
- 26) Xue Y, Lv J, Zhang C et al : *Dev Cell*. **42** : 349-362, 2017
- 27) Li D, Xue W, Li M et al : *Nature*. **564** : 119-124, 2018
- 28) Reischauer S, Stone OA, Villasenor A et al : *Nature*. **535** : 294-298, 2016
- 29) White RM, Sessa A, Burke C et al : *Cell Stem Cell*. **2** : 183-189, 2008
- 30) Schulze L, Henninger J, Kadobianskyi M et al : *Nat Methods*. **15** : 977-983, 2018