

令和 2 年 4 月 30 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年

受付番号 201860660

氏 名

芝山 勇紀

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: ミュンスター (国名: ドイツ)
2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
蛍光イメージング技術による血管新生過程の VegfAa の機能解析
3. 派遣期間: 平成 30 年 4 月 1 日 ~ 令和 2 年 3 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
University of Muenster
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

血管は全身に張り巡らされており、組織に酸素や栄養を供給する重要な器官である。内皮細胞が血管新生誘導因子に反応し、既存の血管から、新たな血管が出芽、伸長し新たな血管ネットワークが形成されるプロセスを血管新生という。血管新生は、発生過程だけでなく、がんや加齢黄斑変性など疾病でも起こることから、血管新生の制御機構を明らかにすることは、生物学的な理解だけでなく、疾病治療にもつながる。これまでの研究から、血管内皮増殖因子 Vascular endothelial growth factor a (Vegfa) が血管新生に重要であることは知られているが、発現部位や活性化された受容体 Vascular endothelial growth factor (Vegfr2) がどのようにしてエンドサイトーシスされるかについて不明な点が多い。本研究課題では、蛍光イメージング技術を用いて、ゼブラフィッシュの Vegfaa 発現細胞、内皮細胞を同時に可視化し、秩序立った血管ネットワーク形成がどのようにして制御されているのか明らかにすることを目的とした。

本研究では以下の 3 点について解析を行った。

1. Vegfaa スプライシングバリエント発現細胞の可視化
2. Vegfaa165 のヘパリン結合ドメインによる血管新生の制御機構の解析
3. Vegfaa/Vegfr2 シグナルの解析

1. Vegfaa スプライシングバリエント発現細胞の可視化

ゼブラフィッシュには、Vegfaa の 2 種類のスプライシングバリエント Vegfaa121 と Vegfa165 が存在する。Vegfaa165 はヘパリン結合ドメインをコードする exon6 を含むため、細胞外マトリックスと結合し拡散性が低い。一方、Vegfaa121 はヘパリン結合ドメインを持たないため拡散性が高い。血管新生過程でいつ、どの細胞が Vegfaa121 および Vegfaa165 を発現するか明らかにすることは、発生過程の理解だけでなく病的血管新生を伴う虚血性疾患や加齢性黄斑変性、腫瘍などの治療に重要である。しかし、これまで Vegfaa スプライシングバリエントの機能解析は困難であった。Vegfaa は exon6 のスプライシングの有無によって Vegfaa121、Vegfaa165 が産生されることに注目し、それぞれの発現細胞を可視化するために、Cas9/CRISPR を用いて exon6 に GFP、exon7 に Gal4 をノックインしたトランスジェニックフィッシュの樹立を試みた(図 1)。

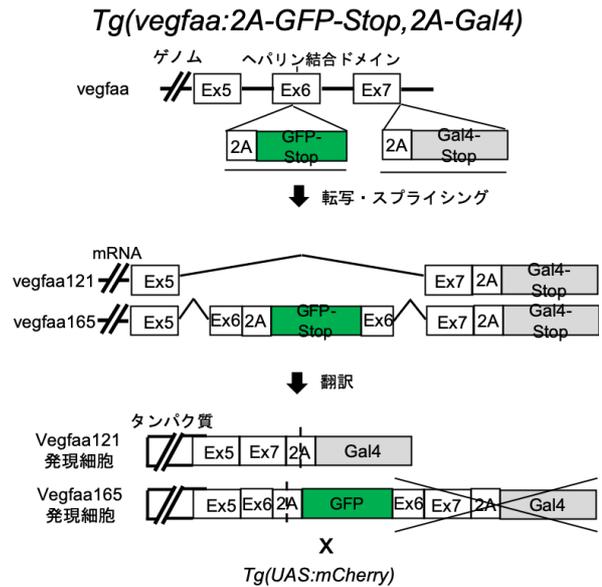


図 1. Vegfaa スプライシングバリエントおよびノックイン

Vegfaa121 発現細胞では GFP を含む exon6 がスプラウトアウトされることにより、Gal4 が発現する。一方、Vegfaa165 発現細胞では GFP を発現するため、*Tg(UAS:mCherry)* と交配することにより、Vegfaa121、Vegfaa165 発現細胞をそれぞれ蛍光タンパク質で可視化することができる(図 1)。vegfaa gRNA, Cas9, donor DNA のインジェクションにより、GFP、Gal4 のレポーターの UAS:GFP の蛍光は見られたが、トランスジェニックフィッシュの樹立はできなかつた。おそらくノックイン効率が悪いためであると考えられる。ノックイン効率を上げるために、ターゲットの切断効率が高い gRNA をデザインしたが、改善は見られなかつた。今回 donor vector として pKHR4 vector を使用したが、他の donor DNA を用いることでノックイン効率を高め、トランスジェニックフィッシュ樹立のための改善ができると考えられる。

2. Vegfaa165 のヘパリン結合ドメインによる血管新生の制御機構の解析

発生過程では、秩序だった血管網のパターニングが行われる。Vegfaa と細胞外マトリックスとの結合が、血管のパターニングに影響を与えるか検討するために、CRISPR/Cas9 により exon6 にコードされるヘパリン結合ドメインを欠損した vegfaa165 ΔHBD (Heparin binding domain) 変異体の樹立を行なった。vegfaa165 ΔHBD は exon6 が 5 塩基欠損しており、途中でストップコドンが入るようになっている(図 2)。そのため、vegfaa121 はストップコドンを含む exon6 がスプライスアウトされ正常に翻訳されるが、Vegfaa165 ΔHBD は途中で翻訳が停止し、ヘパリン硫酸による修飾がされず、細胞外マトリックスと結合することができなくなる。Vegfaa165 ΔHBD でも Vegfr2 は活性化することができるので、血管新生過程の Vegfaa165 と細胞外マトリックスの影響を解析することができる。

RT-PCR の結果から、発生過程初期では vegfaa165 の発現量が高いに対し、Vegfaa121 の発現量は低い。発生が進みにつれて Vegfaa165 の発現量は減少し、Vegfaa121 の発現量は亢進する。本研究課題において、Vegfaa165 が細胞外マトリックスと結合することで Vegfaa の局在が制御することで発生過程で秩序だった血管網が形成されると仮説を立てた。vegfaa165 ΔHBD では、節間血管のパターニング異常を示した(図 2)。

本来 *Vegfaa165* が発生過程初期において節間に集積することで血管網のパターニングを制御すると思われるが、*vegfaa165 ΔHBD* では集積パターンが乱れるため、血管網のパターニングも乱れると考えられる。この結果から、*Vegfaa* のヘパリン結合能は発生過程において秩序だった血管網の形成に重要であることが示唆された。本研究では発生過程の血管新生に着目したが、成体での血管のパターニング、機能に重要である可能性もある。また、病態モデルにおいて異常を示す可能性も考えられる。マウスと同様にゼブラフィッシュでも、創傷治癒での血管新生や腫瘍血管新生の解析を行えるため、*Vegfaa* のヘパリン結合能に対する病的血管新生の影響を解析することができる。

Vegf/Vegfr2 シグナルを理解するためには、リガンドである *Vegfaa* だけでなく、受容体の *Vegfr2* についても解析する必要がある。しかし、これまでは抗 *Vegfr2* 抗体が作成されておらず、ゼブラフィッシュでは *Vegfr2* の解析が進んでいなかった。ゼブラフィッシュには *Vegfr2* の2つのパラログ、*kdr* と *kdr1* が存在する。これまで、*Kdr1*、*Kdr1* を検出できる抗体がなかった。また、*VEGFR2* に GFP を融合すると内在性の *VEGFR2* とは異なる局在を示すため、*VEGFR2* の局在の可視化できなかつた。Lawson 教授の研究室で抗 *Kdr1* 抗体が作成された。この抗 *Kdr1* 抗体が内在性の *Kdr1* を特異的に認識するか、ウエスタンブロットを行なって確認した。*Kdr1* 変異体 *kdr^{hu5088}* ではバンドが顕著に消失していたことから、抗 *Kdr1* 抗体は内在性の *Kdr1* を特異的に認識することが確認できた。

次に、抗 *Kdr1* 抗体を用いて免疫染色によりゼブラフィッシュの *Kdr1* の局在を調べた。血管特異的にシグナルが見られた(図 3)。ネガティブコントロールとして用いた *kdr^{hu5088}* ではシグナルが見られなかった。また、細胞内の局在を詳細に観察すると、*Kdr1* が一部に強く集積していた。おそらく HUVEC と同様に、ゴルジ装置に多く集積していると考えられる。これまで、培養細胞を用いて *Vegfr2* の局在が解析されてきたが、*in vitro* と *in vivo* では細胞を取り巻く環境が異なるため、発生過程における *Vegfr2* の局在を解析することができなかつた。*in vivo* で *Vegfr2* の局在の解析ができるようになったのは大きな進展である。

3. *Vegfaa/Vegfr2* シグナルの解析

Vegfr2 は *Vegfaa* が結合し活性化された後、エンドサイトースされ、下流のシグナルを伝達し、血管新生を誘導する。しかし、エンドサイトースがどのように制御されているのか不明な点が多い。*Rab5* は低分子量 G タンパク質ファミリーに属し、エンドサイトースを制御する。これまでの研究から、*shRNA* を用いた *in vitro* のスクリーニング結果から、血管新生には *Rab5C* が重要であることが示唆された。血管新生過程の *Rab5c* の機能を解析するため、*rab5c* モルフォリノ (MO) を 1 細胞期にインジェクションした。*rab5c* のノックダウンにより節間血管および中脳動脈で血管新生が阻害された。マウスやヒトでは *Rab5C* はユビキタスに発現しているため、血管内皮細胞の *Rab5C* が血管新生に

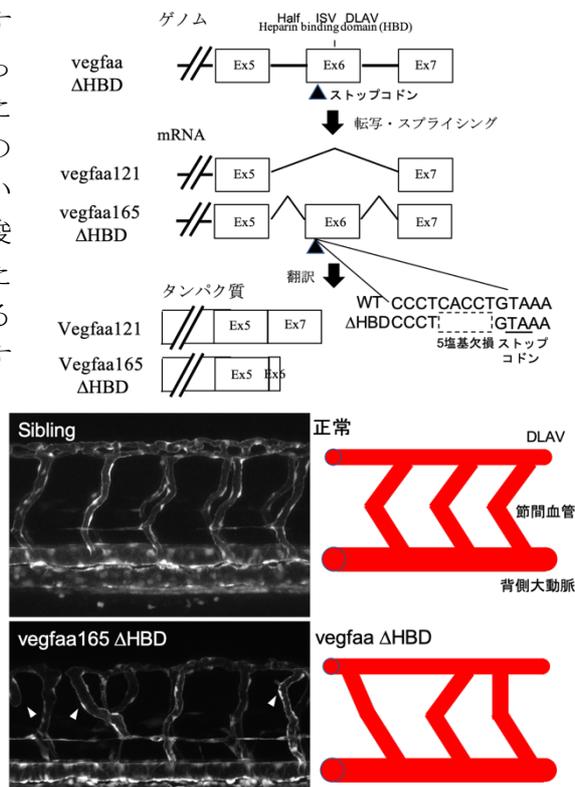


図 2. *vegfaa165 ΔHBD* 変異体

抗 *Kdr1* 抗体

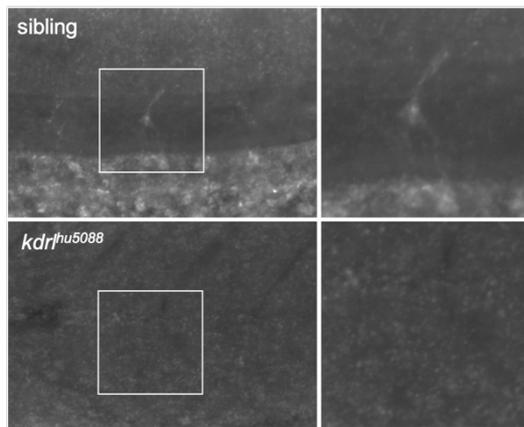


図 3. *Kdr1* の局在

重要か検討するために、*fli1a* プロモーターを用いて血管内皮細胞特異的に *mCherry-Rab5C* WT および DN を発現する *Tg(fli1a:mCherry-RAB5C WT)* と *Tg(fli1a:mCherry-RAB5C DN)* をそれぞれ樹立した。*Tg(fli1a:mCherry-RAB5C WT)* は *mCherry* が vesicle に局在しているのに対し、*Tg(fli1a:mCherry-RAB5C DN)* では *mCherry* が核周辺の一部に多く集積していた。これは *Rab5C* DN が活性化できないため、WT とは異なる局在を示していると考えられる。*Rab5c* DN を発現する Tg では、節間血管の血管新生の遅延が見られた(図 3)。さらに、中脳動脈の形成も阻害も見られ、受精後 5 日目では頭部、胸部で浮腫が見られた。この結果から、血管内皮細胞の *Rab5C* は血管新生に重要であることが示唆された。さらに、*Rab5c* の機能を解析するために、CRISPR/Cas9 により *Rab5C* KO の樹立を行なっている。

Rab5C が *Vegfr2* の発現を制御しているか検討するために、*Rab5C* の発現抑制により *Vegfr2* の発現量が減少するかウエスタンブロットにより確認した。*rab5c* MO をインジェクションすると、*Vegfr2* の発現量は減少した。さらに *Vegfr2* の下流シグナルが阻害されているか検討するために、*Tg(TP1:Venus-PEST)* を用いて Notch の活性を可視化した。*rab5c* MO のインジェクションにより、血管内皮細胞での *Venus-PEST* の発現は顕著に抑制された。他の組織でも *Venus-PEST* の発現が顕著に抑制されているが、*Rab5c* がユビキタスに発現しているためと考えられる。これらの結果から、*Rab5C* が *Vegfr2* のエンドサイトーシスを制御することで血管新生を制御していることが示唆された。

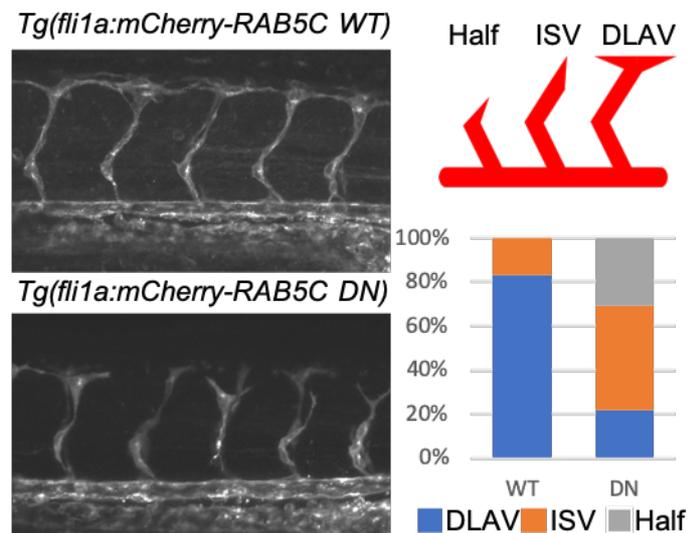


図 4. 血管内皮細胞特異的 *Rab5C* DN の発現による血管新生の抑制

血管内皮細胞において *Rab5c* がどのように活性化されているのか検討するために、*RIN2* に注目した。CRISPR/Cas9 により、*rin2* KO フィッシュの樹立を行なっている。*in vitro* の結果から、*Rin2* の発現抑制により血管新生が抑制された。ゼブラフィッシュにおいても *rin2* のノックダウンにより節間血管の伸長が抑制された。*Rin2* の発現抑制により、内皮細胞での *TP1* 活性は減少したが、それ以外の組織では顕著な減少は見られなかった。*Rin2* は血管内皮細胞に多く発現しているためであると考えられる。この結果から、血管内皮細胞の *Rab5C* は *Rin2* によって活性化されることが血管新生を制御することが示唆された。

興味深いことに、HUVEC では *Vegf* 非存在下では *rab5c* をノックダウンしても *Vegfr2* の発現量に影響は見られなかった。この結果から、*Rab5c* は *Vegfa* によって活性化した *Vegfr2* の endocytosis を特異的に制御していると示唆される。*Rab5C* がどのようにして *Vegf* 刺激により活性化した *Vegfr2* を特異的に選択しているのか今後の課題である。*Rab5c* がどのようにして活性化された *Vegfr2* の選択を行なっているのか今後解析を行いたい。

本研究内容は、データをまとめ論文の投稿準備を行なっている。