

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14526

研究課題名(和文)血管リモデリングを制御する血流刺激と細胞挙動

研究課題名(英文)Blood flow-mediated cell behaviors during vascular remodeling

研究代表者

高橋 淑子(Takahashi, Yoshiko)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：10183857

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):血管ネットワークの形成初期過程では、原始血管網が血管リモデリングと呼ばれる過程を経て、最終的に明瞭なパターンを獲得する。血管リモデリングには血流刺激が必要なことは古くから知られていたが、そのしくみはほとんどわかっていない。本研究では、血管リモデリングを支える細胞挙動とその制御機構の理解に向けて、新規実験系を確立した。2次元平面上でリモデリングが進行するトリ胚卵黄動脈をモデル系として、血流速度が内皮細胞の挙動変化に密接に関係していることを見出した。そこで、生体内微小環境における血流の定量化法を開発したところ、血管リモデリングの過程で、微小環境血流が刻々と変化する様子を捉えることができた。

研究成果の概要(英文):When the initial vascular network is formed during embryogenesis, primitive vascular plexus undergoes remodeling. Although it has been known that blood flow is important for the vascular remodeling, how the remodeling proceeds remained poorly known. In this study, toward understanding these mechanisms, we aimed at establishing a novel experimental system in which the blood flow and behaviors of endothelial cells were quantitatively measured in vivo. Using vitelline arteries that undergo massive remodeling in a 2-D structure of early chicken embryos, we succeeded in live imaging of remodeling vasculature. When we artificially stopped/attenuated the blood flow leaving the heart beat unaffected, the remodeling of vitelline artery was compromised. EGFP-labeled endothelial cells displayed dynamic behavior that was dependent on the blood flow. Dynamics of blood flow in micro-environment were also measured, providing a system in which vascular remodeling can be analyzed at the cellular level.

研究分野：発生生物学、細胞生物学、分子生物学、血管生物学

キーワード：血管 リモデリング 血流 トリ杯 細胞挙動 定量化

## 1. 研究開始当初の背景

血管リモデリングの過程では、ランダムに作られた原始血管網から、明瞭な血管パターンを作り出すためのダイナミックな形態変化が起こる。血管リモデリングは、個体発生や臓器再生、またガン化にも密接に関わっていることから、多くの研究者が注目している課題である。血管リモデリングの進行には血流刺激が必要であることは古くから知られているが、それが分子・細胞レベルでどのような制御を受けているのかという問題は、ほとんど手つかずのまま残されていた。また、従来の血管リモデリング研究の多くは、培養細胞を用いた *in vitro* 系の解析であり、実際の生体内でのリモデリングを解析できるモデル系は非常に限定的だった。

我々はトリ胚を用いて、この問題解決にとりこんでおり、血流と血管内皮細胞の挙動に密接な関係があることなどを見出していた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、血流と血管内皮細胞との関係を、細胞動態制御の視点から捉えるために、トリ胚を用いた解析系を最適化し、(1) 胚内血流の局所的操作法、(2) 胚内血管内皮細胞の局所的遺伝子操作法、(3) 胚内微小環境における血流変化の定量化法、の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

主にトリ胚を実験材料として用いた。トリ胚の卵黄動脈は、2次平面上でリモデリングを起こすために、リモデリング中の内皮細胞の挙動が高解像度で観察できるなど、他のモデル動物にはない利点がある。

## 4. 研究成果

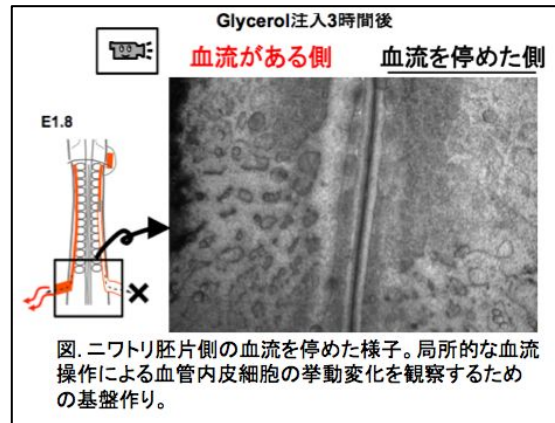
### (1) 胚内血流の局所的操作

従来、主に哺乳類を用いて行われてきた生体内血流操作は、主に心臓拍動の抑制等によるものであった。しかしこの方法だと、胚全体の血流が変化するために、結果として血管ネットワーク全体の形成が激しく損なわれるため、「どの血流がどの血管内皮細胞にどのような影響を及ぼしているのか」という疑問にはうまく答えることができなかった。

そこで本研究ではニワトリ胚を用いて、胚の片側だけの血流を人工的に操作するなど、血管や血流の居所操作法を探索した。粘度の高いグリセロール液を片側の背側大動脈に微小注入したところ、注入側の血流のみが有意に低下した(ほぼ停止する例もあった)

(図)。

また並行して、目的とする血管のみを局所的に破壊することで、その周囲の血流を止めるという方法にも取り組んだ。レーザー照射によって毒性を示す試薬を胚の片側に注入し、レーザーを照射したところ、注入側の血管ネットワーク形成が有意に低下した。



### (2) 胚内血管内皮細胞の局所的遺伝子操作法

さまざまに血流操作したときの血管内皮細胞の挙動を観察するためには、血管内皮細胞をモザイク状に標識する必要がある(内皮細胞すべてが一樣に標識されると、個々の細胞挙動の観察は困難である)。従来の血管内皮細胞特異的なトランスジェニック法は、Tie2 などの内皮細胞特異的プロモーターにレポーター遺伝子をつないだトランスジェニックマウスが主流であった。しかしここでは、胚内すべての血管がレポーターで標識されるため、我々の目的にはそぐわない。

そこで、トリ胚血管を局所的に遺伝子操作し、内皮細胞の EGFP-モザイク標識を試みた。目的とする血管にのみ遺伝子を導入するために、トリ胚の血流を利用したトランスフェクション法を用いた。他の研究室からのレポートによると、市販の遺伝子導入試薬(Lipofectamine など)は *in vivo* 遺伝子導入には適さないということであったが、我々は複数の遺伝子導入試薬について、それぞれ異なる濃度を用いた検定を行った。結果として、汎用性の高い Lipofectamine2000 が本研究の目的に使用可能であることがわかった。

### (3) 胚内微小環境における血流変化の定量化

発生中の胚では、血管ネットワークの様子は刻々と変化する。このとき、血管中の血流も激しく変化し、これらの変化が血管内皮細胞の挙動変化を引き起こすと考えられる。しかしながら、生体内における血流を定量的に

解析する技術はあまり発達していなかった。そこで本研究では、トリ胚の卵黄動脈付近の血管内血流の様子をビデオ撮影し、そこに流れる赤血球細胞の移動速度を、画像操作ソフトなどを用いて計算するという方法を導入した。並行して、蛍光標識したビーズを胚血管内に注入し、それらの移動の様子のビデオ撮影も試みた。現在、さまざまな画像ソフトを試行中であり、今後さらに解像度の高い定量化にむけた解析を行う予定である。

#### 今後の展望

時・空間的に変化する微小血流の速度を生体内で測定できれば、その速度から“ずり応力”が計算される。本研究で得られた成果をさらに発展させることにより、ずり応力が血管内皮細胞の挙動に与える影響を定量的に解析できることが期待される。本研究によって、「血流の違いが内皮細胞の移動様式の違いを生み出し、そしてその違いが後の血管リモデリングという巨視的な形態変化を引き起こす」というシナリオを、細胞動態とその制御機構の実態をとおして理解する道筋がつけられたと判断している。

このように、血流刺激によってコントロールされる血管リモデリングの基本原理の解明にむけた挑戦を行い、萌芽的成果が発展した本研究は、今後血管やリンパ管などの脈管系の形成機構の理解や、それらの機能破綻による病気の治療技術の開発に向けて、新たな道筋を提供できることが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Watanabe, T., Nakamura, R., Takase, Y., Susaki, E., Ueda, H., Tadokoro R. and \*Takahashi, Y.: Comparison of the 3-D patterns of the parasympathetic nervous system in the lung at late developmental stages between mouse and chicken. *Developmental Biology*, in press

Watanabe, T., Kiyomoto, T., Tadokoro, R., Takase, Y., and \*Takahashi, Y.: Newly raised anti-VAcHT and anti-ChAT antibodies detect cholinergic cells in chicken embryos. *Dev. Growth Differ.*, 59(9):677-687 (2017) 査読有 doi: 10.1111/dgd.12406.

Saito, D., Tamura, K., and \*Takahashi, Y.: Early segregation of the adrenal cortex and gonad in chicken embryos.

*Develop. Growth Differ.*, 59(7):593-602 (2017) 査読有 doi: 10.1111/dgd.12389.

\*Nakanoh, S., Fuse, N., Tadokoro, R., Takahashi, Y. and \*Agata, K.: Jak1/Stat3 signaling acts as a positive regulator of pluripotency in chicken pre-gastrula embryos. *Developmental Biology*, 421(1): 43-51 (2017) 査読有 doi: 10.1016/j.ydbio.2016.11.001.

Tadokoro, R., Murai, H., Sakai, K., Okui, T., Yokota, Y. and \*Takahashi, Y.: Melanosome transfer to keratinocyte in the chicken embryonic skin is mediated by vesicle release associated with Rho-regulated membrane blebbing. *Scientific Reports*, 6: 38277 (2016) 査読有 doi: 10.1038/srep38277.

Atsuta, Y. and \*Takahashi, Y.: Early formation of the Müllerian duct is regulated by sequential actions of BMP/Pax2- and FGF/Lim1 signaling. *Development*, 143:3549-3559 (2016) 査読有 DOI:10.1242/dev.137067

Atsuta, Y. and \*Takahashi, Y.: FGF8 coordinates tissue elongation and cell epithelialization during early kidney tubulogenesis. *Development*, 142:2329-2337 (2015) 査読有 doi: 10.1242/dev.122408.

〔学会発表〕(計20件)

Takahashi Y., Tail Development and Secondary Neurulation. 招待講演, 国際シンポジウム “Amphibian development, regeneration, evolution and beyond” 広島大学 2018.03.13

高橋淑子, しっぽの中の神経系, 招待講演, 第19回名市大頭脳循環セミナー、名古屋市立大学、2018.03.1

Takahashi Y., Live-imaging analyses of melanosome transfer in the 3-D skin. (Frontiers Symposium “Skin regeneration, pigmentation and appendages”) 招待講演, The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2017.12.16

Takahashi Y., Cellular dynamism during secondary neurulation in the forming tail. 招待講演, 熊本大学博士課程教育リーディングプログラム/グローバルな健康生命科学パイオニア養成プログラム HIGO, 最先端研

究セミナー、熊本大学発生医学研究所、  
2017.10.25

Takahashi Y., Cellular dynamism during neurulation in the tail region. 招待講演, Institut de la Vision, Paris, 2017.09.25

Takahashi Y., Cell-cell communications mediated by plasma membrane vesicles allow wide spread of pigmentation in the skin. 招待講演, Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Madrid, 2017.09.21

高橋淑子: 皮膚呈色における膜小胞を介した細胞間メラニン輸送。第 69 回日本細胞生物学会大会、仙台国際センター、  
2017.06.14

Takahashi, Y.: Growth coordination between external body and internal tissues. Symposium of "Organogenesis" 第 50 回日本発生生物学会大会、船堀ホール (東京) 2017.05.12

高橋淑子: EMT and MET during formation. 第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2016.12.1

Takahashi, Y.: Melanosome transfer from melanocytes to keratinocytes is mediated by plasma membrane vesicles. The 27th CDB Meeting 「Body surface tactics: cellular crosstalk for the generation of super-biointerfaces」理化学研究所多細胞システム形成研究センター、2016.11.14

Takahashi, Y.: Cell-cell communications mediated by plasma membrane vesicles allow wide spread pigmentation in the skin. MedUni Vienna, Austria, 2016.09.26

Takahashi, Y.: Cell-cell communications mediated by plasma membrane vesicles allow wide spread pigmentation in the skin. European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Germany, 2016.09.21

高橋淑子: もう一つの神経形成: Secondary Neurulation, 第 59 回日本神経化学学会・第 38 回日本生物学的精神医学会合同年会 2016 FUKUOKA、2016.09.9

Takahashi, Y.: 【Anne McLaren Memorial Lecture Award】(ISD Award Lecture) "Tale of tails" SDB 75th Annual Meeting/ISD 19th International Conference, USA, 2016.08.6

Takahashi, Y.: Neural Crest and Its

Neighbors. "Symposium: Stem Cells, Gene Regulatory Networks and the Evolution of Vertebrates" California Institute of Technology, 2016.1.30

Takahashi, Y.: Dynamic cell behavior during tubule formation and vascular development (Alumni Talk) CDB Retreat 2015, 2015.9.29

Takahashi, Y.: The tail story. (Organizer & Invited speaker) Symposium of Foundation des Treilles "Cell- and tissue communication in organogenesis: cutting edge approaches," Les Treilles Foundation, France, 2015.9.21-26

Takahashi, Y.: What is the tail? しっぽを知る (Symposium organizer) 第 48 回日本発生生物学会大会、つくば国際会議場、  
2015.6.2

高橋淑子: 「脊椎動物の器官形成 ~ 細胞の声を聞きながら ~」第 48 回日本発生生物学会大会、つくば国際会議場、2015.6.2

高橋淑子: 「もう一つの脊髄 ~ 脊椎動物の進化から脳・脊髄を考える ~」第 29 回日本医学学会総会 2015 関西、国立京都国際会館、2015.4.12

〔図書〕(計 14 件)

Tadokoro, R., Shikaya, Y. and \*Takahashi, Y.: (Review) Wide coverage of the body surface by melanocyte-mediated skin pigmentation, *Developmental Biology*, in press

\*Takahashi, Y., Kudo, R., Tadokoro, R. and Atsuta, Y.: (Review) Coordination between body growth and tissue growth: Wolffian duct elongation and somitogenesis proceed in harmony with axial growth. *Int J Dev Biol.*, 62(1-2-3):79-84 (2018) 査読有  
doi: 10.1387/ijdb.170290yt.

\*Takahashi, Y., Takeda, H.: "The Amazing Journey from Egg to Adult": An embryology exhibition at the National Museum of Nature and Science. *Dev. Growth Differ.*, 60(2):85-86 (2018) 査読有  
doi: 10.1111/dgd.12428.

川地輝明、下北英輔、\*高橋淑子: (総説) 「二分脊椎症の理解に向けた Secondary neurulation の研究」小児の脳神経 (日本小児神経外科学会) 42(4):325-326 (2017) 査読有

田所竜介、\*高橋淑子: 「肌の色が決まる仕

組み：メラニン色素の細胞間輸送」COSMETIC STAGE (株)技術情報協会 12(1):1-6 (2017)

\*Tadokoro, R. and \*Takahashi, Y.: (Review) Intercellular transfer of organelles during body pigmentation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 45:132-138 (2017) 査読有

doi: 10.1016/j.gde.2017.05.001.

\*Hardtke, CS. and \*Takahashi, Y.: (Editorial overview) Developmental mechanisms, patterning and evolution: Developmental patterning: from stochasticity to plasticity. *Current Opinion in Genetics & Development*, 45: iv-v. (2017) 査読有

doi: 10.1016/j.gde.2017.05.002.

\*高橋淑子、田所竜介：総説「メラニン色素が移動する過程を解明」化学、(株)化学同人、Vol.7 (2017)

宮正樹(著) 斎藤成也(監修), 塚谷裕一(監修), 高橋淑子(監修): 「新たな魚類大系統」シリーズ・遺伝子から探る生物進化4 (慶應義塾大学出版会) (2016) 215

榎原恵子(著), 斎藤成也(監修), 塚谷裕一(監修), 高橋淑子(監修): 「植物の世代交代制御因子の発見」シリーズ・遺伝子から探る生物進化3 (慶應義塾大学出版会) (2016) 190

入江直樹(著), 斎藤成也(監修), 塚谷裕一(監修), 高橋淑子(監修): 「胎児期に刻まれた進化の痕跡」シリーズ・遺伝子から探る生物進化2 (慶應義塾大学出版会) (2016) 152

岸田拓士(著), 斎藤成也(監修), 塚谷裕一(監修), 高橋淑子(監修): 「クジラの鼻から進化を覗く」シリーズ・遺伝子から探る生物進化1 (慶應義塾大学出版会) (2016) 142

\*高橋輝明, \*高橋淑子: 「神経と血管のワイヤリング」新・血栓止血血管学 血管と血小板, 57-64 (2015)

\*Saito, D. and \*Takahashi, Y.: (Review) Sympatho-adrenal morphogenesis regulated by the dorsal aorta. *Mech Dev.*, 138(1): 2-7 (2015) 査読有

doi: 10.1016/j.mod.2015.07.011.

〔その他〕

ホームページ等

<http://develop.zool.kyoto-u.ac.jp/takahashi.html>

高橋淑子：岩波書店「科学」の「コラム」レギュラー著者 (2017.10～)

高橋淑子, 細胞の声を聞く たった一つの卵から形ができてくる不思議, 京都大学 ELPs 講義, 2017.07.1

高橋淑子：朝日新聞デジタル版

「webronza」のレギュラー著者 (2017.06～)

高橋淑子, 【発生学おもしろ Duo トーク】企画展「卵からはじまる形づくり」「骨は語る - 骨のかたちと骨のできかた -」国立科学博物館, 2017.04.16

(国内国立科学博物館において 2017.04.4～06.11 に開催された企画展示「卵から始まるかたちづくり」にて、得られた成果を出展)

高橋淑子, 「卵から体ができる仕組み」(招待講義) NPO 法人大阪府高齢者大学校「宇宙と生命の神秘に遭遇する科」講義, 大阪国際会議場, 2017.02.6

Takahashi, Y., "My Science Career" (シンポジウム パネリスト) シンポジウム The Nobel Prize Inspiration Initiative, 京都大学紫蘭会館, 2016.11.9

高橋淑子, 「卵から形ができる不思議」(招待講義) グローバル講演会, 神戸国際中学校・高等学校, 2016.08.27

高橋淑子：5th Anne McLaren Award 受賞, International Society of Differentiation, USA, 2016.08.6

高橋淑子, 「卵から形ができる不思議」京都大学 ELCAS, 2016.07.17

高橋淑子, 細胞の声を聞く たった一つの卵から形ができてくる不思議, 京都大学 ELPs 講義, 2016.07.9

高橋淑子：放送大学特別講義「細胞の声を聞く」45分間講義 2012-2017年度

高橋淑子, 「しっぽの中の神経系」(招待講演) 新適塾「脳はおもしろい」第11回会合, 千里ライフサイエンスセンター, 2016.01.7

高橋淑子, 「しっぽの科学：発生学者は「しっぽ」をどうみるか」第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学大会合同大会, 市民公開講座, 神戸国際会議場, 2015.12.04

高橋淑子, 「個体発生にみる細胞のドラマ」(招待特別講演) 第4回エヌエフ基金 研究開発奨励賞 研究発表会・表彰式, 学士会館, 2015.11.13

高橋淑子, 「細胞の声を聞く」(招待講演) 集まれ! 理系女子東京大会, 第7回女子生徒による科学研究発表交流会, 慶應義塾大学三田キャンパス, 2015.10.31

高橋淑子,「卵から形が作られる不思議」  
～細胞の声をきく～(招待・基調講演)平成  
27年度大阪府生徒研究発表会～大阪サイエ  
ンスデイ～スーパーサイエンスハイスクー  
ル生徒研究発表会 部,八尾市文化会館,  
2015.10.24

高橋淑子,「動物発生における細胞の振る  
舞い～細胞間コミュニケーションから組織  
形成まで～」(招待講演)日本光脳機能イメ  
ージング学会,星陵会館,2015.7.25

高橋淑子,細胞の声を聞く～次代の組織  
とは?～(招待講演 学術集会)第1回クオ  
リア AGORA 2015,京都大学楽友会館,  
2015.6.25

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

高橋 淑子 (TAKAHASHI, Yoshiko)  
京都大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号: 10183857

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

國分 寛司 (KOKUBU, Hiroshi)  
京都大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号: 50202057