

令和元年6月13日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08450

研究課題名(和文)鳥類キメラ・蛍光標識・網羅的遺伝子発現解析を用いた冠状血管発生機構の解明

研究課題名(英文)Origin of coronary artery endothelial cells in avian heart

研究代表者

中島 裕司(Nakajima, Yuji)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80207795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：冠状動脈内皮細胞(CE)の起源について、鳥類キメラ、蛍光標識、EGFP-Tol2を用いて明らかにした。CEの起源とされていた心外膜原基は表層の中胚葉性上皮とその内側の静脈洞内皮由来の間葉細胞で構成されており、表層から心外膜、平滑筋が発生し、内側の間葉からCEが発生した。心臓の領域別のCEの起源について検討した結果、心室自由壁心外膜下のCEは静脈洞に由来し、心室心内膜直下のCEは心室心内膜に由来していた。心室中隔のCEは静脈洞および心室心内膜由来のCEが混在していた。また冠状動脈主幹部のCEの多くは静脈洞に由来していた。以上の結果からCEの起源は領域特異性をもって静脈洞および心室心内膜であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで鳥類心臓の冠状動脈内皮細胞の起源は心外膜原基と考えられており、遺伝学的手法を用いたマウスの結果と異なっていた。本研究では4種類のニワトリ・ウズラキメラを開発し鳥類胚の冠状動脈内皮細胞もマウスと同様の起源であり進化的に保存されていることを証明した点で学術的意義が高い。また冠状動脈の動脈硬化によって発症する虚血性心疾患は予防や再生医療のターゲットになっており、病態の主役となる内皮細胞の起源と発生メカニズムを明らかにすることは社会的にも意義が高い。

研究成果の概要(英文)：The origin of coronary endothelial cells (CE) has been investigated in avian hearts, and the CE originate from the proepicardial organ (PEO). Genetic studies in mouse showed the major source of CE is the sinus venosus (SV) endothelium or ventricular endocardium. To clarify and reconcile the differences between avian and mouse, we examined the source of CE in avian hearts. Using an EGFP-Tol2 and fluorescent dye, four types of quail-chick chimeras were made and QH staining was performed. The PEO consisted of SV endothelium-derived inner cells and surface mesothelium-derived cells. The majority of CE in the coronary stems, ventricular free wall, and dorsal ventricular septum originated from the SV endothelium. The ventricular endocardium contributed mainly to the septal artery and subendocardial CE. Surface PEO cells differentiated into smooth muscle cells. In avian heart, CE had a heterogeneous in origin, and the origin of CE was basically the same as that in mouse.

研究分野：解剖学含む組織学発生学

キーワード：心臓 冠状動脈 内皮細胞 起源

1. 研究開始当初の背景

心臓の冠状動脈は大動脈基部より起始しステレオタイプなパターンを持って心臓に分布する。冠状動脈の閉塞は狭心症や心筋梗塞を引き起こす。また先天性冠状動脈形成異常（たとえば冠状動脈肺動脈起始症や冠状動脈静脈瘻）は乳児期や学童期において虚血による心不全や突然死の原因になる。冠状動脈の形成過程は1980年代には大動脈から冠状動脈が心臓に向かって伸長する outgrowth 説が信じられていたが、詳細な形態観察から静脈洞内皮細胞や心室心内膜から冠状動脈内皮細胞索が形成され大動脈基部に侵入する ingrowth 説も提唱されていた。1990年代に入り鳥類胚を用いた研究により冠状動脈内皮細胞の起源が静脈洞腹側に形成される心外膜原基であることが示され、原始心外膜由来の間葉細胞から冠状動脈内皮細胞、中膜平滑筋、外膜線維芽細胞が発生することが示された。しかし2010年代に入り、マウス遺伝学的手法を用いた研究により、冠状動脈内皮細胞の起源は静脈洞内皮細胞あるいは心室心内膜由来であることが報告された。

2. 本研究の目的

本研究の目的は鳥類胚を用いて（1）心外膜原基の組織構成を詳細に検討し、（2）鳥類冠状動脈内皮細胞の起源を再検討し明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究では図1に示すように蛍光標識法、EGFP-To12を用いて目的の細胞を標識し、4種類のウズラニワトリキメラを作製し、標識した細胞が冠状動脈内皮細胞に分化するかについて直接的に観察した。ウズラ胚由来の内皮細胞はウズラ内皮細胞特異的抗体QH1で検出した。作製したキメラは、

（1）ウズラ胚静脈洞内皮細胞を蛍光色素あるいはEGFP-To12で標識しニワトリ胚に同所移植（図1A）、（2）ウズラ心外膜原基表層細胞を蛍光色素あるいはEGFP-To12で標識しニワトリ胚に同所移植（図1B）、（3）ウズラ静脈洞内皮細胞を赤色の蛍光色素（DiI）、心外膜原基表層細胞を緑色蛍光色素（CFSE）で標識しニワトリ胚に同所移植（図1C）、（4）ニワトリ胚心室心内膜をEGFP-To12で標識し未標識のウズラ胚静脈洞+心外膜原基を移植（図1D）である。

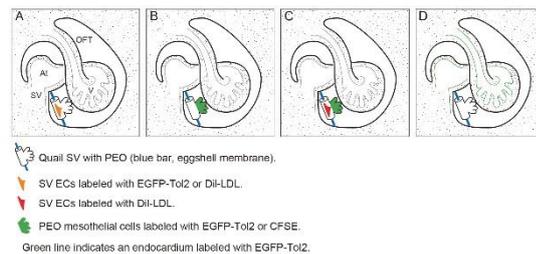


図1

4. 研究成果

（1）心外膜原基の組織構成：図1キメラAおよびB（蛍光色素標識）を用いて検討した。その結果、心外膜原基内側の間葉細胞は隣接する静脈洞内皮細胞に由来していた（図2A）。一方、表層の細胞は心膜体腔臓側葉に由来するWT1陽性細胞で構成されていた（図2B）。

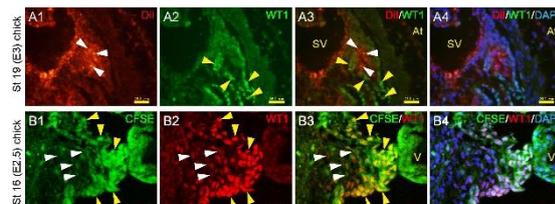


図2

(2) 心室自由壁の冠状動脈内皮細胞の起源：図1のキメラA (EGFP-To12 標識) 胚を8日胚まで孵卵し、QH1 免疫染色 (赤色蛍光で検出) とEGFP (緑色蛍光) の検出を行った。移植したウズラ静脈洞内皮細胞に由来する冠状動脈内皮細胞 (赤緑蛍光共陽性) は心室自由壁 (図3 A-Dの矢尻) および冠状動脈主幹部内皮細胞に認められた (図3Dの矢尻)。また血管中膜が未形成な冠状静脈の内皮細胞にも認められた (図3Eの矢印) 以上の結果から心室自由壁ならびに冠状動脈主幹部の内皮細胞は静脈洞内皮細胞に由来していることが明らかになった。すなわち静脈洞内皮細胞は心外膜原基を介して原始心外膜と共に心室表面に遊走し冠状動脈内皮細胞に分化したものと考えられた。

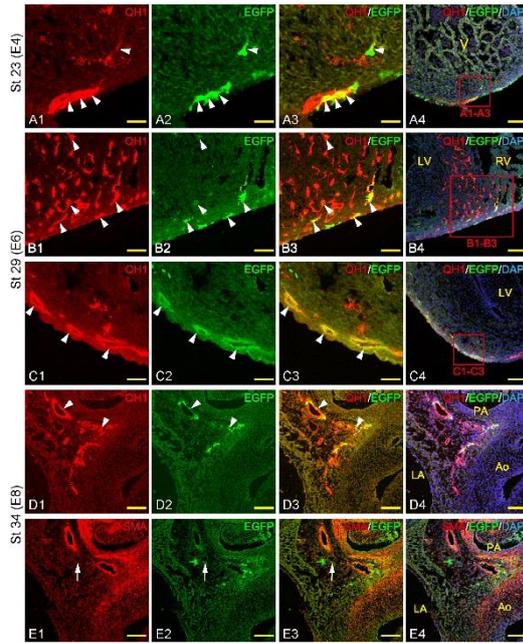


図3

(3) 冠状動脈中膜平滑筋の起源：図1キメラB (EGFP-To12 標識) を用いて検討した。発生中の原始心外膜下の間葉細胞にはEGFP 陽性の心外膜原基表層由来の細胞が認められ、一部QH1 陽性であった (図4A, B 矢尻)。8日胚の冠状動脈には平滑筋アクチン陽性の中膜が形成されており中膜平滑筋にEGFP 陽性の心外膜原基表層由来の細胞が認められ (図4C 矢印)、内皮細胞にも認められた (図4D 矢尻)。EGFP 陽性細胞のうち平滑筋アクチン陽性細胞は約50%であり、QH1 陽性細胞は20%未満であった。

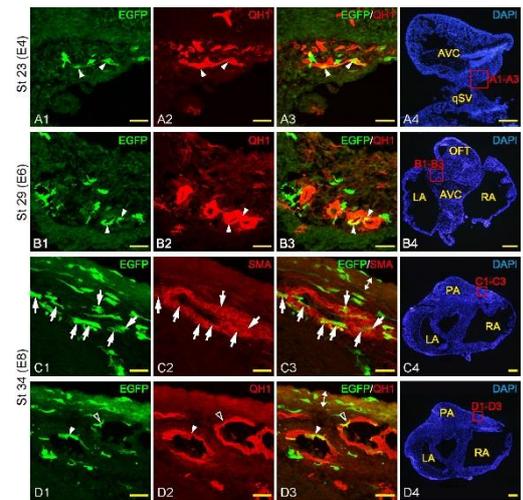


図4

(4) 心外膜下に存在するQH1 陽性内皮原基細胞の起源：図1Cのキメラを用いて4日胚まで孵卵し、心外膜下の細胞について検討した。発生中の原始心外膜はCFSE 陽性の心外膜原基表層の細胞に由来していた (図5A, D 白枠矢尻)。一方、心外膜下にはQH1 陽性 (青色蛍光) の冠状動脈内皮細胞原基が認められ、これらの細胞はDiI 陽性の静脈洞由来の細胞であった (図5B, E 矢印)。QH1 陽性細胞のうち約50%は静脈洞由来のDiI 陽性細胞で占められ、心外膜原基表層由来のCFSE 陽性細胞は5%であった (図5G グラフ)。以上の結果から、発生途中の冠状動脈内皮原基細胞は主に静脈洞に由来することが示され、静脈洞由来細胞と心外膜原基表層細胞の比は10対1程度であることが示唆された。

(5) 心室中隔の冠状動脈内皮細胞の起源：
 図 1D のキメラを用いて 8 日胚で検討した。心室自由壁の冠状動脈内皮細胞は全層にわたり移植したウズラ静脈洞+心外膜原基に由来する QH1 陽性の赤色蛍光細胞で占められ、心室心内膜に由来する EGFP 陽性細胞は認められなかった (図 6 A, B)。冠状動脈主幹部の内皮細胞の 80%は静脈洞由来 (図 6 D, E 矢印および図 7 グラフ) であったが心室心内膜由来の細胞も認められた。(図 6 D, E 矢尻および図 7 グラフ)。心室中隔の冠状動脈内皮細胞は静脈洞由来の内皮細胞 (図 6 G 矢印) と心室心内膜由来する細胞 (図 6 G 矢尻) が認められた。心室中隔の背側では静脈洞由来の細胞と心室心内膜由来の細胞は同程度の割合であったが、心室中隔中央から腹側では静脈洞由来の冠状動脈内皮細胞は 20%程度であった (図 7 グラフ)。

(6) 新生仔心室自由壁の冠状動脈内皮細胞の由来：ウズラ胚にニワトリ静脈洞+心外膜原基を移植し、新生仔心臓の冠状動脈に緑色蛍光標識レンズマメレクチンを注入し冠状血管内皮細胞を標識した。新生仔心室自由壁の心内膜直下の内皮細胞は QH1 陽性の心室心内膜由来の細胞が認められ (図 8 矢印)、心外膜下の冠状血管内皮細胞は QH1 陰性の移植したニワトリ静脈洞由来の内皮細胞で占められていた。このことから新生仔心臓の心室自由壁心内膜直下の冠状血管内皮細胞は心室心内膜に由来することが判明した。

(7) 結論：鳥類胎児期早期の冠循環開始直後の心室自由壁の冠状動脈内皮細胞は主に静脈洞に由来し、心室中隔の冠状動脈内皮細胞は静脈洞および心内膜に由来していた (図 9)。一方、新生仔心臓の心室自由壁心内膜直下の冠状動脈内皮細胞は心室心内膜に由来し、心外膜直下は静脈洞に由来することが示された。また心外膜原基表層細胞は一部 (10%未満と考えられる) 冠状動脈内皮細胞に分化したが主に冠状動脈

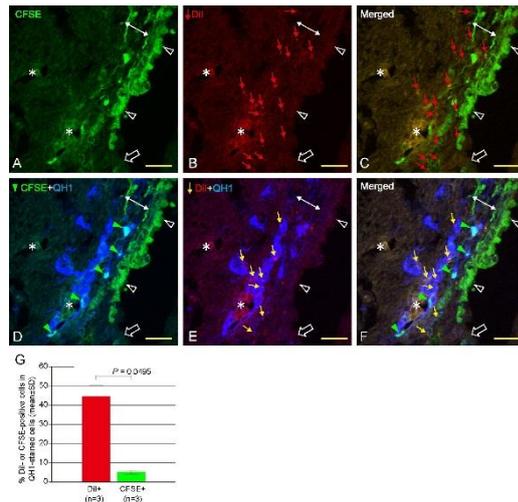


図 5

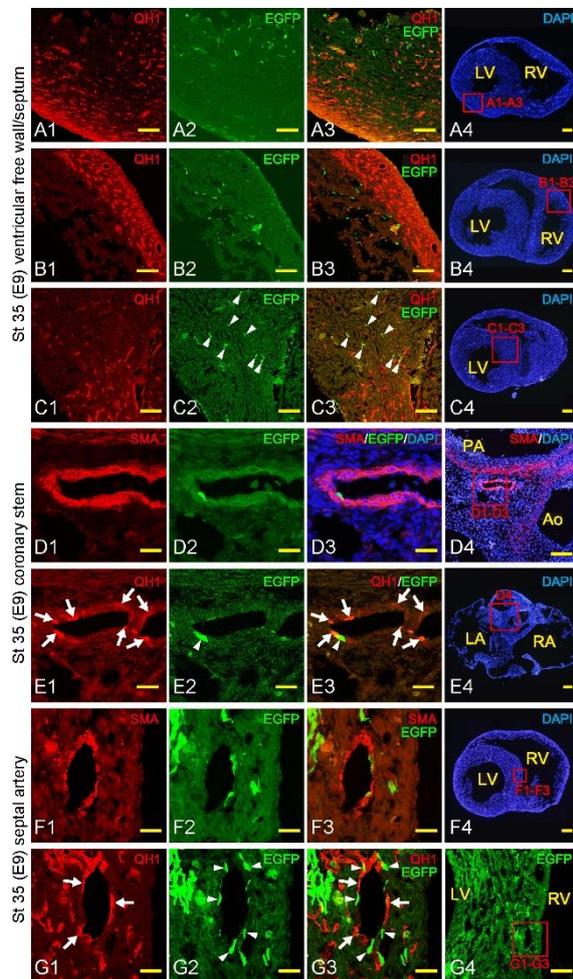


図 6

中膜平滑筋に分化することが明らかになった。以上の結果から鳥類（ニワトリ、ウズラ）および哺乳類（マウス）の冠状動脈内皮細胞の起源は保存されていることが示された。

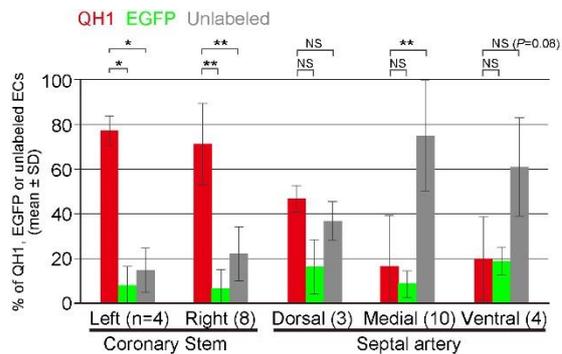


Fig 7

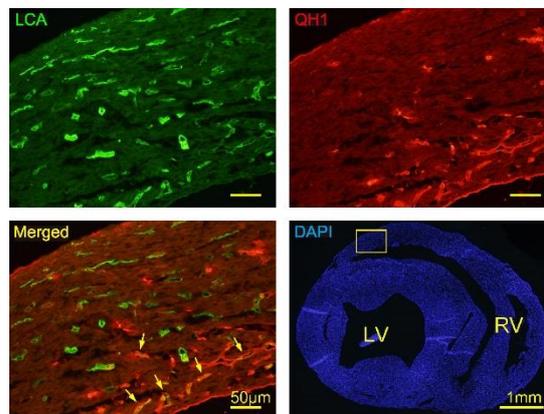


Fig 8

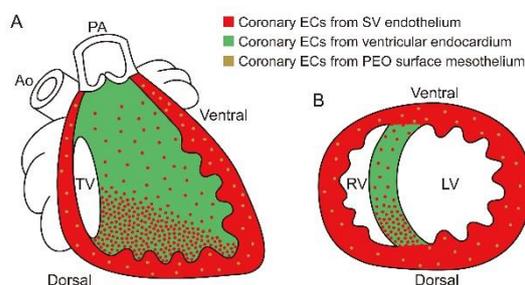


Fig 9

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

- ① Kato M, Narematu M, Nakajima Y. Anatomy of the coronary artery and cardiac vein in the quail ventricle: patterns are distinct from those in mouse and human hearts. *Anat Sci Int* 93:533-539, 2018 <https://doi.org/10.1007/s12565-018-0446-x> 査読有
- ② Kamimura T, Yamagishi T, Nakajima Y. Avian coronary endothelium is a mosaic of sinus venosus- and ventricle-derived endothelial cells in a region specific manner. *Dev Growth Differentiation* 60 (2):97-111, 2018. DOI: 10.1111/dgd.12422 査読有

〔学会発表〕 (計 5 件)

- ① 上村竜也、山岸敏之、江尻貞一、中島裕司 冠状血管内皮細胞の起源 第 124 回日本解剖学会総会全国学術集会 2019 年 3 月 27 日～29 日 新潟県新潟市朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター
- ② 上村竜也、山岸敏之、江尻貞一、中島裕司 EGFP-To12 細胞標識システムとウズラ-ニワトリキメラ胚を用いた冠状血管内皮細胞の起源探索 第 78 回日本解剖学会中部支部学術集会 2018 年 10 月 13 日～14 日 富山県富山市 富山県民会館
- ③ Kamimura T, Yamagishi T, Nakajima Y. Heterogeneous origin of coronary endothelial cells in avian embryonic heart. 18th International Congress of

Developmental Biology. University Culture Center, National University of Singapore, Singapore. 18-22, June 2017.

- ④ 上村竜也、山岸俊之、中島裕司 鳥類キメラ、蛍光色素標識、EGFP-To12 システム、器官培養を用いた冠状血管内皮細胞の起源の検討。第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017 年 3 月 28 日～30 日、長崎県長崎市、長崎大学坂本キャンパス
- ⑤ 加藤雅大、馴松麻悠、中島裕司 ウズラ冠状動脈走行の観察：主幹部から中隔に最大枝を出す。第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017 年 3 月 28 日～30 日、長崎県長崎市、長崎大学坂本キャンパス