

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：33703

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06132・19K21247

研究課題名（和文）冠状血管内皮の起源探索-鳥類キメラ胚を用いた静脈洞内皮細胞のふるまい解明-

研究課題名（英文）Search for origin of coronary endothelium-Elucidation of behavior of sinusoidal endothelial cells using chimeric embryos of avian-

研究代表者

上村 竜也 (Tatsuya, Kamimura)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：60825628

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：冠状血管内皮細胞の起源について、静脈洞内皮細胞・心外膜原基・心室心内膜等が報告されている。

本研究の目的は静脈洞内皮細胞がどのようにふるまうことで冠状血管内皮細胞に編入していくのかを明らかにすることである。その方法として、ウズラニワトリキメラ、蛍光色素標識、ウズラ内皮細胞を特異的に認識するマーカー(QH1)等を用いて検討をおこなった。その結果、心室自由壁の冠状血管内皮細胞は静脈洞内皮細胞に由来することが示された。一方で心室中隔の冠状血管内皮細胞に対しては静脈洞内皮細胞の寄与は少なく、他の起源細胞に由来することが明らかとなり、その正体は心室心内膜であることが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義としては、冠状血管内皮について心臓の各領域特異的に由来が分かれることに着目し、その中で静脈洞内皮細胞の挙動の一部を解明したことが挙げられる。さらに、この領域特異性は発生時期によっても変化する可能性があることを見出し今後の発展性の存在が判明したことも学術的意義として大きいと考える。社会的意義としては、冠状血管の形成過程の一端を解明したことにより心筋梗塞をはじめとする疾患に対する再生医療を含めた今後の治療方法の開発に役立つと考えられる。しかしながら冠状血管内皮細胞への効率的な分化促進方法など未解明な部分も多く臨床的に役立つためには今後も継続的な研究が必要と考えている。

研究成果の概要（英文）：With respect to the origin of coronary endothelial cells, sinus venosus endothelial cells, epicardial primordia, ventricular endocardium have been reported. The purpose of this study is to clarify how the sinus venosus endothelial cells behave and integrate into coronary endothelial cells. As the method, studies were performed using a quail chicken chimera, a fluorescent dye label, a marker (QH1) that specifically recognizes quail endothelial cells, and the like. As a result, it was shown that coronary endothelial cells of the ventricular free wall were derived from sinus venosus endothelial cells. On the other hand, the contribution of sinus venosus endothelial cells to coronary vascular endothelial cells in the ventricular septum was small, and it was clarified that they originated from other origin cells, suggesting that their identity is the ventricular endocardium.

研究分野：心臓発生学

キーワード：心臓 冠状血管 発生 内皮細胞 キメラ胚 冠動脈

1. 研究開始当初の背景

冠状血管内皮細胞の起源についてはこれまで、3つの候補(心外膜原基 Mikawa & Fischman., 1992、静脈洞内皮細胞 Red-Horse et al., 2010、心室心内膜細胞 Wu et al., 2012) が提唱されてきた。しかし、それらの細胞群が冠状血管内皮細胞となる形成過程については十分な報告がなく不明な点が多い。特に、静脈洞内皮細胞と心室心内膜細胞については血管造影を含め、機能的な冠状血管としての担保のある報告がなく、詳細な解析が望まれている。冠状血管の初期形成以降の成熟過程については、出生後マウスを用いた報告(Tian et al., 2014) があるが、これについても冠状血管内皮細胞の起源の考察にのみ終始しており、その起源細胞がどのようにふるまうのか詳細な解析が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では発生学研究上、極めて有効な手法であるウズラ胚とニワトリ胚のキメラモデルと多種類のマーカーを用い、冠状血管形成過程および成熟冠状血管内皮細胞の起源解明を目指す。

3. 研究の方法

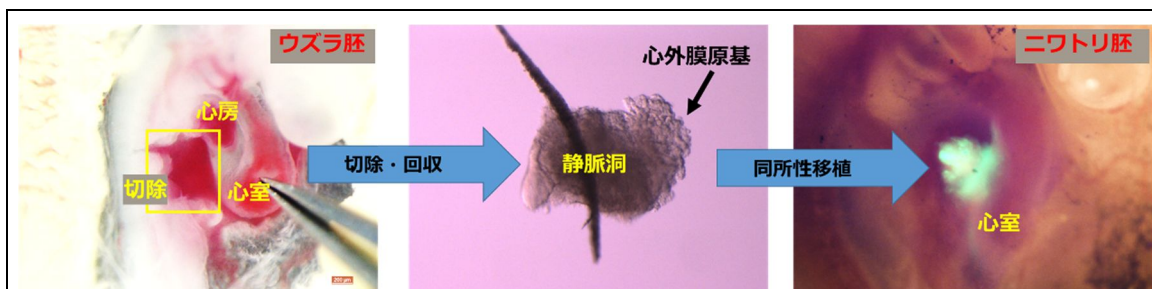
本研究では、成熟冠状血管内皮細胞の起源をウズラ-ニワトリキメラ胚とウズラ内皮細胞を特異的に認識する抗体に対する免疫組織染色を中心とした手法を用いて検討し、冠状血管初期形成から成熟過程までの静脈洞内皮細胞のふるまいを解明することが目的である。

【実験材料と方法】

冠状血管内皮細胞の起源を知るためにウズラ-ニワトリキメラ胚を作製する。具体的には、2.5日ウズラ胚から静脈洞および心外膜原基を取り出し、同じく2.5日ニワトリ胚に対し、同所性に移植する(図1)。

このウズラ-ニワトリキメラ胚では、冠状血管の循環開始期の心室自由壁において、静脈洞はウズラ(ホスト)由来、心筋および心内膜はニワトリ(ドナー)由来となる(予備実験により確認済み)。

よって、このキメラ胚心臓を発生ステージごとに詳細に観察し、どの発生段階から静脈洞内皮細胞が冠状血管内皮細胞として編入されるのかを多種のマーカー(ウズラ内皮細胞を特異的に認識するQH1抗体や、灌流している血管内皮特異的に標識できるレクチン抗体など)を用いて検証する。併せて、静脈洞内皮細胞が冠状血管内皮細胞として編入する際に発現していると考えられる重要因子(VEGF, FGF等)を組織免疫染色により探索する。また、静脈洞内皮細胞の器官培養を行い、候補因子の機能実験(過剰発現と阻害)も実施する。



(図1) ニワトリ-ウズラキメラの作製

2.5日ウズラ胚から静脈洞(心外膜原基を含む)を取り出し、2.5日ニワトリ胚へ同所性に移植する。

右図では移植片を緑色に蛍光標識して移植場所を確認している。

4. 研究成果

心室自由壁の冠状血管内皮細胞は静脈洞内皮細胞に由来することが示された。一方で心室中隔の冠状血管内皮細胞に対しては静脈洞内皮細胞の寄与は少なく、他の起源細胞に由来することが明らかとなり、その正体は心室心内膜であることが示唆される。静脈洞内皮細胞が冠状血管内皮細胞として編入する詳細な時期については、心外膜原基が心室背側に接着して原始心外膜を形成する段階で既にQH1陽性の細胞が心室壁に認められた。静脈洞内皮細胞から編入するQH1陽性細胞を詳細に観察したところ、一部の研究で示唆されているような angiogenesis (血管新

生)の様式による血管形成は確認できなかった。このことから静脈洞内皮細胞は心室背側にバラバラの状態で『種を撒く』ように配置されたのちに vasculogenesis (脈管形成)の様式で冠状血管を形成していく可能性が示唆された。

<引用文献>

Mikawa T, Fischman DA. Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Oct 15;89(20):9504-8. doi: 10.1073/pnas.89.20.9504.

Red-Horse K, Ueno H, Weissman IL, Krasnow MA.. Coronary Arteries Form by Developmental Reprogramming of Venous Cells. *Nature*. 2010 Mar 25;464(7288):549-53. doi: 10.1038/nature08873.

Wu B, Zhang Z, Lui W, Chen X, Wang Y, Chamberlain AA, Moreno-Rodriguez RA, Markwald RR, O'Rourke BP, Sharp DJ, Zheng D, Lenz J, Baldwin HS, Chang CP, Zhou B. Endocardial cells form the coronary arteries by angiogenesis through myocardial-endocardial VEGF signaling. *Cell*. 2012 Nov 21;151(5):1083-96. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.023.

Tian X, Hu T, Zhang H, He L, Huang X, Liu Q, Yu W, He L, Yang Z, Zhang Z, Zhong TP, Yang X, Yang Z, Yan Y, Baldini A, Sun Y, Lu J, Schwartz RJ, Evans SM, Gittenberger-de Groot AC, Red-Horse K, Zhou B. Subepicardial endothelial cells invade the embryonic ventricle wall to form coronary arteries. *Cell Res*. 2013 Sep;23(9):1075-90. doi: 10.1038/cr.2013.83. Epub 2013 Jun 25.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 上村 竜也, 山岸 敏之, 江尻 貞一, 中島 裕司
2. 発表標題 冠状血管内皮細胞の起源
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mayu Narematu, Tatsuya Kamimura, Toshiyuki Yamagishi, Yuji Nakajima
2. 発表標題 Migratory behavior of coronary endothelial strands in three-dimensional collagen gel culture of avian embryonic heart outflow tract
3. 学会等名 The 19th Congress of International Federation of the Associations of Anatomists (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mayu Narematu, Tatsuya Kamimura, Toshiyuki Yamagishi, Yuji Nakajima
2. 発表標題 Migratory behavior of coronary endothelial strands in three-dimensional collagen gel culture model of avian embryonic heart outflow tract
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kamimura T, Yamagishi T, Nakajima Y
2. 発表標題 EGFP-To12 labeling system in quail-chick chimera elucidates the origin of coronary endothelial cells in avian heart
3. 学会等名 Weinstein 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上村 竜也, 山岸 敏之, 江尻貞一, 中島 裕司
2. 発表標題 EGFP-Toi2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
3. 学会等名 日本解剖学会 第78回中部支部学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考