

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390054

研究課題名(和文) 脳の脈管形成と血管新生：ライブイメージングとその分子機構解析

研究課題名(英文) Live imaging of cerebral vascular development in the zebrafish.

研究代表者

人見 次郎 (HITOMI JIRO)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：00218728

研究成果の概要(和文)：

ゼブラフィッシュ胚のライブイメージングから、脳血管系の脈管形成が体幹の血管系の構築とは独立して起こることが明らかとなった。すなわち、原始内頸動脈が到達する以前に、大きく分けて3つの血管芽細胞集団が、間脳から後脳の下面に発生し、そこから血管新生により、原始血管は正確に規定された道を通して伸長し、最終的に統合された血管系が構築される。細胞塊は、それらが構築する血管系から2つのグループに分けられるが、それぞれ動脈と静脈のマーカー遺伝子を細胞塊の発生直後から発現しており、脳の血管系構築の初期の段階で、血管芽細胞集団の動・静脈の運命決定がなされている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Cranial vessels form in a reproducible and evolutionarily conserved manner. The primary vasculature was considered to develop from a pair of the cranial division (CrDIs) and caudal division (CaDIs) of primitive intercarotid arteries (PICAs) and primordial hindbrain channels (PHBCs) in human. But the process by which these vessels assemble and acquire their stereotypic patterning remains unclear. Using two-photon time-lapse imaging of transgenic zebrafish expressing EGFP predominantly in the endothelial cells including angioblasts, we examine the stepwise assembly and patterning of the vascular network of the zebrafish brain. We show CrDIs and CaDIs originate by angiogenesis from the angioblast clusters, which bilaterally assemble at the rostral-internal to the optic capsule at the stage of 12 somites, and alternatively PICAs develop from the other angioblast clusters, which bilaterally assemble just caudal-internal to the optic capsule. The both rostral and caudal clusters express the arterial maker Hey2. PHBCs develop bilaterally from the clusters of angioblasts arising among the lateral-ventral wall hindbrain at the stages of 15-18 somites, which express the venous maker flt4. Our results suggest that the cranial vessels develop by angiogenesis from the major three clusters of angioblasts, which may assemble independent of the vasculogenesis of longitudinal trunk axial vessels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：発生学・形態形成学，脳，脈管形成，血管新生，イメージング

1. 研究開始当初の背景

脈管の初期形成過程は，従来，Evans のネットワークモデル：「原始血管細胞により網目が形成され，flow dynamics により複数の血管路から本流が決定される」（Evans *Manual of Human Embryology*, 1912）により論じられていた。

一方，我々の研究グループでは，循環系に色素を注入する microangiography と，血管内皮細胞が蛍光を発するトランスジェニック・ゼブラフィッシュ *Tg(fli1:EGFP)^{h1}* を用いた二光子顕微鏡によるライブイメージングによりゼブラフィッシュの初期脈管系の形成過程を明らかにしてきた (Isogai et al. *Dev Biol.*230:278-301, 2001; *Development* 130:5281-5290, 2003, Yaniv et al. *Nature med* 12:711-716, 2006) が，我々の観察からは，大血管が脈管形成 (vasculogenesis) により形成された後，そこから発芽する血管新生 (angiogenesis) の初期血管網形成過程は，「網目を形成することなく，時間空間的に遺伝子のプログラミングにより規定されており，血流が生じる前に血管路は形成される」ことが結論づけられた。

では，体幹以外の血管新生，特に脳についてはどうか？ 内頸動脈と椎骨動脈の二系統から成る脳の血液循環は，特に脳幹の恒常的な動脈血供給を相補的に保つシステムと考えられ，脳底動脈系の基本構築は魚類から哺乳類まで種を超えて広く脊椎動物で保存されている。しかし，この保存的で恒常的な脳血管系の発生過程の詳細は長らく不明のままであり，その最も初期の血管発生は，「脳表面に動静脈の区別のない血管内皮のメッシュが広がる」とされている (Streeter *Am J Anat* 18, 1915)。

2. 研究の目的

脳の血管発生の解剖学的解析では Sabin が詳しい (Sabin *Contrib Embryol* 18, 1917)。また Padget はヒト胚の詳細な血管系解剖図を残している (Padget *Contrib Embryol* 32, 1948; *Contrib Embryol* 32, 1957)。Sabin は脳血管の初期像を，ニワトリ胚を対象にして，拍動が生じる以前より観察しているが，発生初期に前脳・中脳に毛細血管網（叢）を認めるが，菱形脳では 1 対の静脈性の血管 (Vena Capitis medialis: 前・中脳からの血液の排出路として前主静脈へ連絡する) が初めに生

じるとしている。Padget は吻・尾方向に並走する Primitive internal carotid artery (PICA) と primordial hindbrain channel (PHBC) が最初に認められるとしている。PHBC の特徴は Sabin の言う Vena Capitis medialis に一致しており，後脳の外側壁に沿って尾側に走行し，耳胞の直ぐ後で前主静脈に注ぐ。両側の PHBC からは，それぞれの内側に 1 対の longitudinal neural artery (LNA) が血管新生により形成され，続いて体幹の椎骨動脈に連絡するとともに，中脳の腹側端で両側の LNA が融合して，脳底動脈が形成される。一方，PICA からは前方循環を担う cranial division と caudal division が出芽して前脳と中脳に枝を伸ばすとしている。

我々の観察からは，ゼブラフィッシュでも同様の血管網形成が行われるが，LNA の形成は観察されず，PHBC から直接，一条の脳底動脈が生じる。少なくとも，PHBC から血管新生により出芽した血管細胞が脳底動脈を形成することは脊椎動物で普遍的な現象と思われる。また，ゼブラフィッシュの Basal communicating artery (BCA) と posterior communicating segment (PCS) から形成される脳底の血管輪は，ヒトの Willis 輪とほぼ同様の形態を示している。BCA や PCS，脳底動脈からは central artery が出芽し，前脳から後脳の実質内に貫通枝を伸ばしていく。

脳血管の発生過程はゼブラフィッシュからヒトまで広く共通している部分が多く，ゼブラフィッシュは脊椎動物の脳血管発生のモデルとして利用できることは解剖学的にも保証される。また血管内皮特異的に蛍光蛋白を発現するトランスジェニック・ゼブラフィッシュの生体観察により，従来の microangiography や連続切片法 (Padget は連続切片を解析した) では明らかに出来ない管腔形成以前の脈管形成の過程を観察することができる。我々は CrDI・CaDI と PHBC の母地と呼べるべき細胞塊の存在を 2 系統のトランスジェニック・ゼブラフィッシュ (*Tg(fli1:EGFP)^{h1}*, *Tg(flk1:EGFP)*) で，血流が生じる以前に確認することが出来た。

本研究では，それらの細胞塊の脳血管系構築に果たす役割を二光子顕微鏡によるライブイメージングで明らかにするとともに，その細胞特性を解析する。

3. 研究の方法

血管内皮細胞特異的に EGFP を発現させた二系統のトランスジェニック・ゼブラフィッシュ ($Tg(fli1:EGFP)^{v1}$, $Tg(flk1:EGFP)$) を用いて, 受精後 24 時間までの初期脳血管系構築の全過程を二光子顕微鏡でライブイメージングする. また, 脈管形成部位に発現する脈管マーカー遺伝子のスクリーニングを *in situ hybridization* 法により行うとともに, *morpholino* を用いて脳血管系構築の責任遺伝子を同定し, 脳脈管形成過程の分子機構を明らかにする.

4. 研究成果

ゼブラフィッシュのライブイメージングで拍動開始以前に確認された *fli1* 陽性細胞塊を図 1 に示す. *flk1* 陽性細胞も同時期に同じ領域に出現する. 両者の陽性細胞の集団は管腔形成を行い, そこからの血管新生により脳の基本的血管構築を果たす. この脳血管系の初期形成過程は, 体幹部とは独立した過程であり, 原始内頸動脈が前脳に達する以前に, 独自の脈管形成から始まる.

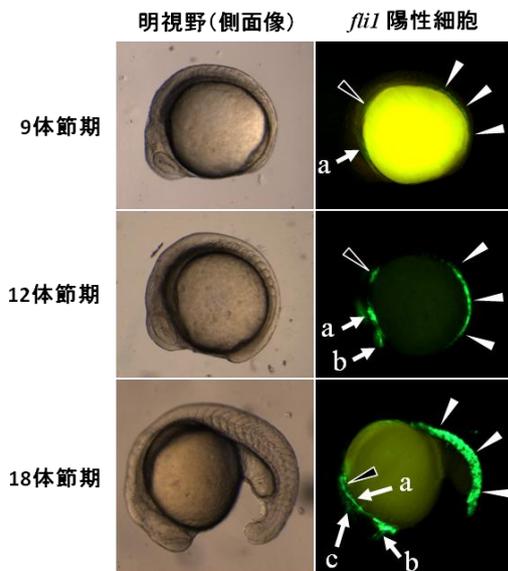


図1. ゼブラフィッシュ初期胚の血管細胞塊 複数の *fli1* 陽性細胞群が出現し, 全身の血管系を構築していく. これらの細胞群は, それぞれ, 原始内頸動脈 (白矢印a), 脳の動脈 (白矢印b), 脳の静脈 (白矢印c: 内頸動脈の背側に散在性に出現), 体幹部の動静脈と造血細胞 (白矢印d), 鰓弓の軟骨 (黒矢印) を形成する. 18体節期には, 脳の動脈が白矢印bの細胞群からの血管新生で形成されつつある.

すなわち頭部では, 6-9 体節期に索状の *fli1* 陽性の細胞が左右 2 列確認され, 12 体節期になると, 眼胞の嘴側と尾側でそれぞれこぶ状の *Hey2* 陽性の細胞塊となる. 嘴側の細胞塊からの血管新生で脳の動脈系 (CrDI・CaDI) が形成され, 尾側の細胞塊から内頸動脈が形成される (図 2).

一方, 15-18 体節期になると眼胞と耳胞の間の神経管の腹側領域に散在した *fli1*・*flt4* 陽性の細胞群が出現し, これらの細胞が脳の

静脈 (PHBC) を形成する. さらに, この初期脳血管系の PHBC から正中腹側へ枝が伸び, それら隣接する枝がループを形成しつつ, そのループがつながることで脳底動脈 (BA) が形成される. また, PHBC は前主静脈との連結部位から神経管に沿って尾側へ伸展していき, 第一節間動脈につながる. つづいて, BA が第 1 節間動脈に連結し, 原始脊椎動脈が形成される. これによって, 初期の脳血管系と体幹の血管系の連結がなされる. BA を形成する PHBC の分枝が退縮した後, PHBC から後脳実質へ侵入し BA へつながる CtA (脳のへ侵入する最初の血管) が形成される.

この基本構成は *morpholino* の *sih* 遺伝子の発現抑制により拍動を止めた個体でも保持されていた. すなわち, 脳血管の基本構築は Flow dynamics に拠るものではなく, 遺伝子上にプログラミングされているものと判断された (図 2). また, *ESTrp* 遺伝子の発現抑制により, 頭部の血管系構築の母地となる細胞塊の形成が阻害された.

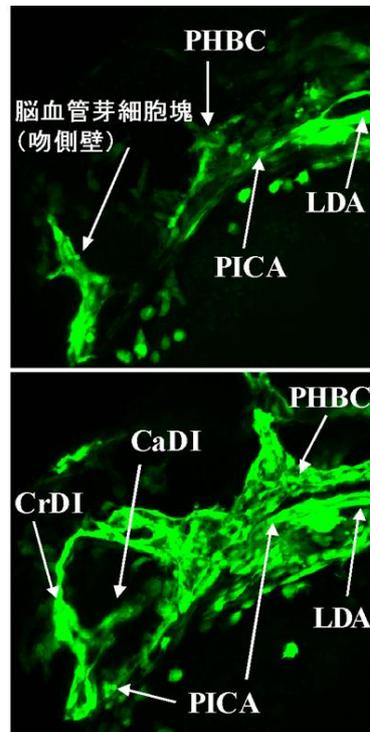


図2. ゼブラフィッシュの初期脳血管系 ($Tg(fli1:EGFP)^{v1}$) のライブイメージング: 20phf(上段)と24phf(下段)

脳血管系の脈管新生 (vasculogenesis) は体幹部から独立して起こり, 動脈性と静脈性の血管新生 (angiogenesis) により, 決まった場所, 決まったタイムコースで体幹部 (脊髄) の血管系と連結し統合されていく. 本研究により, およそ 100 年間信じられてきた血管系構築の Evans 仮説の反証がなされるとともに脳の初期血管の脈管形成と血管新生の詳細が初めて明らかとなった.

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Isogai S, Horiguchi M, Hitomi J. The para-aortic ridge plays a key role in the formation of the renal, adrenal and gonadal vascular systems. *Journal of Anatomy*.2010;216(6):656-670, 査読有
 - ② Kamei M, Isogai S, Pan W, Weinstein BM Imaging blood vessels in the zebrafish. *Method Cell Biol*.2010;100:27-54, 査読有
 - ③ Narumi S, Sasaki M, Ohba H, Ogasawara K, Hitomi J, Mori K, Ohura K, Ono A, Terayama Y. Altered carotid plaque signal among different repetition times on T1-weighted magnetic resonance plaque imaging with self-navigated radial-scan technique. *Neuroradiology*.2010;52(4):285-290, 査読有
 - ④ Matsumura H, Yoshida K, Luo S, Kimura E, Fujibe T, Albertyn Z, Barrero RA, Krüger DH, Kahl G, Schroth GP, Terauchi R. High-throughput SuperSAGE for digital gene expression analysis of multiple samples using next generation sequencing. *PLoS One*.2010;5(8): e12010, 査読有
 - ⑤ Butler MG, Isogai S, Weinstein BM. Lymphatic development. *Birth Defects Res C Embryo Today*.2009 Sep;87(3):222-31, 査読有
 - ⑥ Isogai S, Hitomi J, Yaniv K, Weinstein BM. Zebrafish as a new animal model to study lymphangiogenesis. *Anatomical science international*.2009; 84: 102-111, 査読有
 - ⑦ Isogai S, Hitomi J, Yaniv K, Weinstein BM. Zebrafish as a new animal model to study lymphangiogenesis. *Anat Sci Int*.2009; 84: Epub ahead of print
- [学会発表] (計 16 件)
- ① 磯貝純夫, 木村英二, 人見次郎 脳血管系の解剖学的構造構築のための設計図. 第 87 回日本生理学会大会 (2010/5/20, 岩手)
 - ② 木村英二, 出口友則, 亀井保博, 弓場俊輔, 東海林互, 人見次郎 IR-LEGO 顕微鏡を用いた脈管系細胞の 1 細胞レベルでの標識法の確立. 第 115 回日本解剖学全国学術集会

(2010/3/30, 盛岡)

- ③ 磯貝純夫, 木村英二, 人見次郎 ライブイメージングによる脳血管系形成過程の解明. 第 115 回日本解剖学全国学術集会 (2010/3/28-30, 盛岡)
- ④ 木村英二, 磯貝純夫, 人見次郎 脳・脊髄血管系を架橋する第 1 節間動脈由来の内皮細胞. 第 32 回日本分子生物学会年会 (2009/12/9-12, 横浜)
- ⑤ 磯貝純夫, 木村英二, 人見次郎 脳血管系を形成するメカニズムと内皮細胞の由来. 第 17 回血管生物医学会 (2009/10/8, 東京)
- ⑥ Isogai S, Deguchi T, Yaniv K, Hitomi J, Weinstein BM Zebraish and Medaka as animal models to study lymphangiogenesis. 22nd International Congress of Lymphology (2009/9/21-25, Sydney, Australia)
- ⑦ Isogai S, Deguchi T, Yaniv K, Hitomi J, Weinstein BM Fish as a animal model to study lymphangiogenesis. The 4th Asia-Oceania Zebrafish meeting (2009/8/30-9/3, Jeju, Korea)
- ⑧ 磯貝純夫, Yaniv K, 人見次郎, Weinstein BM リンパ管発生研究のための小型モデル動物, ゼブラフィッシュとメダカ. 第 33 回日本リンパ学会総会 (2009/7/18, 大阪)
- ⑨ 木村英二, 磯貝純夫, 人見次郎 造血のライブイメージング: 血管内皮が蛍光を発するトランスジェニック・ゼブラフィッシュの観察からわかったこと. 第 114 回日本解剖学会全国学術集会 (2009/3/28-30, 岡山)
- ⑩ Isogai S, Yaniv K, Hitomi J, Weinstein BM Zebrafish as a New Animal Model to study Lymphangiogenesis. 第 14 回小型魚類研究会 (2008/9/21, 岡崎)
- ⑪ 人見次郎 ゼブラフィッシュを用いた脈管形成研究から明らかになったこと. 第 29 回日本炎症・再生医療学会 (2008/7/9, 東京)
- ⑫ Isogai S, Yaniv K, Hitomi J, Weinstein BM Anatomical Atlas of Lymph Vasular System in Developing Zebrafish. 8th International Meeting on Zebrafish Development and Genetics (2008/6/25-29, Madison, USA)
- ⑬ Kimura E, Tanifuji G, Isogai S, Hitomi J Live-imaging of the

hematopoiesis in the zebrafish: the emergence of the blood cells around dorsal aorta. 8th International Meeting on Zebrafish Development and Genetics(2008/6/25-29, Madison, USA)

- ⑭ Isogai S, Kimura E, Weinstein BM, Hitomi J Gross anatomical patterning of the arterial system is tightly regulated by the genetic cues in the brain. 15th International vascular biology meeting (2008/6/1-5, Sydney, Australia)
- ⑮ Isogai S, Kimura E, Weinstein BM, Yaniv K, Hitomi J What guides blood and lymph vessels to the gross anatomical structure? 41th Annual meeting for the Japanese society of developmental biologists (2008/5/28, 徳島)
- ⑯ 木村英二, 谷藤吾朗, 磯貝純夫, 人見次郎 二光子顕微鏡を用いたライブイメージング法による血管系形成過程の解析. 41th Annual meeting for the Japanese society of developmental biologists (2008/5/27, 徳島)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

人見 次郎 (HITOMI JIRO)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：00218728

(2) 研究分担者

磯貝 純夫 (ISOGAI SUMIO)
岩手医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60212966

木村 英二 (KIMURA EJI)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：50405750

(3) 連携研究者
なし