

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07229

研究課題名（和文）大動脈-生殖腺-中腎領域における還流路形成の時空間的解析

研究課題名（英文）Spaciotemporal analysis for developing inferior vena cava

研究代表者

村嶋 亜紀（Murashima, Aki）

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：50637105

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：下大静脈の形成は原始静脈系の変化に基づくが、周辺組織の発生を加味した3次元解析は行われていなかった。本研究では、最新のイメージング技術と遺伝子改変マウスを使用して、体幹還流路の発生を再検討した。その結果、下大静脈形成には従来の原始静脈系とは異なる新たな静脈構造が寄与する可能性が示唆された。本研究は、哺乳類における下大静脈の新たな発生起源を示しており、発生学的、比較解剖学的に新たな知見を与える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、一世紀以上議論が続いている哺乳類における下大静脈の発生メカニズムを比較解剖学および発生学の両方の視点から発展させ、新たな発生起源を明らかにした点にある。最新のイメージング技術と遺伝子改変マウスを用いた解析により、従来見逃されていた静脈構造の形成メカニズムを解明し、体幹還流路の理解を深化させた。本研究は血管形成異常に関連する疾患の診断や治療法の開発に寄与する可能性があり、社会的にも意義がある。

研究成果の概要（英文）：Although the development of the inferior vena cava (IVC) is based on changes in the cardinal veins (posterior-, sub-, supra), there has been no three-dimensional analysis that incorporates the development of the surrounding tissues. In this study, we used advanced imaging techniques and genetically engineered mice to reevaluate the development of the IVC. The results suggested that a novel venous structures might contribute to the IVC. This study indicates a new developmental origin of the IVC in mammals providing new concepts not only in embryology but also in comparative anatomy.

研究分野：解剖学

キーワード：還流路形成 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

血管形成は胎児発生において古くより解析されており、特に動脈系に関しては様々な報告がなされている。一方、静脈系は血液の還流路として様々な臓器の発生に付随してより流動的にかつダイナミックに変遷することから、解析は動脈系より困難で報告数も少ない。下大静脈は、Posterior cardinal vein(PCV) Subcardinal vein(SubCV) Supracardinal vein(SupCV)よりなる原始静脈系の吻合、偏位、消退によって構成される。特に腎静脈部は左右 SubCV の中腎領域における吻合によって形成されると言われている。これは半世紀以上前の解析をもとに作成されたモデル図であり(McClure and Butler, 1925)、現在もほぼ全ての発生学の教科書に記載されている。しかし、当時の解析は主に組織切片からの考察によってなされており、静脈の吻合部を構成するような未分化血管叢構造の正確な特定は困難であったと考えられ、記述の正確性に関する再検討が必要であった。

2. 研究の目的

本研究は、胚発生期において体幹後部両側に形成される還流路の形成過程を従属器官を同定しつつ時空間的に明らかにし、両側還流路が吻合するメカニズムを細胞レベルで明らかにすることを目的とした。動脈の形成や血管新生においては、神経の走行や酸素要求性など様々な観点から発生メカニズムの解析が進んでいる。また、器官形成過程において、器官が完成すると動静脈の多くは伴行する。この時の動静脈内皮細胞のアイデンティティ形成には EphrinB2-EphB4 シグナルといった分子シグナルの関与が報告されている。一方で、特に器官発生の初期において静脈の発生はより流動的で、未分化血管叢を介して背側大動脈に対して左右両側に還流路を形成する、すなわち器官を挟んで動脈と平行した構造を形成する。このような還流路形成とその吻合、発達、消失の詳細については、半世紀前の組織学的解析以降は、ほぼ報告されていない。その理由として、従来の組織切片を用いた三次元構造の推察では、微細な未分化血管叢構造を捉えることや、時空間的に変化する血管構造を正確に把握することが困難であったことが推察される。本研究では大動脈-性腺-中腎領域の還流路を4次元的に捉え、静脈吻合の責任器官の同定を行い、さらには正中中部における吻合のメカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では最新のイメージング技術、遺伝子改変マウスを駆使して、静脈形成を時空間的に捉え、さらに従属する器官の発達・退縮と関連して解析を行った。マウス、両生類、爬虫類の正常発生胚を用い、ステージごとにホールマウントもしくは連続切片の免疫組織化学を行い、静脈形成と周辺の器官形成について3次元再構築を行った。特にマウス胚においては、未分化血管叢や静脈系のマーカーとして Endomucin を用いることで、客観的な静脈構造の描出が可能となった。傍大動脈領域に発達する神経細胞とクロム親和性細胞は互によく似ており、両者を正確に標識することは困難であったが、近年胚のクロム親和性細胞において Tyrosine hydroxylase (TH) と Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) の発現が低いことが報告され、TH と CART の二重染色によって両細胞が高精度で選別されることが明らかとなっている(Kastriti et al., 2019)。これらのマーカーを用いて、静脈とその従属器官を明らかにした。特に中腎においては、従来のモデルでは左右還流路の正中吻合における責任器官と考えられているため、ジフテリアトキシン遺伝子を利用して細胞死を誘導する中腎上皮特異的細胞除去マウス(*Hoxb7-Cre;ROSA-DTA*)を作成し、正中吻合における中腎の必要性を検証した。吻合部における血流の有無や3次元構造の理解のために、ラットやマウス胚に樹脂を注入した血管鑄

型標本を走査電子顕微鏡にて解析した。これらの解析より、下大静脈形成における副腎および傍神経節細胞の寄与が明らかとなったため、これらの器官の発生が阻害される *Gata3* および *Nr5a1* 遺伝子欠損(KO)マウスを導入し、下大静脈発生への影響を解析した。さらに、神経堤細胞特異的 *Gata3* KO マウスを作成し、左右還流路の吻合の変化を解析した。

4. 研究成果

本研究では、最新のイメージング技術と遺伝子改変マウスを活用し、静脈形成を時空間的に解析し、従属する器官の発達や退縮との関連性を解明した。具体的には、マウス胚、両生類幼生、爬虫類胚を用いて静脈形成と周辺の器官形成を3次的に解析した。さらに、遺伝子改変マウスを駆使して、従属する器官の発達・退縮と関連して解析を行った。

はじめに、マウス胚を用いて静脈形成と周辺器官形成過程について経時的に各ステージで連続切片を作成し、3次元再構築を行った。血流の有無や3次元構造を理解するために血管鋳型標本や走査電子顕微鏡による解析も行った。その結果、中腎が原始静脈の正中吻合や下大静脈の形成に寄与していない可能性が明らかになった。ジフテリアトキシン遺伝子を利用して細胞死を誘導する中腎上皮特異的細胞除去マウスを作成し、正中吻合における中腎の必要性を検証した結果、中腎欠損が見られるマウスにおいても左右原始血管の正中吻合は形成されることが明らかとなった。

哺乳類胚において一過性に発生する中腎の発達度合いは種によって異なり、マウスではヒトに比べてその発達が乏しいことが報告されている。古くより、中腎の発達が乏しい種における下大静脈形成において、背景に示した静脈形成モデルを適応させることに困難があることは認識されていた。そこで、中腎を永久腎として発達させる両生類(*Hynobius lichenatus*)、後腎を発達させるが哺乳類より両生類に近縁である爬虫類(*Caretta caretta*)において主下静脈と中腎の発生を連続切片による3次元再構築と樹脂鋳型標本による解析を行った。その結果、*Hynobius* および *Caretta* では中腎管に沿って腹外側に形成される後主静脈に対して、中腎静脈洞を挟んで腹内側に形成される主下静脈が中腎に属する門脈として発生することが確認された。この定義を基にマウスの主下静脈を再同定したところ、マウスでは中腎頭部にわずかに形成されるのみで、その頭側部より傍大動脈領域に新たな静脈洞を形成し、後に左腎静脈の形成に寄与することが判明した。これらの結果からマウスにおいて左右の原始静脈吻合を主下静脈に代わって制御する新たな静脈洞が定義された。

新たな静脈洞が従属する器官として傍大動脈領域に形成される副腎および傍神経節に着目し、遺伝子改変マウスを導入して還流路形成に与える影響を解析した。副腎髄質および傍神経節欠損マウス、副腎皮質欠損マウスを導入し、各ステージごとに胚を採集し、連続切片による3次元再構築を行った結果、いずれのマウスにおいても左右原始静脈の吻合形成が認められ、副腎皮質欠損マウスでは吻合の低形成と遅れが顕著であった。これらの結果から、原始静脈の左右吻合に副腎および傍神経節内に作られる静脈洞が寄与する可能性が示唆された。本研究は哺乳類における下大静脈腎部の新たな起源を明らかにするものであり、発生学的、比較解剖学的に新たな知見を与える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Abe Shizuka, Murashima Aki, Kimura Eiji, Ema Masatsugu, Hitomi Jiro	4. 巻 124
2. 論文標題 Early development of the pulmonary vascular system: An anatomical and histochemical reinvestigation of the pulmonary venous return development in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Histochemica	6. 最初と最後の頁 151840 ~ 151840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.acthis.2021.151840	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Haraguchi Ryuma, Yamada Gen, Murashima Aki, Matsumaru Daisuke, Kitazawa Riko, Kitazawa Sohei	4. 巻 22
2. 論文標題 New Insights into Development of Female Reproductive Tract?Hedgehog-Signal Response in Wolffian Tissues Directly Contributes to Uterus Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1211 ~ 1211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22031211	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Daiki Hashimoto, Jose Gabriel R. Colet, Aki Murashima, Kota Fujimoto, Yuko Ueda, Kentaro Suzuki, Taiju Hyuga, Hiroaki Hemmi, Tsuneyasu Kaisho, Satoru Takahashi, Yousuke Takahama and Gen Yamada1	4. 巻 -
2. 論文標題 Radiation inducible MafB gene is required for thymic regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-89836-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 阿部志津香, 村嶋亜紀, 人見次郎	4. 巻 -
2. 論文標題 肺循環の成り立ちと肺静脈形成の形態学的考察	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 岩手医学雑誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村嶋亜紀
2. 発表標題 免疫組織化学による交感神経および副腎細胞の染色と同定 : マウス胚とサンショウウオを用いて
3. 学会等名 第20回医学生物学電子顕微鏡シンポジウム 合同企画 第34回医学生物学電子顕微鏡技術研修会および総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村嶋亜紀
2. 発表標題 マウスにおける下大静脈発生の時空間的解析
3. 学会等名 第67回日本解剖学会東北・北海道連合学術支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aki Murashima
2. 発表標題 Morphogenesis of pro to mesonephric vascular system in salamander, <i>Hynobius lichenatus</i> : Micro vasculogenetic analyses with corrosive resin casts
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村嶋亜紀
2. 発表標題 マウス胎仔における交感神経性パラガングリアの組織発生的解析
3. 学会等名 第69回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Aki Murashima
2. 発表標題 Studies on the posterior vena cava development: a century of misconceptions caused by the decline of morphology
3. 学会等名 PSDB 2024 Webinar Series (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本小児泌尿器科学会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 368
3. 書名 小児泌尿器科学	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------