

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659100

研究課題名(和文) 脳血管系の動静脈運命決定機構の解明

研究課題名(英文) The arterial and venous differentiation of endothelial cells in the forming of the cranial vasculatures of 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：頭部の脈管形成を担う3つの血管芽細胞集団の、吻端のものはHey2を発現し、眼胞後方外側のものはFlt4を発現する。一方、吻側と眼胞後方の細胞塊の正中部ではShhの発現が確認されたが、その発現部位は、Hey2陽性細胞がFlt4陽性細胞に比較して近傍にあり、動静脈分化にShhの影響が示唆された。また、どの細胞塊からどの血管が派生するかを追跡できるムービーを作成した結果、頭部の基本的血管系は、眼動脈、原始前脳動脈、中脳動脈、原始内頸動脈の先端部分に派生する吻側の細胞塊と、PHBCを経て、脳底部の前方で原始動脈輪と後脳動脈を、後方で脳底動脈を形成する後脳外側の細胞塊から構成されることが確認された。

研究成果の概要(英文)：The cranial vascular system of zebrafish was composed of three clusters of the flt4 positive angioblasts, of which the first cluster recognized as lateral dorsal artery or primitive internal carotid artery, and the second cluster assembling at the rostral-internal region to the optic capsule, and the third cluster arising among the lateral-ventral wall of hindbrain. The rostral and caudal clusters of arterial origins express the arterial maker hey 2, while the clusters arising among the lateral-ventral wall of hindbrain express the venous maker flt4. Shh was expressed in the adjacent region of arterial angioblast-clusters, which are suggested to determine arterial endothelial fate. Time-lapse movies imaging the arterial-venous differentiation also revealed that the branches of intercarotid artery are originated by arterial angioblast clusters at the rostral, and the branches of vertebral-basilar artery are derived from the venous angioblast clusters arising among the hindbrain.

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・分化 脳 脈管形成 分子認識 イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

初期脈管系の形成過程は、長らく 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) が信じられてきた。しかし、我々はゼブラフィッシュ *Tg(fli1;EGFP)y1* のライブイメージングにより、胚の体幹部分では大血管の脈管形成 (vasculogenesis) 後の血管新生 (angiogenesis) は、「網目を形成することなく、遺伝的なプログラミングにより時間空間的に規定されており、血流が生じる前に血管路は形成される」との結論を得た (Isogai et al. *Dev Biol.* 230:278-301, 2001; *Development* 130:5281-5290, 2003)。

一方、我々は、眼胞予定部位の吻側壁と後脳の外側壁に、頭部の脈管形成の母地として血管芽細胞の細胞塊が生じることを発見し

(図 1)、吻側の細胞塊は、動脈性の cranial division of the internal carotid artery (CrDI) と caudal division of the internal carotid artery (CaDI) に成長するという知見を得た。このことは、原始内頸動脈 (primitive internal carotid artery (PICA)) が前脳に達する以前に頭部の動脈の発生母地が存在すること意味し、現在の脈管形成の常識を覆すものである。また、後方の細胞塊は静脈性の primordial hindbrain channel (PHBC) に成長したが、その後、両側の PHBC は、尾側に伸長しながら、脳幹底部の内側中央に向かって、はしご状に発芽血管が伸長し、それらが中央で連結して、脳底動脈 (BA) を形成した。

頭部の血液循環は、内頸動脈と椎骨動脈から連なる脳底動脈の二系統から成り立つが、両系統が構成する動脈輪の基本構築は、魚類から哺乳類まで種を超えて広く脊椎動物

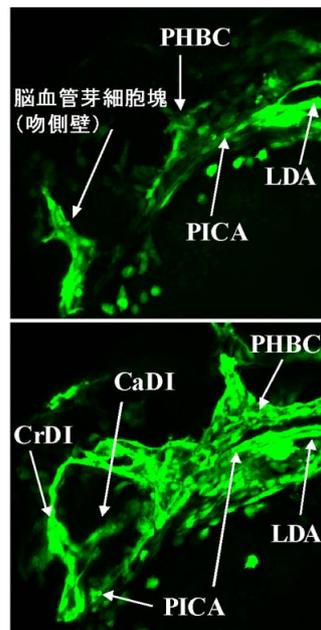


図1 ゼブラフィッシュの初期血管系 (*Tg(fli1;EGFP)y1* のライブイメージング; 20phf(上段)と24phf(下段))

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)。

ゼブラフィッシュをモデルにした観察からは、頭部の特異的な脈管形成と血管新生過程の存在が示唆されており、且つ、計画的な血管系構築の機構の存在が予想された。このような頭部の初期血管系の構築の階層的な分子機構を明らかにすることで、脳を含めた頭部形成研究分野に新たな領域を開く可能性がある。

## 2. 研究の目的

発生学の教科書では脈管形成は、胚の側板の臓側中胚葉から血管芽細胞が生まれ、やがてそれが、胚盤の全域に広がる血管芽細胞叢と呼ばれる網状構造が形成されるまでをいう。しかし、卵黄囊以外で血管芽細胞叢の網目の実体は捉えられていない。例えば、体幹部の背側大動脈は、脊索の直下に血管芽細胞の集団が発生し、融合することで形成される。また、背側大動脈の形成にやや遅れて、その腹側に後主静脈が形成されるが、この時、内腔には胚性血球細胞も同時に発生する。このような体幹部の大動脈と大静脈の発生の分子機構は、ゼブラフィッシュを用いた研究から、Shh と Notch の関与が考えられている。すなわち、脊索から分泌される Shh が体節の細胞に vegf を誘導させ、その濃度勾配により、血管芽細胞への Notch シグナルの有無が生じ、動静脈決定がなされるとの説がある (Lowson & Weinstein. *Nature Rev Genet* 3, 2002)。

一方、我々は、ゼブラフィッシュでこの背側大動脈・主静脈の形成とは独立して、脳血管系の脈管形成が起こることを発見した。すなわち、原始内頸動脈が到達する以前に、少なくとも二つの血管芽細胞集団が、頭部に発生し、そこから規則性のある血管新生により、統合され機能的な原始血管系が構築される。

脳の最も初期の血管発生は、Streeter の説；「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」が 90 年以上に亘って信じられてきた。Sabin は、ニワトリ胚を対象として、前脳と中脳に毛細血管網 (叢) を認め、菱形脳では 1 対の静脈性の Vena Capitis medialis (VCM) が前・中脳からの血液の排出路として初めに生じるとしている (Sabin *Contrib Embryol* 18, 1917)。一方、

Pagdet は毛細血管網については記載していないが、否定もしていない。吻・尾方向に並走する PICA と PHBC が最初に認められ、PICA からは、前方循環を担う CrDI・CaDI が出芽して前脳と中脳に枝を伸ばすとしている(PHBC の特徴は Sabin の言う VCM に一致している)。我々の解析では、ゼブラフィッシュのみならず、血流が生じた直後の最も初期のラットの脳でも、初期脳血管系は CrDI・CaDI と PHBC から構成され、その vascular tree は非常に良く似ている。しかし、同時期には血管芽細胞の網目構造は認められない。したがって、少なくとも、ゼブラフィッシュとラット、そして、Pagdet の説によれば、ヒトの解析からも、「初期の基本血管系は CrDI・CaDI と PHBC から構成されるが、これらは網目構造を経ずに構築される」との仮説に至る。

本研究では、血管形成の研究に有用なゼブラフィッシュをモデルとし、初期脳血管系の構築過程を俯瞰し、その分子機構を明らかにする。まず、脳特異的な脈管形成の本体となる二つの脳血管芽細胞塊の細胞特性を明らかにし、脈管形成の分子機構を解析する。また、この細胞塊の動・静脈の運命決定機構を明らかにする。さらに、これら動・静脈が連結し、初期血管系の基本的な構築がなされる階層性の詳細な形態学的観察と分子機構について解析する。

### 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)<sup>v1</sup>*, *Tg(flk1;EGFP)*) を用いて、受精後 72 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し、タイムラプスムービーを作成した。同時に、走査電子顕微鏡撮影、組織標本の再構成を行ない、初期血管系の基本的な構築がなされる階層性の詳細と細胞特性を解析した。また、*in situ hybridization* 法により、脈管形成と血管新生の領域に一致して発現する脈管マーカー遺伝子のスクリーニングを行った。さらに *morpholino* を用いて機能解析を行い、脳血管系構築の責任遺伝子を同定した。

### 4. 研究成果

ゼブラフィッシュの 12 体節期(受精後 15 時間)の胚の動脈と静脈のマーカー遺伝子の発現を、*in situ hybridization* 法により、確認したところ、吻端と眼胞後方腹側の細胞塊に一致して *Hey2* の発現が確認され、眼胞後方外側の細胞塊は *Flt4* の発現が確認された。

また、これら細胞塊が発生する吻側と眼胞後方の正中部では両側性に *Shh* の発現が確認された。*Shh* の発現部位は、吻側に出現する *Hey2* 陽性細胞の近傍であり、眼胞後方外側の *Flt4* 陽性細胞からは離れていた。

一方、血管内皮細胞の EGFP 発現トランスジェニック・ゼブラフィッシュのタイムラプスイメージングによって得られた画像を視覚的に理解するため、観察時間中に完成された血管より、血管芽細胞塊に戻るまで、発生過程の時間を遡りつつ、同一の細胞塊由来の血管細胞を色分けした。これにより、それぞれの細胞塊からどの血管が派生するかを追跡できるムービーを作成した。その結果、どの系統の血管が動脈になるのか、静脈になるかを判別できるようになり、当初、前脳と後脳の腹側に認められた EGFP 陽性細胞塊のうち、後脳の腹側の細胞塊は、眼胞後方の外側の細胞塊と腹側の細胞塊との 2 つの系統の細胞に分けられることが明らかになった。

すなわち、頭部の血管形成は、受精後 14-16 時間に、胚の吻端と眼胞の後方と、後脳の側腹部に EGFP 陽性の血管芽細胞塊が出現することから始まるが、脳底動脈を除く頭部の動脈系は吻端の細胞塊から、静脈系は眼胞後方の外側の細胞塊に由来する。

それぞれの細胞塊から血管芽細胞が遊走伸展し、時間の経過とともに隣り合う細胞が結合して管状の細胞索を形成し、24 時間までに、吻側の前脳の細胞塊からは眼動脈、原始前脳動脈、中脳動脈、原始内頸動脈の先端部分が形成された。一方、後脳の細胞塊からは、PHBC を経て、脳底部の前方では原始動脈輪、後脳動脈、後方では脳底動脈の形成過程が観察された。眼胞後方の腹側に出現する動脈系の細胞塊からは原始内頸動脈、鯉弓動脈、外背側大動脈が発生した(図 2)。

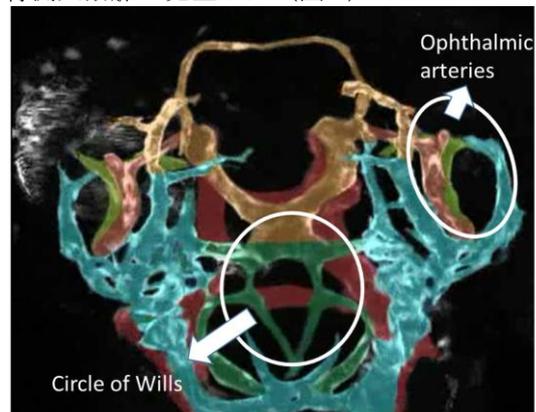


図2 The basic structure of primitive brain vascular system

後脳の側腹部の血管芽細胞塊は、当初、静脈性の遺伝子を発現しており、形態学的にも静脈性のものが動脈性に転換することが明

らかになった。また、前脳および後脳の遺伝子の血管芽細胞の出現領域に発現する血管形成に関わる複数の遺伝子を特定できた。現在、これらの遺伝子と脳の血管系の階層化について、関連を解析中である。

Hey2 と flt4 を発現する二つの細胞塊と Shh の発現する領域との位置関係は、体幹部の大動脈と大静脈の関係に似ており、脊索の直接的な作用を考えにくい前脳領域でも、ごく初期の段階で、体幹部と同様な動・静脈の運命決定がなされている可能性が疑われた。

#### 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 5 件)

- ① Kimura E, Deguchi T, Kamei Y, Shoji W, Yuba S, Hitomi J. Application of infrared laser to the zebrafish vascular system: gene induction, tracing, and ablation of single endothelial cells. *Arterioscler Thrombo Vasc Biol.* 2013;33(6):1264-1270, 査読有
- ② Narumi S, Sasaki M, Ohba H, Ogasawara K, Kobayashi M, Hitomi J, Mori K, Ohura K, Yamaguchi M, Kubo K, Terayama Y. Prediction of carotid plaque characteristics using non-gated MR imaging: correlation with endarterectomy specimens. *Am J Neuroradiol.* 2013;34(1):191-197, 査読有
- ③ Saito A, Sasaki M, Ogasawara K, Kobayashi M, Hitomi J, Narumi S, Ohba H, Yamaguchi M, Kudo K, Terayama Y. Carotid plaque signal differences among four kinds of T1-weighted magnetic resonance imaging techniques: a histopathological correlation study. *Neuroradiology.* 2012;52(11): 1187-1194, 査読有
- ④ Takechi M, Yan J, Hitomi J. Rare coronary anastomoses between the aorta, pulmonary trunk, left coronary artery, and subclavian artery. *Clinical Anatomy.* 2012;25(8): 969-972, 査読有
- ⑤ Cha Y, Fujita M, Butler M, Isogai S, Kochhan E, Siekmann A, Weinstein BM. Chemokine Signaling Directs Trunk Lymphatic Network Formation along the Preexisting Blood Vasculature. *Developmental Cell.* 2012;22(4): 824-836, 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 木村英二, 人見次郎 個体内における 1 細胞レベルでの遺伝子発現制御法の開発. 第 119 回日本解剖学全国学術集会 (2014/3/27-29, 栃木)
- ② 木村英二, 藤澤志津子, 小泉元彦, 谷藤吾郎, 人見次郎 Etsrp/etv2 遺伝子を抑制したゼブラフィッシュ胚を用いた新規血管形成関与遺伝子群のマイクロアレイ法による探索. 第 36 回日本分子生物学会年会 (2013/12/3-6, 神戸)
- ③ 木村英二, 磯貝純夫, 人見次郎 内頸動脈系と椎骨動脈系は発生過程においていかにして連結されるのか. 第 21 回日本血管生物医学会全国学術集会 (2013/9/26-28, 大阪)
- ④ Hitomi J, Isogai S, Kimura E. New anatomical findings in the cranial vascular development of the zebrafish. *International Symposium Anatomical Science for advance in health and clinical therapy* (2013/8/27-28, Sendai, Japan)
- ⑤ 武智正樹, 燕軍, 人見次郎 極めて稀な冠状動脈-肺動脈幹異常吻合の二例. 第 118 回日本解剖学全国学術集会 (2013/3/28-30, 高松)
- ⑥ 古和田周吾, 磯貝純夫, 村井一範, 伊藤薫樹, 遠山稿二郎, 人見次郎, 石田陽治 マウス骨髄における成熟巨核球の血小板産生過程の解析. 第 118 回日本解剖学全国学術集会 (2013/3/28-30, 高松)
- ⑦ Isogai S, Saito E, Kimura E, Hitomi J. Origin of the endothelial cells and mechanism generate the anatomical architecture of the functional vascular system for the brain and spinal cord. 第 18 回小型魚類研究会 (2012/9/22-23, 京都)

[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