

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18370087

研究課題名（和文） 分節パターンが規定する神経系及び血管系の器官形成

研究課題名（英文） Neuro-vascular patterning determined by segmentation

研究代表者

高橋 淑子 (YOSHIKO TAKAHASHI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号 10183857

研究成果の概要：脊椎動物の初期発生過程において出現する体節中胚葉の分節化は、体節以外の組織、たとえば神経系や血管系などの分節パターンをも規定する。本研究では、分節パターンに沿って出現する血管前駆細胞に注目し、これらの細胞による血管形成の過程と、それを制御する分子メカニズムの解析を行った。血管前駆細胞は各体節の後半部に出現し、その後腹側方向に移動して背側大動脈の内皮組織を形成する。これらの細胞挙動は、主に Notch とその下流で働くエフリンによって制御されていることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	5,600,000	0	5,600,000
2007 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2008 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	2,880,000	18,080,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：分節、Notch、細胞移動、エフリン、神経、血管形成

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の発生初期過程にみられる血管形成は、間充織-上皮転換を伴う内皮管形成

などの過程を経て形成され、その過程は成体内にみられる血管形成（主に新生血管とよばれる）とは異なる。胚発生期における血管の

基本的なパターン形成は、血管以外の組織や器官の形成にも重要であることから、その機構を明らかにすることは重要である。初期血管形成に関わる分子として、ノックアウトマウスなどの解析から Notch やエフリンなどの分子が必要であることが報告されていた。しかしながら、これらの分子が胚発生段階の「いつ、どこで、どのように」作用するのかについてはほとんど明らかにされていなかった。

発生中の胚内で最初に形成される血管に、背側大動脈がある。背側大動脈は、体の中央部を前後軸に沿って走る太い血管である。背側大動脈が形成される際、異なる2種類の細胞から構成されることがわかっていた。大動脈は最初細い血管として形成され、このとき血管細胞は側板中胚葉と呼ばれる組織に由来する。胚発生がさらに進行すると、体節中胚葉に由来する細胞が大動脈形成に加わり、血管はさらに太くかつ安定した器官へと成長する。

体節中胚葉は初期胚において出現する組織であり、規則的な分節化をおこす。体節細胞の多くは、後に脊椎骨や骨格筋として分化し、それらの分化過程については比較的研究が進んでいた。一方で、体節から背側大動脈の血管細胞への分化の仕組みについてはほとんどわかっていなかった。

すでにのべた Notch などのノックアウトマウスでは、背側大動脈の形成に異常がみられることが報告された。従って、体節中胚葉から背側大動脈細胞への分化過程のどこかのステップで、Notch が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

これらの背景を受け、本研究では体節中胚葉に由来する細胞がどのような仕組みで背側大動脈を形成するのかについて、その分子機構を明らかにすることを目的とした。まず、体節組織の中で Notch は活性化されるのか、されるとしたらいつどの細胞で活性化されるのかについて、Notch シグナル可視化レポーターを用いて解析した。これらの解析から体節内の限定された領域の細胞が Notch を活性化されることがわかった。次にこれらの観察結果に基づき、Notch シグナルが細胞のどのような挙動を制御しているのかについて解析した。Notch 活性細胞は胚内を長距離移動した後に背側大動脈に辿り着くなど、全く新規な挙動を見いだした。これらの知見をさらに発展させ、Notch 細胞の移動の制御機構や、Notch の下流で作用する可能性があるエフリンシグナルの役割を明らかにした。これらの解析をとおして、発生過程において形成される初期血管パターンの仕組みに共通する機構の理解をめざした。

## 3. 研究の方法

### (1) モデル動物

主に、ニワトリ初期胚をモデル動物として用いた。初期胚の予定体節中胚葉領域に、エレクトロポレーション法を用いて目的とする遺伝子を導入し、体節中胚葉特異的な遺伝子操作を行った。また遺伝子操作と組織移植操作などを組み合わせた解析を行った。

(2) 遺伝子導入に用いた plasmid など。Notch-レポーター、恒常活性型 Notch、恒常抑制型 Notch、エフリン、GFP 遺伝子、Tet-on 誘導型発現 plasmid、Tol2-発現 plasmid。アポトーシス抑制型 p35 遺伝子。

(3) 体節中胚葉細胞内に目的とする遺伝子を導入・発現させ、細胞のその後の挙動を追跡した。Notch 細胞の背側大動脈への移動に関しては、背側大動脈による誘因効果をみるために、大動脈を異所的な場所に移植し、Notch 細胞を誘引する能力について評価した。遺伝子操作されたトリ胚は、固定後組織切片を作成して蛍光顕微鏡化で細胞の胚内局在などを観察した。通常、孵卵後1-2日目胚に遺伝子導入し、3-4日目胚を解析の対象としてサンプリングした。後期胚内における遺伝子導入細胞の局在については、それぞれの組織切片データをデジタル処理して3次元再構築させ、立体画像解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) Notch は各体節の後半部で活性化される  
内在性の Notch 活性に反応して GFP シグナルを発するレポータープラスミドを用いて体節内における Notch 活性を解析したところ、各体節の後ろ半分でのみ Notch 活性が認められた。これらの細胞をさらに後期の胚で観察したところ、背側大動脈内の内皮細胞で Notch 活性が認められた。

これらの結果を受け、恒常活性型 Notch を体節細胞内で発現させたところ、やはり各体節の後半部でのみ導入遺伝子の局在が認められた。

(2) 体節の前半部で Notch が活性化されるとアポトーシスをおこして死滅する  
体節の前領域と後領域で Notch 活性細胞の局在が異なる原因を探るにあたり、Notch 細胞は体節前半部では生存できない可能性を考え、この領域におけるアポトーシスを調べた。結果、仮説どおりに体節前半部ではアポトーシスをおこす細胞の数が後半部よりも有意に多いことがわかった。Notch リガンドの Delta1 が体節の後半部において発現していることなどから、正常の発生過程においては、体節の後半部内で Notch 活性細胞が出現し、これらの細胞を後半部領域にのみ局在させるために、前半部では生存できない環境が作

られている可能性が考えられる。体節の前半部は、末梢神経の前駆体である神経冠細胞が増殖、移動する場所であることから、神経系の細胞と血管系の細胞が一つの体節を「住み分けている」という興味深い可能性も浮上した。

(3) Notch 活性化細胞は背側大動脈方向に移動する

体節後半部に出現した Notch 活性化細胞のその後の挙動を追跡したところ、これらの細胞は積極的に移動し、胚体の腹側に存在する背側大動脈まで辿り着くことがわかった。体節内に抑制型 Notch 遺伝子を発現させると細胞の移動はみられないことから、Notch シグナルが背側大動脈方向への移動に重要であることが伺える。

(4) 背側大動脈に辿り着いた Notch 細胞は、主に内皮細胞に分化する

背側大動脈に辿り着いた Notch 活性化細胞は、主に大動脈の内皮組織を形成した。内皮細胞に加えて、大動脈をとりまく平滑筋細胞にも分化した。

(5) Notch 細胞は、背側大動脈からの誘引シグナルによって移動する

体節から背側大動脈への移動の制御をさらに詳しく解析するために、背側大動脈による誘引能に注目した。一つ目のアプローチとして、一旦背側大動脈方向に移動した細胞を取り出し、それらを別の胚の大動脈とは離れた場所に移植した。結果、これらの細胞は再び背側大動脈方向に積極的に移動した。二つ目のアプローチとして、背側大動脈自身を異所領域に移植し、そのときの Notch 細胞の挙動を調べた。結果、Notch 細胞は本来の背側大動脈に加えて、異所大動脈方向にも移動し、内皮組織を形成した。これらの観察結果から、背側大動脈は積極的に Notch 活性化細胞を誘引している可能性が強く示唆された。背側大動脈による誘引シグナルの分子実態は未解明であるが、VEGF である可能性は低い。

(6) 体節の後半部を移動して辿り着いた細胞は、背側大動脈の中で広範囲に拡がる

上記の解析結果から、背側大動脈をつくる血管前駆細胞は、各体節の後半領域にそって移動した後に、大動脈内に参入することが明らかになった。それでは、分節パターンに沿って参入する細胞群が、一体どのようにしてその後のスムーズな大動脈を構成するのだろうか？この疑問に答えるために、背側大動脈に到達後の Notch 活性化細胞を発生後期の段階まで追跡した。このような長期間にわたる細胞の追跡には、安定的な細胞標識法を必要とする。そこで、我々が近年開発した Tol2

トランスポゾン法を用いて Notch 細胞を追跡した。Tol2 トランスポゾン法を用いると、エレクトロポレーション法によって細胞内に導入された遺伝子がゲノム内に安定的に組み込まれるため、遺伝子操作された細胞の増殖の有無に関わらず長期間にわたって半永久的に標識できる。

Tol2 発現ベクターに組み込んだ Notch 遺伝子を体節内に導入し、それらの細胞を 8 日目胚まで追跡した。結果、すでに述べたように体節の後半部を移動して到達した細胞は、背側大動脈内に侵入後、内皮組織内の位置をダイナミックに変化させることにより、最終的には大動脈全体に広く分布することがわかった。

本研究から、初期胚にみられる血管の形成過程とその制御機構の一端が明らかになった。特に、血管前駆細胞が長距離を移動した後に血管内に侵入する現象はこれまで全く知られていなかったものであり、これらの移動機構のさらなる理解は、成体におけるがん転移のメカニズムの解明に貢献することが期待される。加えて、血管前駆細胞が体節の後半領域のみを移動する現象は、体節の前半領域に限局して移動する神経冠細胞と対照的であり、神経系細胞と血管系細胞がみせる移動経路の特異性の決定機構に関して、新規コンセプトの提唱に道を開いた。本研究をさらに発展させてさまざまな組織間にはたらく相互作用の分子実態を解明することにより、体作りやがん転移の仕組みの理解につなげたい。

## 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 18 件)

① Watanabe, T., Sato, Y., Saito, D., Tadokoro, R., Takahashi, Y. Ephrin B2 coordinates the formation of a morphological boundary and cell epithelialization during somite segmentation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 7467-7472, 2009, 査読有

② Sugio, M., Takeuchi, K., Kutsuna, J., Tadokoro, R., Takahashi, Y., Yoshida-Noro C, Tochinai S., Exploration of embryonic origins of germline stem cells and neoblasts in *Enchytraeus japonensis*, *Gene Expression Patterns*, Vol. 8, 227-236, 2008, 査読有

③ Sato, Y., Watanabe, T., Saito, D., Takahashi, T., Yoshida, S., Kohyama, J., Ohata, E., Okano, H., Takahashi Y. Notch mediates the segmental specification of

angioblasts in somites and their directed migration toward the dorsal aorta in avian embryos, *Developmental Cell*, Vol.14, 890-901, 2008, 査読有

④ Takahashi, Y., Sato, Y. Somitogenesis as a model to study the formation of morphological boundaries and cell epithelialization, *Dev. Growth Differ.*, Vol. 50, 149-155, 2008, 査読有

⑤ Takahashi, Y., (他 4 名, 1 番目). Transposon-mediated stable integration and tetracycline-inducible expression of electroporated transgenes in chicken embryos, *Methods in Cell Biology*, Vol. 87, 237-256, 2008, 査読有

⑥ Takahashi, Y., (他 4 名, 1 番目). Transposon-mediated stable integration and tetracycline-inducible expression of electroporated transgenes in chicken embryos, *Methods in Avian Embryology, Methods in Cell Biology*, Vol. 87, 2008, 査読有

⑦ Takahashi, Y., Sato, Y. Somitogenesis as a model to study the formation of morphological boundaries and cell epithelialization, *Dev. Growth Differ.*, Vol. 50, 149-155, 2008, 査読有

⑧ Reza, H. M., Nishi, H., Kataoka, K., Takahashi, Y., Yasuda, K. L-Maf regulates p27kip1 expression during chick lens fiber differentiation, *Differentiation*, Vol. 75, 737-744, 2007, 査読有

⑨ Reza, H. M., Takahashi, Y., Yasuda, K. Stage-dependent expression of Pax6 in optic vesicle/cup regulates patterning genes through signaling molecules, *Differentiation*, Vol. 75, 726-736, 2007, 査読有

⑩ Watanabe, T., Saito, D., Tanabe, K., Suetsugu, R., Nakaya, Y., Nakagawa, S., Takahashi, Y., Tet-on inducible system combined with in ovo electroporation dissects multiple roles of genes in somitogenesis of chicken embryos, *Developmental Biology*, Vol. 305, 625-636, 2007, 査読有

⑪ Sato, T., Kasai, Nakagawa, S., Tanabe, J., Watanabe, T., Kawakami, K., Takahashi, Y. Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos, *Developmental Biology*, Vol. 305, 616-624, 2007, 査読有

⑫ Watanabe, T., Saito, D., Tanabe, K., Suetsugu, R., Nakaya, Y., Nakagawa, S., Takahashi, Y. Tet-on inducible system combined with in ovo electroporation dissects multiple roles of genes in

somitogenesis of chicken embryos, *Developmental Biology*, Vol. 305, 625-636, 2007, 査読有

⑬ Sato, T., Kasai, T., Nakagawa, S., Tanabe, J., Watanabe, T., Kawakami, K., Takahashi, Y., Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos, *Developmental Biology*, Vol. 305, 616-624, 2007, 査読有

⑭ Tanabe, K., Takahashi, Y., (他 4 名, 2 番目). Cadherin is required for dendritic morphogenesis and synaptic terminal organization of retinal horizontal cells, *Development*, Vol. 133, 4085-4096, 2006, 査読有

⑮ Tadokoro, R., Sugio, M., Kutsuna, J., Tochinali, S., Takahashi, Y. Early segregation of germ and somatic lineages during gonadal regeneration in the annelid, *Enchytraeus japonensis*, *Current Biology*, Vol. 16, 1012-1017, 2006, 査読有

⑯ Saito, D., Yonei-Tamura, S., Takahashi, Y., Tamura, K., Level-specific role of paraxial mesoderm in regulation of Tbx5/Tbx4 expression and limb initiation, *Developmental Biology*, Vol. 292, 79-89, 2006, 査読有

⑰ Oka, Y., Sato, Y., Tsuda, H., Hanaoka, K., Hirai, Y., Takahashi, Y., Epimorphin acts extracellularly to promote cell-sorting and aggregation during the condensation of vertebral cartilage, *Developmental Biology*, Vol. 291, 25-37, 2006, 査読有

⑱ Aoki, H., Hara, A., Nakagawa, S., Motohashi, T., Hirano, M., Takahashi, Y., Kunisada, T., Embryonic stem cells that differentiate into RPE cell precursors in vitro develop into RPE cell monolayers in vivo, *Experimental Eye Research*, Vol. 82, 265-74, 2006, 査読有

[学会発表] (計 21 件)

① 高橋淑子, Neural crest cell migration and contribution to the adrenal glands is regulated by multiple factors mediated by CXCR4/SDF1, BMP4, and transcription factor SF-1, BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会) 2008. 12. 10, 神戸

② 高橋淑子, 器官形成における細胞挙動を制御する遺伝プログラム, 遺伝医学セミナー, 2008. 9. 6, 大阪

③ 高橋淑子, 器官形成にみる細胞の奇妙なふるまい, 第 20 回高遠・分子細胞生物学シンポジウム, 2008. 8. 21, 長野

④高橋淑子, Neural crest cell migration to the adrenal gland is regulated by CXCR4/SDF1, BMP4, and transcription factor SF-1, The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (第31回日本神経科学大会) 2008.7.10, 東京

⑤高橋淑子, 血管発生と細胞移動, サントリー生物有機科学研究所, 2008.6.18, 大阪

⑥高橋淑子, Secondary neurulation: a novel model to study tubulogenesis (神経管形成をモデルとした上皮管構造の成り立ち), 41th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (第41回日本発生生物学学会大会), 2008.5.28, 徳島

⑦高橋淑子, 血管発生と細胞移動, 日本分子生物学会第8回春季シンポジウム, 2008.5.26, 札幌

⑧高橋淑子, Transposon-mediated stable integration of genes into migrating cells during blood vessel patterning, *Experimental Biology* 2008, 2008.4.6, USA.

⑨高橋淑子, Neural crest cell migration to the adrenal gland: CXCR4/SDF1 and BMP mediate guidance, while SF-1 is involved in target recognition, NAIST GCOE International Symposium Developmental Biology, 2008.1.15, 奈良

⑩高橋淑子, 体作りにおける細胞の社会～遺伝子から個体まで～, 日本醸造学会大会, 2007.9.4, 東京

⑪高橋淑子, 血管の発生とパターンニング, 第5回血液・血管オルビスシンポジウム, 2007.8.25, 東京

⑫高橋淑子, バイオ研究の楽しさとは～細胞の挙動を探る～, 東洋紡バイオ財団設立25周年記念シンポジウム, 2007.6.1, 大阪

⑬高橋淑子, Somitic contribution to the formation of dorsal aorta involves cell migration regulated by Notch and Ephrin, 第40回発生生物学会第59回細胞生物学会合同大会, 2007.5.28, 福岡

⑭高橋淑子, Cell migration and vascular patterning in the body, 4th NIBB-EMBL MEETING "CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY", 2007.5.24, 岡崎

⑮高橋淑子, Stable Integration and Tet-on Inducible expression of electroporated transgenes in chicken embryos, First International Meeting "The Chick as a model organism: genes, development and function", 2007.4.11, Barcelona

⑯高橋淑子, Vascular patterning involves dynamic migration of somatic cells mediated by chemokine, SDF-1/CXCR4. 日本分子生物学会2006 フォーラム「分子生物学

の未来」シンポジウム「器官形成を支える細胞のふるまい」2006.12.6～8, 名古屋

⑰高橋淑子, Epithelial-mesenchymal transition is regulated by three-dimensional environment during organogenesis., 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress 2006.6.18～23, 京都

⑱高橋淑子, Cell migration and epitheliogenesis during organogenesis., Osaka-NAIST Joint COE Symposium "Cells into Organisms" 「細胞から個体まで」2006.6.17, 奈良

⑲高橋淑子, Transposon-mediated gene transfer enables an exogenously introduced transgene to be stably retained and expressed in chicken embryos. 2006年日本発生生物学会第39回大会 2006.5.31～6.3, 広島

⑳高橋淑子, Migratory behaviors of adrenomedulla-fated neural crest cells are instructed by the adrenal cortex. "New perspectives in Neural Crest development" 2006.5.2-7, France

㉑高橋淑子, Early segregation of Germand somatic lineages during gonadal regeneration in the annelid, *Enchytraeus japonensis.*, 52nd NIBB Conference 'Reproductive Strategies' 岡崎国際シンポジウム「生き物の生殖における戦略」2006.1.20-23, 岡崎

[図書] (計5件)

①Ohata, E., Takahashi, Y., Springer Japan, Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology, 2009, 37-42

②Sato, Y., Takahashi, Y., Springer Japan, Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology, 2009, 17-24

③吉野剛史, 下北英輔, 高橋淑子, 細胞形成を支える EMT, 秀潤社, 細胞工学, 2008, Vol.27, 337-342

④大畑絵美, 高橋淑子, 共立出版, 蛋白質核酸酵素, 発生過程における細胞移動, 2006, Vol.51, 742-746

⑤吉野剛史, 仲矢由紀子, 高橋淑子, 羊土社, 実験医学, からだ作りにみる上皮-間充織転換, 2006, Vol.24, 194-202

[その他]

(新聞掲載)

①大動脈の形成、解明 (血管再生医療に道), 日本経済新聞、日経産業、産経、その他各紙、2008.6

②組織を切断する遺伝子解明, 毎日新聞、日

経産業、産経、その他各紙、2009.5

③ミミズ生殖器再生解明、日経産業新聞、朝日、毎日、その他各紙、2006.5

(ホームページアドレス)

<http://bsw3.naist.jp/takahashi/takahashi.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 淑子 (YOSHIKO TAKAHASHI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号 10183857

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし