

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：32666

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20748

研究課題名（和文）個体の成長に伴う血管の形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）The mechanism of adult vessel formation

研究代表者

羽田 優花（Haneda, Yuka）

日本医科大学・大学院医学研究科・ポストドクター

研究者番号：80962349

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：脊椎動物において血管形成は胚発生の初期から始まり、出生するまでに全身の血管ネットワークが構成されるが、成長期に成体の血管が作られるプロセスについては、ほとんど研究が進んでいない。我々は、ゼブラフィッシュをモデル動物として用い、発生期に分化した血管内皮細胞が成体血管の形成にどの程度寄与しているか検討した。生後一カ月の稚魚の血管を観察したところ、ほとんどの血管内皮細胞が発生期に標識された細胞であった。これは、新たに形成された血管が寄与するのではなく、発生期に分化した血管内皮細胞がほぼ全身の成体血管を形成することを示す重要な発見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では発生期に標識した血管内皮細胞の系譜追跡解析により、成体の血管内皮細胞は発生期のごく早い時期にできた細胞が分裂増殖をすることによって形成されることを明らかにした。このことは個体や機能的な臓器が形作られる仕組みを理解するうえで極めて重要であり、成長障害や臓器の形成不全、血管関連疾患の治療法開発においても大きな意義を持つ。今後さらに、臓器の飛躍的な拡大が起こる成長期に血管ネットワークがどのように構築されるかを明らかにすることによって、臓器形成と関連した血管構築について新たな視点を提供することにつながる。

研究成果の概要（英文）：In vertebrates, vascular formation begins early in embryonic development, and a complete vascular network is established by the time of birth. However, the process by which adult blood vessels are formed during the growth phase has not been extensively studied. We used zebrafish as a model organism to investigate the extent to which embryonic vascular endothelial cells contribute to the formation of adult blood vessels. Observation of the fish of 1 month post fertilization revealed that most of the vascular endothelial cells were those labeled during embryonic stage. This significant finding indicates that, rather than newly formed blood vessels contributing, the embryonic vascular endothelial cells form almost the entire network of adult blood vessels.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管発生 系譜追跡実験 成長 ゼブラフィッシュ イメージング

1. 研究開始当初の背景

私たちヒトの体の中には、10万キロメートルもの長さの血管が張り巡らされており、あらゆる臓器の生存や機能維持に必須の生命のパイプラインとして機能している。血管を構成する血管内皮細胞は、発生期中胚葉から血管芽細胞を介して作られ、その後、脈管形成と血管新生という二つの形態形成プロセスを経て体内に血管網を構築する。そのため、出生児の体内には、既に血管網を有する各臓器が形成されている。しかし、その後の成長によって、出生時3kg程度だった体重が60kg程度まで増加し、それに伴って体・臓器のサイズが拡大する。このとき、体内の各臓器における血管も飛躍的に増加すると考えられるが、個体の成長に伴って誘導される血管形成が、どのような機構で制御されているかは、ほとんど明らかにされていない。

また、成体の血管には、CD157陽性の高い自己増殖能を有する内皮細胞が存在し、成体血管の維持に関与することが報告されている (Cell Stem Cell 22.3: 384-397, 2018)。しかし、発生期の内皮細胞の中にも、このような自己増殖能の高い内皮細胞が存在し、成長に伴う血管形成に寄与しているかについては不明である。

以上を踏まえ、我々はこれまでに構築してきたトランスジェニック動物作成技術と蛍光イメージング技術を用いて、発生期に形成された血管内皮細胞を蛍光ラベルし成魚になるまで追跡することで、発生期に形成された血管内皮細胞が成魚の血管を形成しているかどうかを明らかにした。

2. 研究の目的

成長期の血管形成は発生期に形成された血管内皮細胞の増殖・分裂に依存するのか、さらにその際に増殖率は均等なのか否かという問いに答えることで、「個体の成長に伴う血管の形成メカニズム」を明らかにすることが目的である。

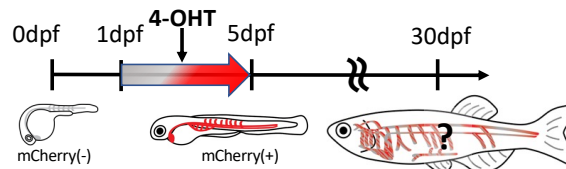
3. 研究の方法

(1) 蛍光イメージング解析に使用したゼブラフィッシュライン

ゼブラフィッシュを用いた動物実験は、日本医科大学の実験動物委員会での承認を受け、当大学の動物実験の指針を遵守して遂行した。発生期に形成された血管内皮細胞を系譜追跡するため、血管内皮特異的プロモーター(*fli1* や *kdr1*)制御下で GFP と CreERT2 を発現するゼブラフィッシュを樹立し、Cre 依存性に mCherry を発現するレポーター魚と交配することで、4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) 処理依存性に血管内皮細胞を遺伝的に標識する系を構築した(図1)。

図1. 発生初期に形成された全身血管のラベル方法

発生初期に組織化した血管がmCherry、全身血管がeGFPでラベルされる魚
Tg(*fli1*:CreERT2);Tg(*ubb:loxP-stop-loxP-mCherry*);Tg(*fli1*:eGFP)



(2) 蛍光イメージング解析方法

受精後5日目(5dpf)までの稚魚については麻酔をかけ0.6%アガロースゲルに埋めてコンフォーカル顕微鏡を用いてライブイメージングを行なった。

発生期に標識した魚は約1ヶ月後に、4%PFA固定後、皮膚と頭蓋骨、左半身の腹壁を除去した上でCUBIC1a, CUBIC2 (Susaki et al. Cell 157.3: 726-739, 2014)を用いて透明化し、コンフォーカル顕微鏡または卓上ライトシート顕微鏡(descSPIM, <https://doi.org/10.1101/2023.05.02.539136>)を用いて観察した。取得したデータを用いた細胞数の計測はImaris(GraphPad)を用いて行なった。

4. 研究成果

(1) 発生期の血管内皮細胞のラベル

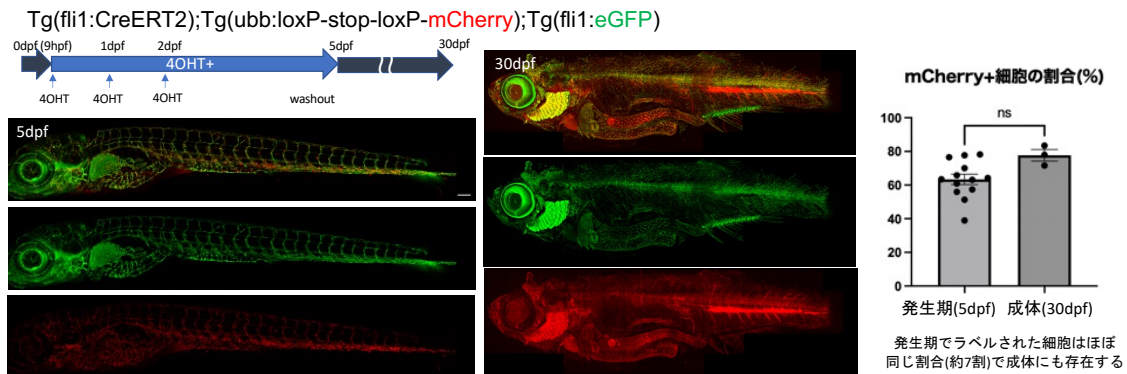
発生期の全身血管を効率よく標識するための検討を行なった。血管内皮特異的プロモーター*kdr1*を用いて作成した Tg(*kdr1*:CreERT2)とレポーターライン Tg(*ubb-loxP-stop-loxP-mCherry*)を掛け合わせて0~5dpfまで4-OHT処理した場合は静脈由来の血管(腸や肝臓などの血管)が標識できなかったため、別の血管内皮特異的プロモーターである *fli1* プロモーターを用いて同様に魚を作成した。この場合は動静脈どちらの由来の血管もラベルされたが、5割ほどの組み換え効率にとどまった。

次に、CreERT2のCre配列をゼブラフィッシュにコドン最適化して Tg(*fli1*:CreERT2opt)を作成して実験に用いたところ、全身の7割以上の血管が標識された。

(2) 1ヶ月齢稚魚における発生期にラベルした細胞の観察

0~5dpf まで 4-OHT 処理した *Tg(fli1:CreERT2opt);Tg(ubb-loxP-stop-loxP-mCherry);Tg(fli:eGFP)* を 1 ヶ月後に観察したところ、発生期に標識した時と同程度の約 7 割の血管内皮細胞が標識されていた。このことは、成体の血管内皮細胞は、成長過程で別の細胞が付け加わるのではなく、発生期に分化した血管内皮細胞が分裂増殖をすることによって形成されることを示唆している(図 2)。一部、mCherry 単独陽性もしくは eGFP 単独陽性の部位が存在する可能性があるが、これらについては今後の課題としたい。

図2. 発生期に形成された血管内皮細胞の系譜追跡



(3) 成魚の血管内皮細胞を構成する細胞が形成される時期の特定

これまでの解析では 0~5dpf で 4-OHT 処理をしていたが、その中でいつ成体血管の元となる血管が構築されるのかを特定するために時期を狭めて 4-OHT 処理をして観察した。すると、受精後 24 時間(24hpf)~30hpf の 6 時間のみ 4-OHT 処理した場合も約 7 割の血管内皮細胞が標識されることが明らかとなった。

(4) 成長期の血管内皮細胞の増殖率の検討

Tg(fli1:CreERT2);Tg(ubb-loxP-stop-loxP-mCherry);Tg(fli:eGFP) を用いて 24~33hpf の任意の 1 時間のみ 4-OHT 処理をして 5dpf に観察すると、発生期に形成された血管内皮が mCherry でまばらにラベルされた。これを 1 ヶ月後に観察したところ、mCherry 陽性の血管内皮コロニーは全身にまばらに存在し、その大きさはさまざまであった。この結果から、成長期の血管内皮細胞の増殖率は均一ではなく、増殖率の高い細胞と低い細胞が存在する可能性が示唆された。

(5) まとめと考察

成体の血管内皮細胞は、発生期のごく早い時期(受精後 30 時間)に形成された細胞が分裂増殖をすることによって形成されることが明らかとなった。

また、発生過程でできた血管内皮細胞のなかには成長期において高い増殖活性を示すものがあることが示唆されたため、今後はこのような細胞のマーカー遺伝子や組織学的な解析をさらに進める。

成長期には各臓器が飛躍的に体積を増大させるだけでなく、それぞれの機能に適した血管が構築される。近年、これら臓器特異的な血管形成機構が精力的に研究されているが、個体の成長という観点からの研究はなされていない。成長期に各臓器が発達する時、発生期に形成された血管ネットワークを維持しているのか、もしくは血管新生によって新たなネットワークを構築するのか、などの疑問に対して、今後は臓器ごとに形態解析をしていくことで成体血管の構築メカニズムをさらに明らかにしていく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1 . 著者名 Otomo, K., ..., Watanabe-Takano, H., Haneda, Y., Fukuhara, S., ...& Susaki, A.E	4 . 巻 -
2 . 論文標題 descSPIM: an affordable and easy-to-build light-sheet microscope optimized for tissue clearing technique	5 . 発行年 2024年
3 . 雑誌名 nature communications	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 有
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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 羽田優花
2 . 発表標題 臓器特異的な血管形成における血流の役割とその制御機構の解明
3 . 学会等名 分子生物学会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 羽田優花
2 . 発表標題 The Role of Blood Flow and Its Regulatory Mechanisms
3 . 学会等名 第8回 血管生物若手研究会
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 羽田優花
2 . 発表標題 臓器特異的な血管形成における血流の役割とその制御機構の解明
3 . 学会等名 CVMW
4 . 発表年 2023年

1．発表者名 羽田優花
2．発表標題 個体の成長に伴って血管が構築される仕組みの解明
3．学会等名 第9回 血管生物若手研究会
4．発表年 2024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

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
---------	---------