

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22122004

研究課題名（和文）血管 - 神経ネットワークの形成・維持に関わる相互依存性

研究課題名（英文）Establishment of neuro-vascular interactions

研究代表者

高橋 淑子（Takahashi, Yoshiko）

京都大学・理学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：10183857

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 157,700,000 円

研究成果の概要（和文）：主に個体発生過程における血管 - 神経相互作用に注目し、その相互作用の意義と分子実体の解明を目的として研究を行った。末梢神経系においては、その前駆体である神経堤細胞の挙動が、さまざまな血管性因子によって時空間的な制御を受けていることがわかった。中枢神経系においては、新たに形成される血管と神経分化との相関や、脳損傷時における神経再生過程に關与する血管の新たな役割が見出された。本研究をとおして、血管 - 神経ワイヤリングの初期成立機構の理解が大きく進んだ。

研究成果の概要（英文）：Neuro-vascular interactions have been found to play important roles in development of both neural networks and vascular networks. In particular, for the morphogenesis of neural crest cells, signals produced by the dorsal aorta are critical. In the central nervous system, the patterning of blood vessels is determined by differentiation states of neuronal cells in the spinal cord. We have also revealed a novel role of fibronectin in inter-tissue signaling. The findings obtained in this study open a new way for understanding how the neuro-vascular wiring is established and functions, which might also be applicable for other inter-tissue signaling.

研究分野：発生生物学

キーワード：血管 神経 相互作用 ワイヤリング 神経堤細胞 自律神経 細胞移動 細胞分化

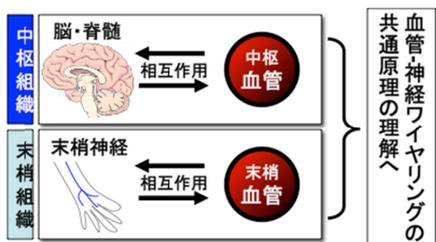
1. 研究開始当初の背景

血管網と神経網が生体内の二大ネットワークとして機能する際、両者間には双方向のシグナルが働き(血管-神経ワイヤリング) これらのシグナル破綻は、血管-神経ネットワークの形成不全、そして神経退縮や高次機能障害を引き起こす原因の一つと考えられている。しかしながら血管-神経ワイヤリングの形成や維持機構についてはほとんど理解されていなかった。その大きな理由として、これらの問題解決にふさわしい解析アプローチがなかったことが挙げられる。

高橋そして分担者の澤本の研究グループは、血管と神経の双方を同一個体内で遺伝子操作する新手法を用いて、発生中の胚内では両者が相互依存的に形成されること、そして成体脳においては新生ニューロンの挙動制御に近傍血管が重要であることなどを見出していた(高橋(研究代表者)ら *Dev. Cell* 2008、*PNAS* 2009、澤本(分担者) *Stem Cells* 2010)。

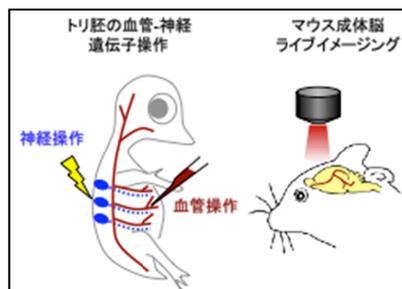
2. 研究の目的

そこで本研究では、血管-神経ワイヤリングの形成機構とその意義について、細胞から器官レベルまで横断的に解析する。中枢神経(脳や脊髄)と末梢神経では、血管との関わり方が形態学的に異なるため、まず中枢・末梢それぞれに特化した解析を行った。中枢神経系を用いた解析では未分化神経細胞と血管との相互作用について、また末梢神経系に関しては神経細胞の移動やその後の軸索形成の過程における血管との相互作用に注目する。血管-神経間の相互作用が生体内のいつ・どこで・どのように働くかを明らかにする本研究と、研究項目[A02]で進行する血管-神経間シグナルの作用機序に関する知見とを統合し、最終的に血管-神経ワイヤリングを支える共通の分子機構(共通原理)の理解をめざす。



3. 研究の方法

主にトリ胚およびマウスを用いた研究を行った。



3-1. 末梢神経と血管

末梢神経細胞を作り出す幹細胞である神経堤細胞(NC細胞)に注目し、その挙動を制御する血管由来のシグナルを探った。独自に開発した血管特異的遺伝子操作法や移植操作法を施し、(NC細胞)の移動に与える影響を調べた(高橋)。

3-2. 中枢神経と血管

発生中の脊髄において、血管が走向する領域としない領域が存在することに注目し、脊髄と血管走行との相関を解析した。脊髄内にエレクトロポレーション法によって遺伝子を導入し、神経細胞の分化形質を変化させたときの、血管形成に与える影響を解析した(高橋)。また成体脳における新生ニューロンと近傍血管との相互作用の解明に向けて、二光子顕微鏡を用いたマウス脳内の血管-神経同時ライプイメージング法を用いた解析を行った(澤本)。血管内皮細胞、血管を取り囲むアストロサイト、新生ニューロン等を蛍光蛋白質で標識し、ニューロンの移動動態を解析した。

4. 研究成果

4-1. 神経前駆細胞由来の形態形成を制御する血管性シグナルの解明(高橋):

初期発生における神経堤細胞(NC細胞)由来の交感神経節前駆細胞の複雑な形態形成が、背側大動脈によって制御されることを世界に先駆けて発見した。血管性のBMPが周囲の細胞に作用しケモカインやNeuregulin1などが発現されることで、NC細胞に対する誘引活性が調節されることがわかった。副腎髄質の形成にも血管性シグナルが関与することをつきとめ、長い間の論争に終止符を打った(*Science* 2012)。原著論文に報告したこれらの内容と、関連する世界的先端研究

をまとめて総説として発表した(*Science* 2013)。この総説は、[A01-4]榎本(秀)との共著であり、本領域から生み出された成果が濃縮された総説として一定のインパクトを与えることができた。

4-2. 中枢神経系における血管走向制御機構の解明(高橋):

中枢神経系(脳・脊髄)は体のなかで最も酸素消費量の多い器官であり、脳・脊髄の内部に作られる血管ネットワークの形成は厳密な制御を受ける。トリ胚脊髄をモデルとして、脊髄内の神経未分化層(内側に存在)と、分化神経層(外側に存在)の境界領域が血管形成の場を提供していること、また VEGF とアンチ VEGF の活性がバランスよく制御されることなどを見出した。この機構は、中枢神経組織全体にわたる血管ワイヤリング基本原理として認識されうる(*PLoS ONE* 2015)。

4-3. 組織ワイヤリングを制御するシグナリング(高橋):

血管-神経ワイヤリングを支える分子機構の本質として、細胞外基質(ECM)に注目し、[A02-5]の関口グループと共同研究を行った。ECMの多組織間における分子挙動を可視化したところ、ECMの代表的分子であるファイブロンネクチンが隣接組織にトランスロケートするという事実を掴んだ。生体内で ECM が多組織間をやりわたるといった現象の報告は世界でも例がなく、大きなインパクトを与えた(*PNAS* 2014)。同様に、組織ワイヤリングを代表する管組織の伸長を制御する分子として、FGF8 が重要な働きをもつことを見出した。特筆すべきこととして、胚全体の成長が FGF8 の作用領域を規定することにより、胚成長レートがそのままワイヤリング成長を制御するという新規コンセプトを打ち出すことができた(*Development* 2015)。

4-4. 新生ニューロンの移動メカニズムの解明:(澤本):

マウス成体脳において、新生ニューロンは血管を含めた一定のルートに沿って移動する。その制御メカニズムとして、ニューロンがアストロサイトに作用してトンネル状の通り道を形成させること(*Neuron* 2010)や、RhoGAP 蛋白質 Gmp1

によるブレーキング機構(*Nat Commun* 2014)などを解明した。また二光子顕微鏡を用いた in vivo ライブイメージングによって、感覚入力依存的な神経再生機構を見出すと共に、これらの機構に血管が関与することを見出した(*J Neurosci* 2011)。さらに脳内の血管に沿って神経細胞が移動する機構を解析し、血管基底膜を模倣したバイオマテリアルを用いて傷害部への移動を促進することに成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 20 件(高橋分))

すべて査読あり。*コレスポンディングオーサー

研究代表者 高橋淑子

1. Takahashi, T., Takase, Y., Yoshino, T., Saito, D., Tadokoro, R. and *Takahashi, Y.: Angiogenesis in the developing spinal cord: Blood vessel exclusion from neural progenitor region is mediated by VEGF and its antagonists. *PLOS ONE*, 10(1): e0116119, 2015 (DOI: 10.1371/journal.pone.0116119)
2. Yoshino, T., Saito, D., Atsuta, Y., Uchiyama, C., Ueda, S., Sekiguchi, K. and *Takahashi, Y.: Interepithelial signaling with nephric duct is required for the formation of overlying coelomic epithelial cell sheet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 111(18):6660-6665 2014 (DOI: 10.1073/pnas.1316728111)
3. Takase, Y., Tadokoro, R. and *Takahashi, Y.: A low cost labeling with highlighter ink efficiently visualizes developing blood vessels in avian and mouse embryos. *Dev. Growth Differ.*, 55(9):792-801 2013 (DOI:10.1111/dgd.12106)
4. *Takahashi, Y., Sipp, D. and *Enomoto, H.: (Review) Tissue interactions in neural crest cell development and disease. *Science*, 341(6148): 860-863 2013(DOI: 10.1126/science.1230717)
5. Atsuta, Y., Tadokoro, R., Saito, D. and *Takahashi, Y.: Transgenesis of the Wolffian duct visualizes dynamic behavior of cells undergoing tubulogenesis in vivo. *Dev. Growth Differ.*, 55(4): 579-90 2013 (DOI:10.1111/dgd.12047)
6. Saito, D., Takase, Y., Murai, H. and *Takahashi, Y.: The dorsal aorta initiates a molecular cascade that instructs sympatho-adrenal specification. *Science*, 336(6088): 1578-1581 2012 (DOI:10.1126/science.1222369)
7. Yoshino, T., Saito, D., Tadokoro, R. and *Takahashi, Y.: In vivo gene manipulations of epithelial cell sheets: a novel model to study epithelial-to-mesenchymal transition.

- Dev. Growth Differ.*, 53(3): 378-388 2011 (DOI:10.1111/j.1440-169X.2011.01252.x)
8. Shimokita, E. and *Takahashi, Y.: Secondary neurulation: fate-mapping and gene manipulation of the neural tube in tail bud. *Dev. Growth Differ.*, 53(3): 401-410 2011 (DOI:10.1111/j.1440-169X.2011.01260.x)
 9. Yokota, Y., Saito, D., Tadokoro, R. and *Takahashi, Y.: Genomically integrated transgenes are stably and (DOI:10.1016/j.ydbio.2011.02.001)
 10. Watanabe, T. and *Takahashi, Y.: Tissue morphogenesis coupled with cell shape changes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 20(4): 443-447 2010 (PMID: 20677359)

研究分担者 澤本和延

11. *Ajioka, I., Jinnou, H., Okada, K., Sawada, M., Saitoh, S. and *Sawamoto, K.: Enhancement of neuroblast migration into the injured cerebral cortex using laminin-containing porous sponge. *Tissue Eng. Part A*, 21: 193-201 2015 (DOI:10.1089/ten.tea.2014.0080)
12. Ota, H., Sawada, M., Nishioka, T., Matsumoto, M., Komura, M., Ohno, A., Kamiya, T., Miyamoto, T., Asai, N., Enomoto, A., Takahashi, M., Kaibuchi, K., Sobue, K. and *Sawamoto, K.: Speed control for neuronal migration in the postnatal brain by Gmip-mediated local inactivation of RhoA. *Nat. Commun.*, 5: 4532 2014 (DOI: 10.1038/ncomms5532)
13. Kaneko, N., Marin, O., Koike, M., Uchiyama, Y., Wu, J.Y., Lu, Q., Tessier-Lavigne, M., Alvarez-Buylla, A. and *Sawamoto, K.: New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron*, 67:213-223 2010 (DOI:10.1016/j.neuron.2010.06.018)

〔学会発表〕(計 43 件)

招待講演のみ抜粋

1. Takahashi, Y.: Angiogenesis in the developing spinal cord: blood vessel exclusion from neural progenitor region is mediated by VEGF and its antagonists. 2nd International Symposium of Neurovascular Wiring, Kyoto, 2015.1.28
2. Takahashi, Y.: Cell migration during morphogenesis and development. “Centre for Reproduction, Development and Growth Symposium”, the Cheung Kung Hai Conference Centre, Li Ka Shing Faculty of Medicine, Hong Kong, 2014.12.12
3. Takahashi, Y., Murai, H., Sakai, K. and Tadokoro, R.: Cell communications during skin pigmentation. Symposium “Yoshiko Takahashi Presents Developmental Biology: Cells-to-organs and biodiversity” 第 37 回日

本分子生物学会年会, 横浜市, 2014.11.26

4. Takahashi, Y.: Inter-epithelial signaling protects tissues from EMT. 18th International Conference of the Society for Differentiation in conjunction with the British Society for Developmental Biology, London, UK, 2014.11.03
5. Takahashi, Y.: Tissue interactions that control cell migration and EMT during organogenesis. Meeting Spanish Society for Developmental Biology, Madrid, Spain, 2014.10.13 (Plenary lecture)
6. 高橋淑子: 特別講演「動物発生にみる細胞のふるまい」第 87 回日本生化学会大会, 京都市, 2014.10.17
7. Takahashi, Y.: In ovo live imaging analyses of endothelial cells during vascular remodeling in chicken embryos. 8th International Kloster Seon Meeting “Angiogenesis”: Molecular Mechanisms and Functional Interactions, Seon, Germany, 2014.9.21
8. Takahashi, Y., Takase, Y., Takahashi, T. and Saito, D.: Determination of the growing path of blood vessels in the spinal cord during embryogenesis. The 18th International Vascular Biology Meeting 2014, 京都市, 2014.4.15
9. Takahashi, Y., Yoshino, T., Murai, H., Takase, Y., Saito, D. and Tadokoro, R.: Cell-and tissue communications during organogenesis. Symposium “Building the vertebrate body: from chromatin to organs” 第 36 回日本分子生物学会, 神戸市, 2013.12.03
10. Takahashi, Y.: Morphogenesis of neural crest cells: from single cell behavior to tissue shape “Swiss-kyoto Symposium 2013” ETH Zurich and the University of Zurich, Zurich, Switzerland, 2013.11.21
11. Takahashi, Y., Takase, Y., Takahashi, T. and Saito, D.: Neuro-vascular wiring during development. 第 86 回日本生化学会大会 インターナショナルセッションシンポジウム, 横浜市, 2013.9.12
12. Takahashi, Y.: Morphogenesis of neural crest cells. The 17th International Congress of Developmental Biology, Cancun, Mexico, 2013.6.19
13. Takahashi, Y.: Neuro-vascular interactions during development 25 (NNAC), 大阪市, 2013.5.25
14. Takahashi, Y.: Neuro-vascular interactions during neural crest morphogenesis. Neuro-Vascular Wiring Symposium 2012, Nara, 2012.11.12
15. Takahashi, Y.: Migration of neural crest cells is controlled by dorsal aorta. International Society of Differentiation Conference, “Stem Cells, Development and Regulation”, Amsterdam, Netherlands,

- 2012.11.06
16. Takahashi, Y., Takahashi, T., Murai, H., Takase, Y. and Saito, D.: Neuro-vascular interactions instruct morphogenesis during development. Neuroscience2012 The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society 第35回日本神経科学大会,名古屋市, 2012.9.21
 17. Takahashi, Y.: "Dynamic cell rearrangements during vascular development" Gordon Research Conference on Notch signaling in development, regeneration and disease, Lewiston, ME, U.S.A. 2012.8.13
 18. 高橋淑子:「生体内におけるメラニン輸送の可視化と制御機構」第36回日本小児皮膚科学会, 前橋市, 2012.7.14 (特別講演)
 19. Takahashi, Y., Murai, H., Zakai, K.-I. and Tadokoro, R.: "Live imaging of melanosome transfer in the developing skin" IPCC 2011 (International Pigment Cell Conference) - Bordeaux, France, 2011.9.21
 20. Takahashi, Y.: The dorsal aorta acts as a morphogenetic center for neuro-vascular interaction. The 7th Aso International Meeting 2011, Kumamoto, 2011.7.31
 21. 高橋淑子, 熱田勇士, 下北英輔:「動物の形作りと細胞達のつばやき~管上皮構築をモデルとして~」第54回日本腎臓学会学術総会, 横浜市, 2012.6.17 (大会会頭指名講演)
 22. Takahashi, Y.: Secondary neurulation: Another type of neurulation by mesenchymal-to-epithelial transition 16th International Conference of the International Society of Differentiation "From Stem Cells to Organisms" Nara, 2010.11.15
 23. Takahashi, Y.: Neuro-vascular interactions: Dorsal aorta signals on morphogenesis of neural crest lineages. Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting Jointly with the Japanese Society of Developmental Biologists, Albuquerque, NM, USA, 2010.8.07. (Plenary Lecture)
 24. Takahashi, Y.: Switching of BMP signaling regulates migration and lineage segregation of neural crest cells. 2nd Joint Meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology, Paris, France, 2010.5.27

〔図書〕(計13件)

1. 阿形清和, 高橋淑子(監訳)「ギルバート発生生物学」メディカル・サイエンス・インターナショナル, 2015
2. 吉野剛史, *高橋淑子:「側板中胚葉の器官形成と上皮-間充織転換」細胞工学(秀潤社) 33(6): 633-638, 2014
3. *高橋淑子, 齋藤大介:「自律神経の発生における血管の関わり」血管医学(メディカルレビュー社) 14(3): 9-13, 2013
4. 田所竜介, 村井英隆, 酒井謙一郎, *高橋

淑子:「ライブイメージング法を用いた表皮内メラノサイトの可視化」日本小児皮膚科学会雑誌((株)日本小児医事出版社) 32(2): 95-99, 2013

5. 齋藤大介, *高橋淑子:「神経-血管相互作用から読み解く自立神経系の成立機構」臓器円環による生体恒常性のダイナミクス 実験医学増刊(羊土社) 31(5): 759-764, 2013
6. *高橋淑子:「トランスポゼースを用いた遺伝子発現」目的別で選べる遺伝子導入プロトコール 実験医学別冊(羊土社): 110-111, 2012
7. *高橋淑子:「動物発生を支える細胞の振る舞い」日仏生物学会誌, 巻頭(日仏生物学会) 51: 1-6, 2011
8. *Takahashi, Y.: (Invited) Rekindling Japan's Spirit. *Science, Editorial*, 332(6035): 1241 2011 (DOI: 10.1126/science.1209050)
9. 高瀬悠太, 安江泰治, *高橋淑子:「血管ワイヤリングにおける組織間相互作用」細胞工学(秀潤社) 29(11): 1087-1092, 2010

〔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

<http://develop.zool.kyoto-u.ac.jp/neurovascular/index.html>

6.研究組織

(1)研究代表者

高橋 淑子 (TAKAHASHI, Yoshiko)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 10183857

(2)研究分担者

澤本 和延(SAWAMOTO, Kazunobu)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 90282350

(平成22年度、平成26年度の2年間)