

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590175

研究課題名（和文）分子遺伝学的リンパ管研究のための小型モデル動物の確立

研究課題名（英文）Fish as a new model animal for the molecular genetic study on lymphangiogenesis

研究代表者

磯貝純夫（ISOGAI SUMIO）

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60212966

研究成果の概要（和文）：本研究の目的はゼブラフィッシュをリンパ管の分子遺伝学的研究のための優れた実験モデル動物として確立することにある。第一歩として、胚から成魚に至るリンパ管系の発生解剖アトラスを編纂した。

リンパ管系に欠損を持つ幾つかの変異体のトランスジェニックフィッシュ系統を確立し、リンパ管系に欠損を生ずる形成過程を形態学的に明らかにした。このデータを基に共同研究者の米国国立衛生研究所(NIH)分子遺伝学部門のDr. Weinstein研究室で、ケモカインのシグナルがリンパ管系の形成過程で主要な役割を果たすことを明らかにした(投稿中)。

研究成果の概要（英文）：Since 2004, we have worked to make the zebrafish a new genetic model to unravel the function of candidate gene involved in lymphangiogenesis. As the first step, we have compiled the developing anatomical atlas of the lymphatic vascular system from the embryo through the adult. We established EGFP transgenic lines whose have lethal defects on the formation of lymphatic vascular system, and revealed the cause of defects morphologically using 2-photon laser microscope. Based on the observations, Weinstein's lab of NIH showed that chemokine signaling provides a crucial guidance cue directing early lymphatic vascular formation (submitted).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：発生学・形態形成学，発生生物学

1. 研究開始当初の背景

リンパ管内皮を特異的に標識するマーカーの出現にともなってリンパ管新生は生理・病理の両面から注目を浴びることとなった。その必要性にもかかわらず、急速に発展した分子血管新生研究に較べ、リンパ管は未だに多くがベールに覆われている。その理由として、

リンパ管新生に関わる遺伝子の機能を見いだす上で必要な“遺伝学的に扱いやすい小実験動物モデル”の不在が挙げられた。我々のグループはゼブラフィッシュに他の脊椎動物と形態学的あるいは機能的さらに分子的特性を共有する“よく発達したリンパ管系”の存在を認め、ヒトの胸管に相当するリンパ

管が静脈内皮細胞由来であること、しかし、これまで考えられていたのとは異なった起源と過程を経て形成されることを明らかにした。リンパ系の起源と発生の理解を妨げてきたのは *in vivo* でリンパ内皮細胞を観察することの困難さにあったが、我々はその発生研究とイメージングにゼブラフィッシュが極めて有用なモデル動物となりうることを示した。

2. 研究の目的

本研究の目的はゼブラフィッシュをリンパ管の分子遺伝学的研究のための優れた実験モデル動物として確立することにある。我々が血管研究で行ったのと同様に、その第一歩として胚から成魚に至るリンパ管系について詳細な発生解剖アトラスを作成する。この存在によってリンパ管系に奇形を生じた劣勢突然変異体の large-scale forward-genetic screening とその原因遺伝子の追跡が可能となる。同時に、すでに確立したリンパ管内皮細胞あるいはその前駆細胞が EGFP を発現するトランスジェニックフィッシュについて、二光子顕微鏡を使用して機能するリンパ管系の発生の機序を解明する。

3. 研究の方法

I-a: ゼブラフィッシュの胚から成魚に至るリンパ管系の発生解剖アトラスの作成

リンパ管内皮細胞あるいはその前駆細胞が EGFP を発現する *fli-1* トランスジェニックフィッシュと岩手医科大学共同研究部門に設置された二光子顕微鏡システム Zeiss Axioskop 2 plus+LSM510META+非線形光学系 NLO レーザー (Maitai) を使用して、リンパ内皮細胞の分化、リンパ管を形成して静脈角に開口し機能を開始するまでの生体イメージングを行う。解析用コンピューターと三次元解析ソフトウェア (Meta-Morpho) によりデータ解析を行い、リンパ内皮の起源と胸管発生の機序を解明する。生体イメージングが困難となる若魚・成魚については色素注入法により発生解剖アトラスに必要な画像を作成した。

I-b: リンパ管系を欠損する EGFP トランスジェニックフィッシュ系統の確立と原因遺伝子の追跡

岩手医科大学に設置した飼育システムを使用してリンパ管系に欠損を生じた劣勢突然変異体と EGFP トランスジェニックフィッシュを交配し、リンパ管系変異の表現型を解析する。原因遺伝子の追跡が可能と思われる変異体の系統を選別し確立する。

II: リンパ内皮細胞への分化をコントロールする関連分子と分子機構の追跡

我々のデータはリンパ管内皮が胸管基部での静脈からリンパ嚢として出芽する直接的な

分化と遠位部での前駆細胞を経る分化様式の存在を示した。各分化過程をコントロールする関連分子と分子機構の追跡について、本研究とは別に (研究経費では独立して)、米国国立衛生研究所 (NIH) 分子遺伝学部門の Dr. Weinstein との共同研究を行っている。共同研究から得られた新知見を本研究へとフィードバックし有機的に関連付けて研究を進める。

4. 研究成果

I-a: ゼブラフィッシュの胚から成魚に至るリンパ管系の発生解剖アトラスの作成

受精後 2日-3週: リンパ管内皮細胞あるいはその前駆細胞が EGFP を発現する *fli-1* トランスジェニックフィッシュと二光子顕微鏡システムを使用して、リンパ内皮細胞の分化、リンパ嚢からリンパ管の形成、胸管が静脈角に開口し機能を開始するまでの生体イメージングを行い、解析用コンピューターと三次元解析ソフトウェア (Meta-Morpho) によりデータ解析した。

受精後 3-5 週: 皮下の外側皮静脈に沿って嚢胞状のリンパ内皮が並び、集合リンパ管系である外側リンパ本幹を形成、4 週で静脈角に開口し機能を開始する。 *fli-1* トランスジェニックフィッシュと二光子顕微鏡システムを使用して生体イメージングを行った。体幹の深部に位置する胸管遠位部の生体イメージングは魚体の成長 (肥厚) に伴い困難となるが、胸管が静脈角に開口し機能を開始する 3 週からリンパ管系への色素注入法の適用が可能となる。 EGFP *fli-1* トランスジェニックフィッシュのリンパ管内に蛍光 (赤色) ビーズを注入し共焦点顕微鏡システムを使用して血管系とリンパ管系の同時生体イメージングを行った。解析用コンピューターと三次元解析ソフトウェア (Meta-Morpho) によりデータ解析を行い、発生解剖アトラスに必要な画像を作成した。

受精後 5 週-成魚: 幼魚から成魚に *fli-1* トランスジェニックフィッシュと二光子顕微鏡システムによる生体イメージング法は適用できない。リンパ管内皮が異物を摂取する特性を利用して腹腔内に色素を注入し、幼魚から成魚の全リンパ管系を視覚化する方法を進展させ、同法により作成した標本に必要な解剖を加え、グリセリンで透過して、ゼブラフィッシュ成魚の全リンパ管系について発生解剖アトラスに必要な画像を作成した。

以上、ゼブラフィッシュの胚から成魚に至るリンパ管系の発生解剖アトラスの作成に必要なデータを取得し発表した。

I-b: リンパ管系を欠損する EGFP トランスジェニックフィッシュ系統の確立と原因遺伝子の追跡

II: リンパ内皮細胞への分化をコントロールする関連分子と分子機構の追跡

岩手医科大学に設置した飼育システムを使用してリンパ管系に欠損を持つ幾つかの劣勢突然変異体とリンパ管内皮細胞あるいはその前駆細胞がEGFPを発現するfli-1EGFPトランスジェニックフィッシュを交配し、変異体のトランスジェニックフィッシュ系統を選別し確立した。二光子顕微鏡システムを使用して、リンパ管内皮細胞の分化、リンパ嚢からリンパ管の形成、胸管が静脈角に開口し機能を開始するまでの生体イメージングを行い、解析用コンピューターによりデータ解析し、リンパ管系に欠損を生ずる形成過程を形態学的に明らかにした。このデータを基に共同研究者の米国国立衛生研究所(NIH)分子遺伝学部門のDr. Weinstein研究室で、ケモカインのシグナルがリンパ管系の形成過程で極めて重要な役割を果たすことを明らかにした(Cha et. al. 投稿中)。

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3件)

1) 磯貝純夫、下田浩、出口友則、人見次郎、Brant M. Weinstein、魚類で辿るリンパ系の起源と発生、*リンパ学* in press, 2011

2) Butler MG, Isogai S, Weinstein BM, Lymphatic development. Birth Defects research (Part C) 87-3, 222-231, 2009

3) Isogai S., Hitomi J., Yaniv K., Weinstein B.M., Zebrafish as a new animal model to study lymphangiogenesis; *Anatomical Science International* 84: 102-111, 2009

[学会発表] (計12件)

1) Isogai S., Shimoda H., Deguchi T., Hitomi J., Weinstein B.M., Seeking the origin of lymph vascular system using fishes, , *International Symposium on Morphological Sciences*, Taormina-Messina, Italy, Sept. 18-22, 2010 (招待講演)

2) Isogai S., Deguchi T., Yaniv K., Hitomi J. Weinstein BM, Fish as an animal model to study lymphangiogenesis. August 31-September 2, 2009, Phoenix Island, Jeju, Korea, The 4th Asia- Oceania Zebrafish meeting (招待講演)

3) Isogai S., Deguchi T., Yaniv K., Hitomi J. Weinstein BM, Zebraish and Medaka as animal models to study lymphangiogenesis 21-25 September 2009, Sydney Australia,

4) 22nd International Congress of Lymphology Deguchi T., Kawasaki T., Isogai S., Hitomi J., Yuba S., The lymphatic development is visible in a pFLT4-EGFP transgenic medaka. 43rd Annual meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists jointly sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network, June 20-23, 2010

5) 磯貝純夫、オーストラリア肺魚に辿るリンパ管系の起源、第31回肉眼解剖学懇話会(盛岡)3月27日、2010(招待講演)

6) 第34回日本リンパ学会総会シンポジウム「魚類で辿るリンパ系の起源」磯貝純夫、2010年6月25-26日、東京(安田講堂)(招待講演)

7) 第33回日本リンパ学会総会シンポジウム「リンパ管発生研究のための小型モデル動物、ゼブラフィッシュとメダカ」磯貝純夫、Yaniv K.、人見次郎、Weinstein BM 2009年7月17-18日(招待講演)

8) 第1回松本コンフェレンス小型魚類によるリンパ管の発生研究 磯貝純夫 2009年7月21-22日(招待講演)

9) 磯貝純夫、体幹部リンパ管系の比較発生-シンポジウム「リンパ管へのアプローチ:その新展開」:第113回日本解剖学会総会・全国学術集会、大分、3月2008(招待講演)

10) Isogai S., Kimura E., Weinstein B.M., Yaniv K., Hitomi J., What guides blood and lymph vessels to the gross anatomical structure in Symposium III: 41th Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, Tokushima, Japan, May 2008(招待講演)

11) 体幹部リンパ管系の比較発生:磯貝純夫, 第113回日本解剖学会総会 in 大分 2008 (招待講演)

12) 神経系と血管系の解剖学的構造を決める共通メカニズム:磯貝純夫、第29回肉眼解剖学懇話会 大分 2008(招待講演)

[図書] (計2件)

1) Sumio Isogai, Misato Fujita, *Anatomical Atlas of Blood Vascular System of Medaka in Medaka Book: A Model for Organogenesis, Human Disease and Evolution*, Springer in Press 2011

2) Makoto Kamei, Sumio Isogai, Weijun Pan, Brant M. Weinstein, Imaging Blood vessels in The Zebrafish: Makoto Kamei, in The Zebrafish 3rd ed. Cellular and Developmental Biology, Elsevier Academic Press , 2010, 100, 27-54

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯貝純夫 (ISOGAI SUMIO)
岩手医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60212966

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：