

令和 6 年 9 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03259

研究課題名(和文) 血流メカノ刺激によって時空間的に連鎖・連動する器官形成のしくみ

研究課題名(英文) Spatiotemporal Chain of Organ Formation Linked by Stimulation of Blood Flow Mechanisms

研究代表者

高橋 淑子 (Takahashi, Yoshiko)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：10183857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：体内に張り巡らされる血管網は、酸素や栄養などを運ぶ運搬流路であり、一定のルールに従って形成される。本研究では血管ネットワーク形成について、特に血管リモデリングと血流との相関に焦点をあてて研究を進めた。ニワトリ初期胚では、背側大動脈の血流の一部が体節20番目レベルから胚体外に向かい、その部分で卵黄大動脈が作られる。解析の結果、卵黄大動脈の形成位置が心拍血流開始次期によって規定されることが見出された。血流を局所的に停止させると卵黄大動脈の形成は起こらず、また血流刺激による細胞内シグナリングにはRho活性制御が含まれることなどがみえてきた。本研究による成果はがん生物学にも貢献すると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管バイオロジーの分野において、血管リモデリング機構の理解は非常に遅れている。その理由として、血流刺激を必要としている血管リモデリングをin vitro系で再構築するのが困難であることなどが挙げられる。本研究では、2次元平面上で血管形成が進むニワトリ初期胚の利点をいかして、血管リモデリングにおける血流刺激の影響を高解像度で解析できた点が意義深い。血流のタイミングが動脈の位置パターンを規定するなど、他の解析系では見出せなかった発見を打ち出すことができた。血管系疾患やガン生物学とその治療法開発にむけて、新たな道の開拓につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Vascular system plays a pivotal role in conveying oxygen and nutrients, and its formation and patterning during early developing follow some rules. In this study, we asked how the blood flow regulates the vascular patterning. In early chicken embryos, geometric patterns of vitelline arteries (VAs) that laterally extend from the dorsal aorta at the level of 20th somites facilitate analyses at high resolution. We found that the onset of heart beat-driven blood flow is intimately correlated with the VA patterning. An occlusion of blood flow markedly affected the VA patterning, suggesting that the mechanical stimulation by blood flow plays an important role. We further found that Rho activity needs to be properly controlled for the blood flow-regulated VA patterning. The findings obtained in this study are expected to help understanding how blood flow regulates tumor and cancer cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：初期胚 血管モデリング 血流 メカノバイオロジー 卵黄動脈

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体の隅々にまで張り巡らされる血管網は、酸素や栄養などを運ぶ重要な運搬流路であるとともに、ガン細胞転移とも密接な関係があることから、血管ネットワーク形成のしくみ解明は生命科学における重要課題のひとつと位置づけられる。これらの課題解決にあたり、個体発生過程における初期の血管ネットワーク形成のしくみを理解することは極めて有効である。初期では、原始的な血管網から徐々に規則正しいパターンをもった血管ネットワークが作られることは古くから知られているが、それを制御するしくみは依然未解明である。一方で、血管形成、特に血管リモデリングに血流が大きな影響を与えるという知見が、主に *in vitro* 培養系の解析から提唱されている。そこで本研究では、初期胚における血流と血管リモデリング、そして血管パターンニングとの関係に焦点をあて、その細胞・分子レベルでの解析を進めた。

2. 研究の目的

本研究では脊椎動物の初期胚における血管ネットワーク形成機構について、特に心拍開始によって変化する血流が、血管リモデリングにどのような影響を与えるかに焦点をあてて理解することを目的とした。この目的のために、多くの利点をもつニワトリ胚を用いた。ニワトリ初期胚は2次元平面上で進行するため、血管形成や血管リモデリングの様子を高解像度で解析できる。特に左右一対に明瞭なパターンをもって形成される卵黄動脈のリモデリングに注目した。ここでは血管の蛍光標識による可視化や、局所的な遺伝子操作が可能であるため、マウスやゼブラフィッシュなどでは困難であった解析が期待できる。

3. 研究の方法

血管の可視化には、蛍光インクの血管内注入法を用いた(図1)。血流操作は、高粘度グリセロールの血管内注入法を用いた。RNAseq 解析から得られた候補分子の発現パターンを、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて解析した。遺伝子機能ノックダウンには siRNA 法を用いた。血管リモデリングのライブイメージング解析は、Nikon マクロコンフォーカル A1 顕微鏡を使用した。

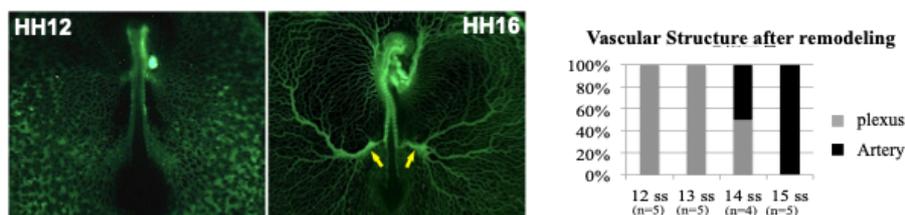


図1

ニワトリ初期胚の胚体外領域における血管網形成の様子。蛍光インクを血管内に注入して可視化。12体節期(HH12)では目立ったパターンニングは認められないが、15体節期(HH16)では20番体節位置から左右に明瞭な卵黄動脈が形成されているのがわかる。

4. 研究成果

(1) ニワトリ初期胚における心臓からの血流開始時期と血管リモデリングとの相関について、主に卵黄動脈とよばれる血管に注目した。卵黄動脈は、すでに形成されている背側大動脈から胚体外に伸びる左右一対の明瞭なパターンをもつ血管であり、20番目体節レベルから胚体外に

伸展する。

Hamburger Hamilton stage 12 (HH12; 11-12 体節ステージ)で緑蛍光インクを心臓から注入したところ、注入時の圧力によってある程度血管網に拡散する様子が認められたが、明瞭な卵黄動脈の形成は確認できず、不明瞭な血管網が検出された。少し発生が進んだ HH16 (15 体節ステージ)において同様のインク注入実験を行ったところ、心臓拍動によって生じる血流にのって、胚体内外の血管が明瞭に観察できた。20 番体節から左右にのびる卵黄動脈も明瞭なパターン化を遂げていた。このことから、心臓の拍動による血流の開始時期と卵黄動脈のリモデリングには密接な連関があることがわかった。

そこで次に、心臓拍動による胚内血流がどの時期に開始するかを知るために、先ほどと同様に蛍光色素を心臓に注入した。この解析では、圧力を最小にして限定的な注入をおこなった。結果、胚内血流は 15 体節期から一気に盛んになることがわかった。心臓の拍動自身は 12 体節期からすでに認められるが、それが必ずしも胚内血流を作り出しているわけではないことがわかった。

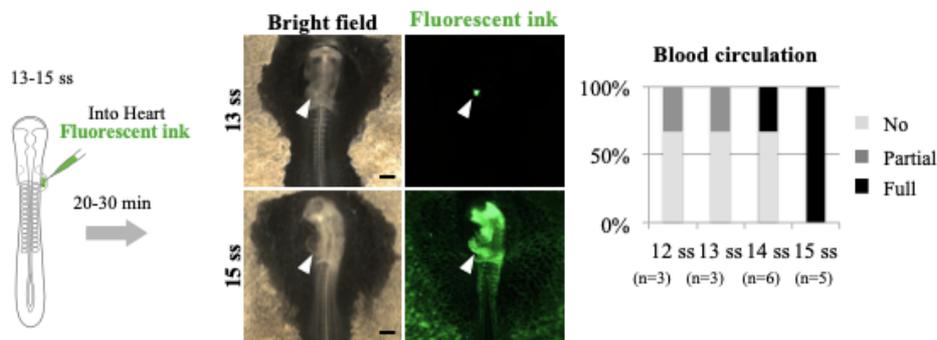


図2 ニワトリ初期胚における心拍による血流開始時期の探索。原始心臓はかなり早くに形成されて拍動しているが、それが実際に胚内外に血流を送り出す時期は異なる。15 体節期になって血流は胚全体に行き渡るようになる。

(2) 血流と卵黄動脈リモデリングとの相関をさらに詳しく理解するために、卵黄動脈に流れ込む血流を停止する操作を行った。そのために、胚の右側の背側大動脈に高粘度グリセロールを微注入して血流を停止させた(図3; データは動画だがここでは静止画を示す)。この方法を用いることによって、数時間にわたり右側血管網の血流を特異的に停めることができた。血流が停止した右側胚部において、卵黄動脈のリモデリングはほぼ完全に抑制され、メッシュ状の血管網のみが形成されていた(図4)。

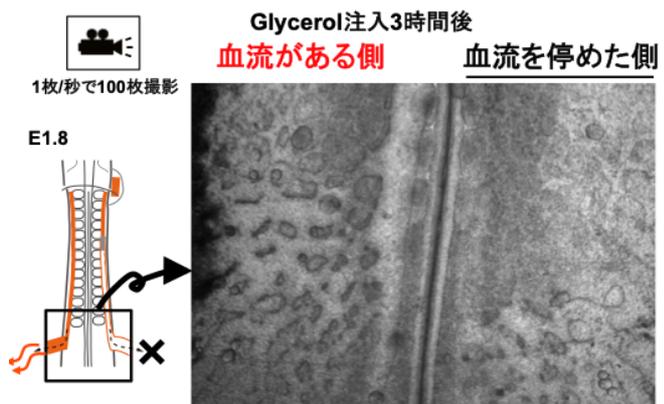


図3 ニワトリ初期胚の右側背側大動脈内にグリセロールを微注入したところ、右側の胚体部における血流が停止した。動画の一コマの静止画。

このことから、背側大動脈から流れ込む血流が、胚体外血管網のリモデリングを主導していることが強く示唆された。

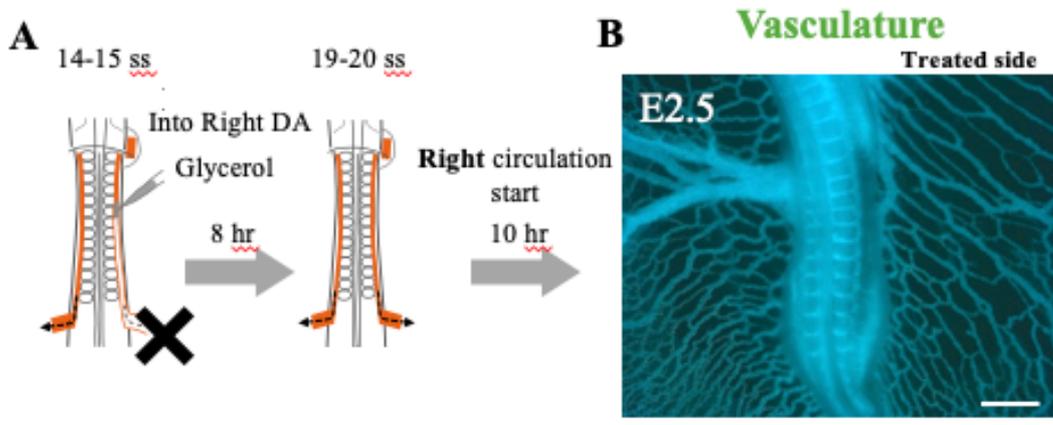


図4 図3と同様にして胚右側の背側大動脈の血流を停止させ、その胚が E2.5 まで発生したときの血管パターンニングの様子。血流を停止された右側では、卵黄動脈のリモデリングが起こっていないことがわかる。

(3) 続いて血流刺激の分子実体に迫るため、卵黄動脈のリモデリング過程で発現が変化する遺伝子群をバルク RNASeq 法を用いて探索した。その中の 1 つに TGF ファミリーリガンドの受容体である ALK1 が認められたため、ALK1 遺伝子機能のノックダウンを siRNA 法によって行った。ALK1-siRNA の特異性を培養細胞を用いて確認した上で、15 体節期のニワトリ胚右側背側大動脈にガラスキャピラリーを用いて注入した。20 時間後に血管リモデリングの様子を調べたところ、右側の卵黄動脈特異的にリモデリングが抑制されており、メッシュ状の血管網が認められるのみであった。これは図4でみられた現象と酷似していた。これらの結果から、血流刺激による卵黄動脈のリモデリングには、血管内皮細胞の細胞膜上ではたらく ALK1 が重要な役割を担っていることが示唆された。

(4) 血管内皮細胞内において、ALK1 の下流ではたらく細胞内シグナル経路を知るために、さまざまな薬剤阻害剤を右側背側大動脈に注入し、卵黄動脈のリモデリングに与える影響を解析した。結果、低分子量 G タンパク質である Rho の活性制御が重要であることがみえてきた。

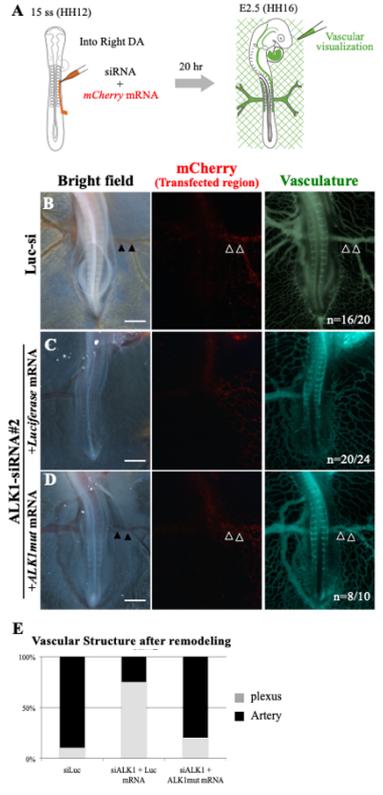


図5 血流刺激の感知には ALK1 が関与する可能性が高い。ALK1 のノックダウンにより、卵黄動脈のリモデリングが阻害された。

これらの解析結果より、初期胚において心拍開始後に出現する血流が胚体外の卵黄動脈のリモデリングを制御すること、そして血流開始のタイミングが 20 番体節位置での血管形成を規定している可能性がみえてきた。血流による血管リモデリングと位置情報付与機構の一端が明らかになったことは意義深いと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yagasaki Rei, Shikaya Yuuki, Kawachi Teruaki, Inaba Masafumi, Takase Yuta, Takahashi Yoshiko	4. 巻 64
2. 論文標題 Newly raised anti c Kit antibody visualizes morphology of interstitial cells of Cajal in the developing gut of chicken embryos	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 446 ~ 454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12808	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Daisuke, Tadokoro Ryosuke, Nagasaka Arata, Yoshino Daisuke, Teramoto Takayuki, Mizumoto Kanta, Funamoto Kenichi, Kidokoro Hinako, Miyata Takaki, Tamura Koji, Takahashi Yoshiko	4. 巻 25
2. 論文標題 Stiffness of primordial germ cells is required for their extravasation in avian embryos	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105629 ~ 105629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105629	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shikaya Yuuki, Takase Yuta, Tadokoro Ryosuke, Nakamura Ryo, Inaba Masafumi, Takahashi Yoshiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Distribution Map of Peristaltic Waves in the Chicken Embryonic Gut Reveals Importance of Enteric Nervous System and Inter-Region Cross Talks Along the Gut Axis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 827079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.827079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawachi Teruaki, Tadokoro Ryosuke, Takahashi Yoshiko	4. 巻 64
2. 論文標題 Cell Lineage, Self-Renewal, and Epithelial-to-Mesenchymal Transition during Secondary Neurulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Korean Neurosurgical Society	6. 最初と最後の頁 367 ~ 373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3340/jkns.2021.0054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawachi Teruaki, Shimokita Eisuke, Kudo Ryo, Tadokoro Ryosuke, Takahashi Yoshiko	4. 巻 461
2. 論文標題 Neural-fated self-renewing cells regulated by Sox2 during secondary neurulation in chicken tail bud	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 160 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2020.02.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shikaya Yuuki, Inaba Masafumi, Tadokoro Ryosuke, Utsunomiya Shota, Takahashi Yoshiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Optogenetic control of gut movements reveals peristaltic wave-mediated induction of cloacal contractions and reactivation of impaired gut motility	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	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) 10.3389/fphys.2023.1175951	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yagasaki Rei, Nakamura Ryo, Shikaya Yuuki, Tadokoro Ryosuke, Hao Ruolin, Wang Zhe, Eiraku Mototsugu, Inaba Masafumi, Takahashi Yoshiko	4. 巻 -
2. 論文標題 The gut contractile organoid: a novel model for studying the gut motility regulated by coordinating signals between interstitial cells of Cajal and smooth muscles	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	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) 10.1101/2024.03.12.584544	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 13件 / うち国際学会 16件)

1. 発表者名 矢ヶ崎 怜
2. 発表標題 腸収縮性オルガノイドを用いた蠕動運動における同調機構の研究
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 Cell communications and inter-region crosstalks during peristaltic movements in the embryonic gut.
3. 学会等名 New Frontiers in Developmental Biology: Celebrating the Diversity of Life (SFBD&JSDB) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rei Yagasaki
2. 発表標題 Gut contractile organoids: a novel model system to study the cellular synchronization in gut peristalsis.(Poster)
3. 学会等名 New Frontiers in Developmental Biology: Celebrating the Diversity of Life (SFBD&JSDB) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuuki Shikaya
2. 発表標題 Optogenetic manipulation reveals inter-region crosstalks mediated by peristaltic waves in the chicken embryonic gut. (Poster)
3. 学会等名 19th International Congress of Developmental Biology, International Society of Developmental Biologists (ISDB) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋淑子
2. 発表標題 腸蠕動運動における振動波の確立機構
3. 学会等名 第33回日本末梢神経学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rei Yagasaki
2. 発表標題 Reciprocal signals between the pacemaker and smooth muscle cells in the gut contractile organoid.
3. 学会等名 55th JSDB Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 Enteric nervous system is required for suppressing unnecessary waves in embryonic gut peristalsis
3. 学会等名 “Mini-symposium on neural crest and neural crest-derived pathologies” Lund University, Sweden (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋淑子
2. 発表標題 腸の蠕動運動に潜む時計機能の成立メカニズム
3. 学会等名 新学術領域研究「脳構築における発生時計と場の連携」第6回ハイブリット班会議 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 腸の蠕動過程にお動運動の成り立ち Establishment of gut peristalsis during development
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 Stemness and lineage dynamics of cells participating in secondary neurulation.
3. 学会等名 Neuro surgery Update 2021, Seoul, Korea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 Contribution of mono-fated neural progenitors to secondary neurulation during axis elongation
3. 学会等名 Neuroectodermal progenitors in development, evolution and regeneration, 2020, Lisbon, Portugal (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 Cellular basis for gut peristalsis
3. 学会等名 Taiwanese Society of Developmental Biology Retreat, 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 Dynamics of the pacemaker cells, interstitial cells of Cajal, in gut peristalsis
3. 学会等名 The 72nd Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi, Daisuke Saito, Yuta Takase, Ryosuke Tadokoro, Kanta Mizumoto
2. 発表標題 Extravasation of primordial germ cells in avian embryos is enabled by dynamic plasticity revealed by high-resolution confocal microscopy.
3. 学会等名 53rd JSDB/APDBN Meeting, Kumamoto (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 Gut peristaltic movements studied using optogenetics and contractile organoids
3. 学会等名 the 11th Avian Model Systems Meeting, University of Portsmouth (UK) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 Gut peristaltic movements: studies with optogenetics and contractile organoids.
3. 学会等名 The XXIII International Congress of Genetics, Genetics and Genomics, Melbourne Australia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masafumi Inaba, Yuuki Shikaya, Shota Utsunomiya, Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 Optogenetic control of gut movements reveals peristaltic wave-mediated induction of cloacal contractions
3. 学会等名 the 56th annual meeting of JSDB, Sendai (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 稲葉真史、鹿谷有由希、高橋淑子
2. 発表標題 腸ぜん動運動を支えるCa ²⁺ 振動波が生み出されるしくみ
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 安井真奈美、ローレンス・マルソー編	4. 発行年 2023年
2. 出版社 臨川書店	5. 総ページ数 336
3. 書名 想像する身体 上巻	

1. 著者名 京都大学大学院理学研究科MACS教育プログラム実行委員会（編）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 京都大学学術出版会	5. 総ページ数 318
3. 書名 京大式サイエンスの創り方	

1. 著者名 女性科学者に明るい未来をの会（編）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本評論社	5. 総ページ数 288
3. 書名 私の科学者ライフ -猿橋賞受賞者からのメッセージ	

1. 著者名 高橋淑子、高瀬悠太、田所竜介、齋藤大介、矢ヶ崎怜、稲葉真史、西島謙一、外	4. 発行年 2023年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 80
3. 書名 生物の科学 遺伝 2023年7月発行号 (Vol.77 No.4)	

1. 著者名 「紅萌」2020年38号	4. 発行年 2020年
2. 出版社 京都大学広報誌	5. 総ページ数 24
3. 書名 恩師を語る 日本の発生生物学を愛し、育てた名誉教授「岡田節人」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

動物発生学 高橋グループ -Developmental Biology- http://www2.zool.kyoto-u.ac.jp/develop/takahashi.html

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