

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06248

研究課題名（和文）血管生物学研究のためのマウス胚生体イメージング系の確立

研究課題名（英文）Establishment of mouse embryonic imaging system for vascular development

研究代表者

内田 穰（UCHIDA, Yutaka）

大阪大学・大学院生命機能研究科・助教

研究者番号：50833787

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：血管系は動脈、静脈、毛細血管といった階層性をもった美しい枝分かれ構造を示し、この形成メカニズム、すなわち血管リモデリングの本質を解明することは血管生物学研究にとって大きな課題である。血管リモデリングの本質は、血管内皮細胞の「動き」であると考えられ、血管内皮細胞が、どのようなタイミングで、どこに向かって、どのように動くのか、を明らかにすることが血管リモデリングの本質を理解する上で必要不可欠である。したがって、本研究計画では二光子励起顕微鏡を用いたマウス胚血管系のライブイメージング法の確立を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立を試みた二光子励起顕微鏡を用いたマウス胎児のin vivoイメージング系は、血管系の発生のみならず発生にかかわる多くの現象を可視化することが可能であり、発生過程においてその構造が大きく変化する現象における多くの議論にその答えを出すことが可能である。したがって、発生生物学の分野に果たす学術的意義は大きいと考えている。

研究成果の概要（英文）：The hierarchical and beautiful branching patterning of the vascular system forms through vascular remodeling. Elucidating the mechanism of vascular remodeling is essential for vascular biology research. Because the essence of vascular remodeling is the “movement” of vascular endothelial cells, to reveal when, where, and how vascular endothelial cells move is essential for understanding the mechanism of vascular remodeling. Therefore, in order to clarify the essence of vascular remodeling, this research project established the embryonic vasculature imaging system using two-photon excitation microscopy.

研究分野：発生生物学

キーワード：マウス胚 in vivo イメージング系 血管リモデリング

## 1. 研究開始当初の背景

血管系は動脈、静脈、毛細血管といった階層性を持った美しい枝分かれ構造を示し、その形成メカニズムの解明は血管生物学研究にとって大きな課題である。この枝分かれ構造は胎生期に原始血管叢から血管リモデリングと呼ばれる過程を経て形成される。皮膚の血管系においては、末梢神経の走行が鋳型となり、最終的に神経・動脈・静脈が並走する構造が形成される。血管リモデリングの本質は血管内皮細胞の「動き」であると考えられ、血管内皮細胞が、どのようなタイミングで、どこに向かって、どのように動くのか、を明らかにすることが血管リモデリングの本質を理解する上で必要不可欠である。特に血管系は内部に血液細胞を満たした閉鎖系を胎生期から恒常的に維持しており、血管リモデリングの過程においても内部の血液細胞を漏らさないように全体の構造を変化させる必要がある。したがって、血管リモデリングを理解する上で最も重要な点は「どのように動くのか？」の理解であり、血管リモデリング時に血管内皮細胞が内容物を漏らすことなく動きその形を変化させるメカニズムの解明である。発生学における形態的な経時変化の解析は各タイムポイントにおける標本を固定し、その形態を比較するタイムコース解析によって行うことが一般的である。しかし、血管リモデリングの解析を含め、固定標本を用いたタイムコース解析では、タイムコース間に起こる出来事の「過程」に関してその前後の写真（さらに異なる個体）を比較し推測する必要があり、その推測に依存してさまざまなモデルが提唱されることが現状である。くわえて、拍動による物理的な力が血管系に加わることが血管リモデリングに必要とされ、血管リモデリングは *in vivo* において胎児の心機能が保たれた状態でのみ解析が可能な現象といえる。つまり、血管リモデリングの本質は固定標本や培養系などの再構成系では解析することが困難であり、*in vivo* における同一標本による経時的な解析、すなわちライブイメージングによってのみ、その本質に迫ることが可能である。従来、血管形成研究のライブイメージングは発生が母体の外で進むなどの理由からゼブラフィッシュなど小型魚類の初期胚に適用されることが常であった。一方、マウス胚は小型魚類の初期胚とは異なり発生が母体の子宮内で進むことから、マウス胚のイメージングを行うためには胚を子宮から取り出し数日間にわたり健全に生かし続ける必要がある。したがって、マウス胚のイメージングは小型魚類の胚のイメージングに比べその難易度が格段に高いといえる。しかしながら、血管リモデリングをはじめマウス（ほ乳類）胚固有の現象を理解するためには、このような困難を克服する方法を見だし、マウス胚を対象とした *in vivo* ライブイメージング法を確立することが求められていた。

## 2. 研究の目的

本研究計画は、マウス胚における *in vivo* ライブイメージング法を確立し、血管系の発生過程における血管内皮細胞の動きを解明し、血管リモデリングの本質を定義することを目的とする。血管リモデリングの本質は血管内皮細胞の「動き」と考えられるが、従来のマウス胚における固定標本を用いたタイムコース解析では「動き」という動的な解析は困難であった。したがって、本研究計画では、生体における経時的解析に最適といえる二光子励起顕微鏡によるイメージング解析をマウス胚に適用し、マウス（ほ乳類）胚固有の現象である血管リモデリングの本質を定義する。

## 3. 研究の方法

二光子励起顕微鏡を用いたイメージング研究において、Imaging Window という特殊な器具を装着することにより腹腔内の臓器を長期にわたりイメージングする手技が確立されている。さらに、Huang et al. (2020)により Imaging Window がマウス胚のイメージングにおいても有効であることが報告されている（図 1）。したがって、本研究計画においてはこの文献を基にした

Imaging Window の試作・改良、くわえて Imaging Window を装着したマウスを固定する固定台を作製し、マウス胚における *in vivo* ライブイメージング系の確立を試みた。手術法の最適化などの Imaging Window を取り扱う手技やイメージング条件の検討は、妊娠マウスだけでなく非妊娠マウスの腹腔内臓器を胎児に見立てて行なった。さらに、蛍光を用いた顕微鏡観察に必須であるレポーターマウスに関して、新規レポーターマウスの作製を計画した。その予備検討として Cre リコンビナーゼとは由来の異なるリコンビナーゼである VCreERT2, SCreERT2, DreERT2 の発現ベクターとレポーターベクターをそれぞれ構築し培養細胞に発現させ、その特性の確認を行なった。

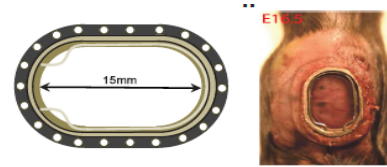


図 1) Imaging Window を用いたマウス胚のイメージング (Huang et al., Science 368, 181-186, 2020 より)

#### 4. 研究成果

Imaging Window とカバーガラス固定用のクリップを先行研究を基に作製し (図 2 : 左)、この Imaging Window を装着するための手術法の最適化を行なった。最適化を行う中でこれら器具を改良する必要性が生じ、Imaging Window に関しては装着しやすいように、カバーガラス固定用のクリップに関しては対物レンズと干渉しないように、それぞれ縁を削り出す改良を行なった (図 2 : 右)。合わせて、Imaging Window を装着したマウスを固定する固定台を作製し安定的にイメージングする方法を検討した (図 3)。この Imaging Window と固定台を用いて実験手技やイメージングの条件検討などを行い、おおむね確立することができたと考えている。しかし、実施期間中に実データを取得し解析するまで至らず、実データの取得と解析は今後の課題として残ることとなった。くわえて、現所属のマウス飼育に関わる規則では、撮影のために飼育室から顕微鏡室へ持ち出したマウスを飼育室へ再搬入することが許可されず、日を越えてのイメージングを実施することが不可能であるという課題に直面した。今後、4時間おきに3日間にわたって撮影するなどの長期間の撮影を行うことが必要と考えられ、顕微鏡室に持ち出したマウスを飼育室に再搬入することを可能にする環境を考えることも今後の課題となった。



図 2) 作製・改良した Imaging Window とカバーガラス固定用クリップ

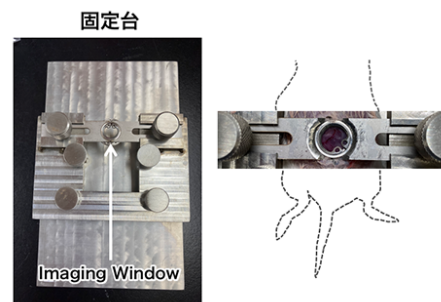


図 3) 作製したマウス固定台と Imaging Window を装着したマウスを固定した様子

さらに、新規レポーターマウスの作製を目的として、VCre/VloxP, SCre/SloxM1, Dre/rox システムを用いた実験系の検討を行なった。ビブリオ菌由来の VCre、シュワネラ菌由来の SCre、腸内細菌ファージ D6 由来の Dre は既存のバクテリオファージ由来の Cre/loxP を用いた組み換えシステムとは交差しないことが知られており、これら Cre とは由来の異なるリコンビナーゼを利用したレポーターマウスの構築を目指した。VCre, SCre はかずさ DNA 研究所より、Dre は Addgene に寄託されているプラスミドを取り寄せ実験に使用した。同様に Addgene に寄託されている CreERT2 プラスミドを用いて、この CreERT2 プラスミドの Cre 部分の配列を PCR で増幅した VCre, SCre, Dre の配列に置き換えることで VCreERT2, SCreERT2, DreERT2 を作製した (図 4)。くわえて、レポータープラスミドを PCR により作製し、そのレポーター遺伝子を安定発現する細胞株を作製した。その細胞株にこれら VCreERT2, SCreERT2, DreERT2 を発現させ、4OH-Tamoxifen 依存的にレポーター遺伝子の組み換えができるかどうかを確認した

(図5:上段)。その結果、おおむねどのリコンビナーゼに関しても 4OH-Tamoxifen 依存的なレポーター配列の組み換えによる蛍光タンパク質の発現の変化を引き起こせることが確認でき、ERT2 を付加しても問題なく動作すると判断した。次に、レポーター側のコンストラクトの作製を試みた。ストップ配列から CFP, Venus, tdTomato, iRFP690 を順につなぎ、それぞれ組み換え配列である VloxP, SloxM1, LoxP, rox で挟み込むコンストラクトを考えた (図5:下段)。すなわち、このレポーター配列を発現するマウスを作製することで、一回の Tamoxifen の投与により最大で4色の蛍光で異なる由来の細胞を標識することが可能になり、たとえば血管内皮細胞を動脈系の内皮細胞と静脈系の内皮細胞に染め分けることも可能になるのではないかと考えた。二光子励起顕微鏡で各蛍光タンパク質を観察するための条件検討を進めたところ、最も長波長側に位置する iRFP690 は、培養細胞における過剰発現系においても観察可能な蛍光輝度を得ることができず、二光子励起顕微鏡を用いた観察に用いるレポーターには適さないと判断した。したがって、まずは iRFP690 を除いた CFP, Venus, tdTomato の3色でレポーターマウスを作製することとし、その発現プラスミドの作製を進めた。人工遺伝子合成を利用しコンストラクトの作製を進めたが、繰り返し配列が多いことから人工遺伝子合成では対応できず、各部分の一つずつ PCR で作製することになった。結果として想定していたよりも時間がかかることとなり、期間内にレポーターマウスの作製に取り掛かることができなかつた。レポーターマウスの作製と VCreERT2, SCreERT2, DreERT2 の細胞特異的発現マウスの作製は今後の課題として残ることとなった。

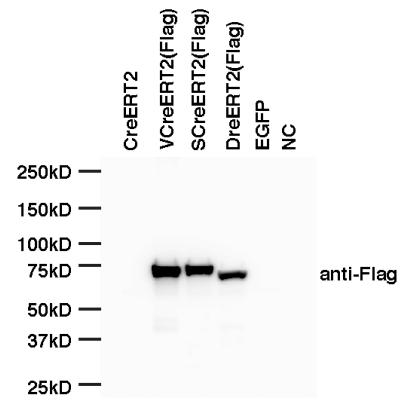


図4) ウェスタンブロットによる VCreERT2, SCreERT2, DreERT2 の発現確認

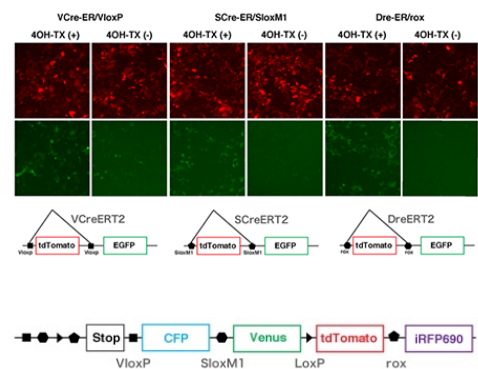


図5) VCreERT2, SCreERT2, DreERT2 とレポータープラスミド恒常的発現細胞株を用いた 4OH-Tamoxifen 依存的組換えと VCreERT2, SCreERT2, DreERT2 を用いたレポーターマウスの作製

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3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 内田穰	4. 巻 286
2. 論文標題 生体イメージングとシングルセルオミックスの統合解析	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 週刊医学のあゆみ 「生体イメージングの最前線」	6. 最初と最後の頁 467-473
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 無
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 -
1. 著者名 内田穰、石井優	4. 巻 6
2. 論文標題 <動く1細胞の「意思」を読み取る in vivo 網羅的動態・発現解析法の開発> に向けた取り組み	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 623-626
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 無
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 -
1. 著者名 Shimizu Kotaro, Kikuta Junichi, Ohta Yumi, Uchida Yutaka, Miyamoto Yu, Morimoto Akito, Yari Shinya, Sato Takashi, Kamakura Takefumi, Oshima Kazuo, Imai Ryusuke, Liu Yu-Chen, Okuzaki Daisuke, Hara Tetsuya, Motooka Daisuke, Emoto Noriaki, Inohara Hidenori, Ishii Masaru	4. 巻 14
2. 論文標題 Single-cell transcriptomics of human cholesteatoma identifies an activin A-producing osteoclastogenic fibroblast subset inducing bone destruction	5. 発行年 2023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） 10.1038/s41467-023-40094-3	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 -
1. 著者名 Taniguchi Seiji, Matsui Takahiro, Kimura Kenji, Funaki Soichiro, Miyamoto Yu, Uchida Yutaka, Sudo Takao, Kikuta Junichi, Hara Tetsuya, Motooka Daisuke, Liu Yu-Chen, Okuzaki Daisuke, Morii Eiichi, Emoto Noriaki, Shintani Yasushi, Ishii Masaru	4. 巻 14
2. 論文標題 In vivo induction of activin A-producing alveolar macrophages supports the progression of lung cell carcinoma	5. 発行年 2023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） 10.1038/s41467-022-35701-8	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 -

1. 著者名 Matsui Takahiro, Iwasa Akio, Mimura Masafumi, Taniguchi Seiji, Sudo Takao, Uchida Yutaka, Kikuta Junichi, Morizono Hidetomo, Horii Rie, Motoyama Yuichi, Morii Eiichi, Ohno Shinji, Kiyota Yasujiro, Ishii Masaru	4. 巻 113
2. 論文標題 Label free multiphoton excitation imaging as a promising diagnostic tool for breast cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2916 ~ 2925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15428	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 内田穰、石井優
2. 発表標題 時空間トランスクリプトーム解析を用いた好中球の細胞動態を制御する分子メカニズムの探索
3. 学会等名 第44回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内田穰、石井優
2. 発表標題 関節炎モデルマウスにおける好中球の遺伝子発現解析
3. 学会等名 第10回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内田穰・石井優
2. 発表標題 好中球の動態はケモカインの発現・自己刺激を介して制御される
3. 学会等名 第43回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2022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
---------	---------