

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 31日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770219

研究課題名（和文）トランスジェニックウズラ胚を用いた血管形成過程の定量的ライブイメージング解析

研究課題名（英文）Quantitative live imaging analysis of blood vessel formation in transgenic quail embryo

研究代表者

佐藤 有紀（SATO YUKI）

熊本大学・大学院先導機構・特任助教

研究者番号：90508186

研究成果の概要（和文）：発生初期の背側大動脈の血管内皮細胞が、一方向に向かって移動する現象に着目し、この細胞移動が背側大動脈の血管内皮細胞が元来もつ自律的な現象なのかどうかを検証し、背側大動脈の細胞移動には周辺組織との相互作用等が重要であるという傍証を得た。背側大動脈が移動する際、隣接している体節細胞がどのような挙動を示すのかをタイムラプス観察した結果、背側大動脈が移動する際に、体節細胞の表面からフィロポディア様の突起が出現することを見いだした。

研究成果の概要（英文）：We focused on the unidirectional migration event of dorsal aorta endothelial cells in early development. We found that such migratory behavior is not autonomous action of individual endothelial cells and got the collateral evidence suggesting existence of some interactions between the dorsal aortae and surrounding tissues. We observed that adjacent somite cells protrude filopodia-like processes during the dorsal aorta migration by time-lapse imaging.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：発生・分化、イメージング

1. 研究開始当初の背景

胚の各所に点在する血管内皮前駆細胞から、機能的な血管網が確立される過程は、未だ多くの謎に満ちている。初期血管網は、胚のかたち作りにあわせて絶えずモデリングを繰り返しながら、最終的な成体型の血管ネットワークパターンへと近づいていく。その過程を支える血管内皮細胞がどのような時空

間的な制御を受け、血管網の構築に寄与するのかを理解する為には、実際のからだの三次元構造を念頭に入れ、解析することが必要である。これまで血管形成過程のイメージングモデル動物として、顕微鏡下での発生が容易なゼブラフィッシュ胚が主に利用されてきたが、ヒトをはじめとする2心房2心室の心臓システムを持つ恒温動物の血管形成モデル生物は、皆無に等しかった。本研究は、血

管内皮細胞を特異的に蛍光レポータータンパク質で標識するトランスジェニックウズラ $Tie1:H2B::EYFP$ 胚 (カリフォルニア工科大学バイオイメージングセンター、Rusty Lansford 博士との共同研究) をモデル動物として用い、血管ネットワークが胚の内部でどのようにして形成されていくのかを生体イメージング解析し、そのメカニズムの解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究は、*in vivo* における血管パターンニングのしくみを理解する為、時間的・空間的な繋がりの中で細胞の動きがどう変化していくのかを詳細にし、その分子メカニズムに迫る。特に (1) 血管内皮細胞のダイナミックな動きは、どのような空間的制御を受けるのか? (2) 血管形成および再構成現象は、胚パターンニング過程においてどのような役割を果たすのか? この2つの大きな疑問を掲げ、羊膜類における血管形成研究の新しいモデル動物-トランスジェニックウズラ胚 $Tg(Tie1:H2B::YFP)$ -を用いた定量的ライブイメージング解析により、これを解明する。

3. 研究の方法

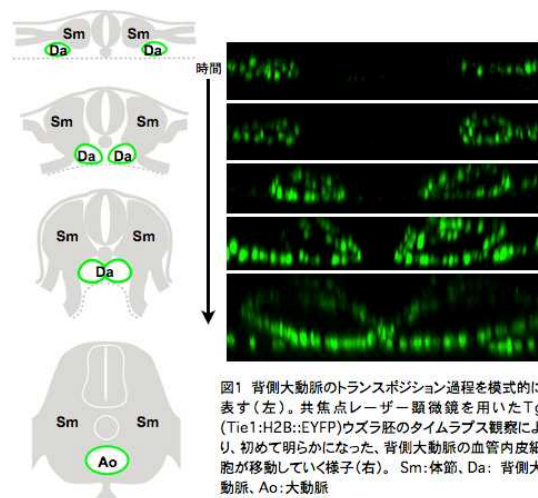
(1) 背側大動脈細胞が後方から前方へと移動する現象は、細胞自律的に制御されるか?

この疑問を検証する為、トランスジェニックウズラ $Tg(Tie1:H2B::YFP)$ 胚の背側大動脈を取り出し、その前後方向を反転させて野生型宿主胚へ移植し、共焦点レーザー顕微鏡下で発生させ、タイムラプス観察を行う。この操作を施された背側大動脈内のYFP陽性細胞の移動方向や速度について、対照実験群 (前後軸を反転させないまま移植したもの) と定量的に比較し、背側大動脈の内皮細胞が自律的な移動能を持つのかについて考察する。

(2) 背側大動脈の融合過程をタイムラプス観察する為の培養方法の確立

発生の初期段階で2本の並行する血管として形成が開始される背側大動脈は、体幹部の側方から正中側へ向かって移動し、最終的に正中線上で融合して一本の太い血管 (大動脈) になる (背側大動脈のトランスポジション現象、図1)。初期の背側大動脈の動きは、従来の共焦点レーザー顕微鏡を用いてトランスジェニックウズラ $Tg(Tie1:H2B::YFP)$ 胚のタイムラプス観察をすれば、追跡可能である。しかしながら、発生が進むにつれて太さを増した背側大動脈の場合、その全体像を観察することができない。この問題を解決する為、従来の共焦点レーザー顕微鏡ではなく、光シート顕微鏡システム (基礎生物学研究所

野中茂紀準教授との共同研究) による観察を試みる。この顕微鏡システムに最適なウズラ胚の培養方法とその為の装置を確立する。



(3) 背側大動脈の融合時の血管内皮細胞の動きの解明

上記の方法論を用い、 $Tg(Tie1:H2B::YFP)$ 胚のタイムラプス観察を行い、背側大動脈の融合過程を詳細にする。この観察結果を元にして、血管同士が融合する際に、それまであった血管内壁がどのような個々の血管内皮細胞の動きにより消失していくのかを明らかにする。

(4) 背側大動脈が融合する時に血管内皮細胞の形態はどう変化するか?

$Tg(Tie1:H2B::YFP)$ 胚は、核局在型の YFP を用いている為、個々の血管内皮細胞の形態変化を観察することはできない。背側大動脈が融合する際に隣り合う血管内皮細胞同士はどのような形態変化をするのかを知るため、膜局在 mCherry を、エレクトロポレーション法により、 $Tg(Tie1:H2B::YFP)$ 胚の背側大動脈へ導入する。この胚のタイムラプス観察から、いつどのようにして血管内壁が融合するのかを詳細にし、未だ謎の多い、血管融合現象の分子メカニズム解明への足がかりとする。

4. 研究成果

研究代表者が見いだした、背側大動脈の血管内皮細胞がからだの後ろ側から前側に向かって移動する現象に着目し、この細胞移動が背側大動脈の血管内皮細胞が元来もつ自律的な現象なのか、それとも背側大動脈を取り巻く周辺組織との相互作用や、心臓から送り出される血流等の刺激によって起こるのかを解明するため、ウズラ胚の背側大動脈を別の位置に移植し、本来の位置にあった場合

と同じような細胞移動が見られるかどうかをタイムラプス観察により検証した。その結果、異所性に移植された背側大動脈の血管内皮細胞は、若干の移動はするがその方向はランダムであり、正常な移動パターンを示さなかった。これにより、背側大動脈の細胞移動は、血管内皮細胞の自律的な性質でなく、周辺組織との相互作用等が重要であるということがわかった。

この発見を踏まえて、血管内皮細胞と周囲の組織との相互作用に着眼点を移し、背側大動脈が移動する際、隣接している体節細胞がどのような挙動を示すのかをタイムラプス観察した。細胞膜を可視化する蛍光タンパク質をコードする遺伝子をTg(Tie1:H2B::YFP)胚の体節に導入し、血管内皮細胞と体節細胞の動きを同時に観察した結果、背側大動脈が移動する際に、体節細胞の表面から細い突起が形成されることを発見した。この突起がどのような細胞骨格を主体にして形成されるのかを細胞骨格マーカーの染色で調べたところ、F-アクチンが豊富に局在していることがわかった。つまり、体節細胞の腹側部分は、フィロポディア様の突起を持つ(図2)。これは長きにわたる体節形成研究の歴史にも関わらず、文献的に記載されていない、全く新しい体節の特徴である。本研究で行った共焦点レーザー顕微鏡による三次元的な観察により、初めて存在が確認された。この体節のフィロポディア様突起は、背側大動脈の移動期に限定して一過性に見られる。現在、このフィロポディア様突起の役割について、さらなる解析を勧めている。

さらに本研究では、背側大動脈の腹側に接している内胚葉細胞についても、その挙動を明らかにするため、内胚葉細胞を特異的に可視化する方法を考案し、血管・体節・内胚葉のタイムラプスイメージング解析法を確立した。さらにまた、光シート顕微鏡によるウズラ胚の観察を試み、従来の共焦点顕微鏡による観察よりも良好な結果を得た。

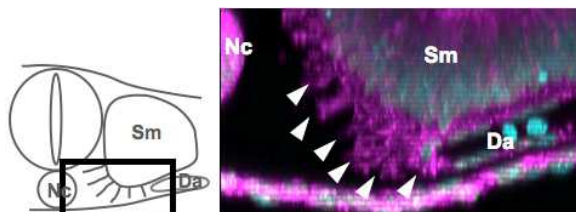


図2 体節細胞は、腹側の空間に向かって、フィロポディア様の突起(矢頭)を持つ。マゼンダはファロイジン染色により検出したF-アクチンを、シアンはhoechst染色された核をそれぞれ示す。Sm:体節、Nc:脊索、Da: 背側大動脈

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2件)

① “Dynamic lineage analysis of embryonic morphogenesis using transgenic quail and 4D multispectral imaging”. Bower, D.V., Sato, Y., and Lansford, R. *Genesis* 49, p619-643 (2011), 査読有

② “ Dynamic analysis of vascular morphogenesis using transgenic quail embryos” †Sato, Y., †Poynter, G., Huss, D., Filla, M.B., Czirok, A., Rongish, B., Little, C.D., Fraser, S.E., and Lansford, R., *PLoS ONE* 5, e12674 (2010), †Equally contributed, 査読有

〔学会発表〕(計4件)

① 佐藤有紀「血管のトランスポジション現象を支える血管内皮細胞の動き」第117回日本解剖学会総会・全国学術集会(招待講演) 2012.3.26、山梨大学(山梨)

② 佐藤有紀「トランスジェニックウズラ胚のタイムラプス観察からわかった血管内皮細胞のふるまい」日本顕微鏡学会第55回シンポジウム(招待講演) 2011.10.1、かがわ国際会議場(香川)

③ Sato, Y. and Nagatoshi, K. “Somitic filopodia are involved in dorsal aorta transposition”. 6th International Chick Meeting, 2011.9.17-20, Roslin institute (Edinburgh, UK)

④ Sato, Y. and Nagatoshi, K. “Somitic filopodia are required for dorsal aorta transposition”. 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2011.5.20、沖縄コンベンションセンター(沖縄)

〔図書〕(計1件)

①佐藤有紀 “体節から血管へ、組織の間を旅する細胞”「編むー生命誌年刊号」中村桂子編、新曜社、2012、5頁

〔その他〕

ホームページ等

①熊本大学大学院先導機構 研究の紹介
<http://sendou.kuma-u.jp/research/sato.html>

②研究室ウェブサイト

<http://bloodvesseldynamics.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 有紀 (SATO YUKI)

熊本大学・大学院先導機構・特任助教

研究者番号：90508186

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：