

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460249

研究課題名(和文) 静脈内皮からリンパ内皮への分化と管腔形成に伴う内皮細胞の分子特性と形態変化

研究課題名(英文) Sequential morphogenetic changes of lymphatic endothelium caused by molecular genetic cues

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュとメダカを用いて、静脈内皮からリンパ内皮細胞への分化に伴う形態変化と分子特性の変化を関連づけて追究した。

1. ゼブラフィッシュとメダカの胚から成魚に至る全てのリンパ管系の詳細な発生解剖アトラスの編纂に必要なデータを取得した。2. Arrey Tomography法により静脈内皮からリンパ内皮への形態変化過程を追究した。3. VEGFR3(flt4)ミュータント系統の頸部リンパ嚢の分化を制御するメカニズムを解析した。

研究成果の概要(英文)：As well known, lymph-endothelial cells are originated from venous endothelia in zebrafish and medaka embryos. We investigated sequential phenotypic changes which are closely related with the molecular genetic changes to become the lymph endothelium from the venous endothelium.

1. We compiled the anatomical atlas of lymph vascular systems in zebrafish and medaka from embryos through adults. 2. We investigated the sequential morphogenetic changes of lymph-endothelial cells with Arrey Tomography. 3. Using VEGFR3 mutant zebrafish, we analyzed developmental mechanisms of cervical lymph-sac.

研究分野：発生学・形態形成学

キーワード：リンパ管 小型魚類

1. 研究開始当初の背景

リンパ系は体液成分の恒常性の保持や免疫と脂肪の吸収において主要な生理機能を担い、癌や浮腫あるいは様々な炎症性疾患の病理においても重要な役割を演ずる。その必要性にもかかわらず、リンパ管研究は未だに多くがベールに覆われている。主な理由として、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。我々は小型魚類をリンパ管の分子遺伝学的研究の実験モデル動物として確立することを目的に研究を進め、リンパ管の発生研究とイメージングにゼブラフィッシュやメダカが極めて有用なモデル動物となりうることを示した。近年、リンパ管内皮の起源について、静脈内皮からリンパ内皮の分化を制御する様々な分子が特にマウスによって特定され、多くの報告がなされている。しかし、内皮細胞の分子特性の変化とそれに伴う形態の変化を関連させて詳細に追究した研究は見あたらない。ライブイメージングはリンパ内皮前駆細胞が静脈内皮から分化して管腔を生じ、リンパ管を形成してゆく過程を捉える追跡研究において重要な手段であるが、既存のモデル動物ではその操作が極めて困難であった。

2. 研究の目的

小型魚類モデルを用いて、静脈内皮からリンパ管内皮前駆細胞そしてリンパ嚢胞、さらにそれらが融合して管腔形成にいたるまでのリンパ管の内皮細胞の形態変化と分子特性の変化を関連づけて追究する。同時に、リンパ内皮の分化とリンパ管の形態形成メカニズムに関わる分子の発現と機能の解明を目的とする。

3. 研究の方法

1. リンパ集合管について、静脈内皮からリンパ管形成に至る形成過程をトランスジェニック系のライブイメージングとして捉える。走査電子顕微鏡(SEM)と透過顕微鏡(TEM)の観察により詳細なリンパ内皮細胞の形態変化と管腔形成過程を追究

し、静脈内皮からリンパ内皮への正常な分化過程を連続的に解析した。

2. マサチューセッツ大学の眞昌寛博士が確立したVEGFR3チロイシンキナーゼ受容体(リンパ内皮細胞の増殖と移動をコントロールする)に欠損を持つゼブラフィッシュのミュータント4系統について

2-1. リンパ管内皮が異物を取り入れる性質を利用してリンパ管系を色素で標識する方法を開発し、上記4系統の胚から成魚について解剖顕微鏡観察によりリンパ管系を形態学的に解析した。

2-2. SEM/TEM 観察によりVEGFR3の不活化の結果生ずるリンパ内皮細胞の形態変化を解析した。

4. 研究成果

1. ゼブラフィッシュおよびメダカリンパ管系の発生解剖アトラス

ゼブラフィッシュとメダカの発生解剖アトラスに必要なデータを取得し結果を表した。

胚について

リンパ管内皮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ゼブラフィッシュとVEGFR3のプロモーターでEGFPが発現するトランスジェニック透明メダカについて、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、二光子顕微鏡システムにより生体イメージングを行った。

幼魚・若魚・成魚について

リンパ管内皮が異物を取り入れる性質を利用して開発した幼魚・若魚・成魚リンパ管系を標識する方法により標本を作製し、ゼブラフィッシュとメダカの発生解剖アトラスの編纂に必要なデータを取得した。

これまでに得た全てのデータを解析し、胚から成魚に至る全てのリンパ管系の詳細な発生解剖アトラスを編纂している。このアトラスがリンパ管系に奇形を生じた劣勢突然変異体の大規模なふるい分け(large-scale forward-genetic screening)とその原因遺伝子の追究を可能にし、分子遺伝学的リンパ管研究を大きく推進すると考えている。小型

魚類をリンパ管の分子遺伝学的研究の実験モデル動物として確立する上で、このアトラスの存在は必須であり、平成 29 年度までに編纂を完了し、専門雑誌とウェブ・サイトにより公表する。

2 .Arrey Tomography 法による静脈内皮からリンパ内皮への形態変化過程の追究

走査型電子顕微鏡連続断面観察による生物組織三次元再構築 (Arrey Tomography 法、岩手医科大学バイオイメージングセンターとの共同研究) により、静脈内皮からリンパ内皮への連続した形態変化過程を細胞レベルで詳細に追究した。

これまでゼブラフィッシュでは体幹部のリンパ系を中心に研究が進められてきたが、我々はゼブラフィッシュ頸部リンパ囊の形成過程についてライブイメージングによる解析を進めた。体幹部とは異なり、静脈角から出芽したリンパ内皮はリンパ囊を形成した。ゼブラフィッシュ受精後 2~9 日胚のリンパ囊形成過程における静脈内皮からリンパ内皮への形態変化過程を Arrey Tomography 法により解析した。

Arrey Tomography 法による静脈内皮からリンパ内皮への形態変化過程の追究と下記の flt4 を欠損するゼブラフィッシュ・ミュータント系の解析は本研究が発展したため 26 年度から新たに加わった技法であり現在も継続中で、予定していた以上の成果をもたらした。

3 .リンパ内皮細胞の発生と分化に関与する遺伝子に欠損を持つミュータントの解析 3-1 (25 年度)

ゼブラフィッシュのメダカについて

免疫組織化学法により Prox1 と Tie-2 の発現を解析し、リンパ内皮の分化関わる候補遺伝子 flt4, lyve1, prox1 の働きを Morpholino micro injection で阻害し、flt4 について明確な阻害効果を確認した。

ゼブラフィッシュとメダカの内臓リンパ管内皮の脂肪吸収・運搬機能を生理学的に検討した。

硬骨魚類 (肉鱗類) の静脈内皮からリンパ管内皮への分子特性の変遷を検証する目的から、オーストラリア肺魚のリンパ管内皮について、免疫組織化学法により Prox1 と Tie-2 の発現解析を行った。

3-2 : flt4 を欠損するゼブラフィッシュ・ミュータント系の解析

25 年度の Morpholino Micro injection によるリンパ管内皮の分化の阻害実験で、候補遺伝子 flt4 について明確な阻害効果を確認した。下田研究室との共同研究 flt4 を欠損するゼブラフィッシュ系の確立を試みた。26 年度の後半、眞昌寛博士 (米国 Lawson Lab.) が同系を既に確立していることが分かり、眞博士との共同研究として同系の解析に着手した。米国マサチューセッツ大学の眞昌寛博士 (Lawson Lab.) が確立したリンパ内皮細胞の増殖と移動のコントロールに關与するチロイシンキナーゼ受容体 VEGFR3 (flt4) に欠損を持つゼブラフィッシュのミュータント 4 系統のリンパ管系について解析した。これまでに、我々はゼブラフィッシュで体幹部の胸管系を中心に研究が進め、体幹部胸管叢の形態形成過程においてケモカインのシグナルがその解剖学的構造を段階的に組織化する役割を果たしていることを明らかにした。26 年度から始めた本研究により、ゼブラフィッシュ頸部リンパ囊の形成過程についてライブイメージングによる解析を進めた。VEGFR3 に欠損を持つゼブラフィッシュのミュータント成魚を解析したところ、貧弱ではあるが頭部では野生種と同様の形態を示す主要リンパ集合管系が認められ、体幹部では貧弱な胸管系 (他の主要リンパ集合管系は欠損) が認められた。リンパ集合管を構成する内皮細胞の起源を探ったところ頸部リンパ囊由来であった。この結果は“リンパ内皮の由来とその分化を制御するメカニズムが頸部と胸部では異なる可能性を示唆した。本共同研究については現在も継続中である。

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 1 件)

Kimura E., Isogai S., Hitomi J.
Integration of vascular systems between
the brain and spinal cord in zebrafish.
Developmental Biology. 2015; 406 (1):
40-51.

[学会発表](計 10 件)

小型魚類リンパ管の標識法の開発
磯貝純夫 第 65 回日本動物学会 2014
9/11~13

リンパ管内皮の始原的特性

磯貝純夫 リンパ・免疫系懇話会 2015
3/20

Morphogenetic mechanisms of the lymphatic
endothelial cells in zebrafish and medaka.

Sumio Isogai 第 120 回日本解剖学会総会
全国学術集会、解剖学会生理学会合同大
会 2015 シンポジウム

Endothelial progenitor takes different
way to be an artery or a vein in the
cell-differentiation and the tube
formation. Erina Saito, Eiji Kimura,
Jiro Hitomi, Sumio Isogai The 18th
International Vascular Biology
Meeting H26. 4. 15

小型魚類リンパ管の機能形態学的解析
齊藤絵里奈, 出口友則, 磯貝純夫, 成田
大一, 岡野大輔, 浅野義哉, 下田浩 第 55
回日本組織細胞化学会総会・学術集会
H26. 9. 27

Angioblast takes different way
whether it becomes an artery or a
vein in the endothelial differentiation
and the tube formation. Sumio Isogai,
Erina Saito, Eiji Kimura, Jiro Hitomi
Vascular Biology 2014 H26. 10. 20

Novel mechanisms involved in the
endothelial differentiation of arteries and
veins during vasculogenesis and
angiogenesis. Erina Saito, Sumio Isogai, Eiji
Kimura, Hiroshi Shimoda, Jiro Hitomi
第 120 回日本解剖学会総会全国学術集会、
解剖学会生理学会合同大会 2015 シンポ
ジウム H27. 3. 21

小型魚類のリンパ輸送経路

齊藤絵里奈, 磯貝純夫, 成田大一, 岡野
大輔, 浅野義哉, 下田浩

第 39 回日本リンパ学会総会 H27. 3. 27
磯貝純夫 . ヒトの血管とリンパ管に残され
た謎を魚で解く .

第24回日本形成外科学会基礎学術集会(招
待講演); 2015; 盛岡 .

[図書](計 2 件)

磯貝純夫 . リンパ管発生過程のライブイメ
ージング . 細胞 . 東京 : ニューサイエンス
社 ; 2015: Vol.47, No.13: 8-11 .

磯貝純夫, リンパ内皮の分化制御、炎症と疫
疫、先端医学社 2016 (in press)

[産業財産権]
出願状況(計 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 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

下田 浩 (SHIMODA HIROSHI)
弘前大学・医学研究科・教授
研究者番号：202074748

(3)連携研究者

()

研究者番号：