

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：32702

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870618

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュの後脳と血管系の位置決定

研究課題名(英文)Vascular patterning related with the hindbrain in zebrafish embryo

研究代表者

藤田 深里(Fujita, Misato)

神奈川大学・理学部・助教

研究者番号：60633550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、生存に不可欠な役割を持つ後脳に着目して、その特徴的な分節構造や背腹軸の特性が後脳血管のパターン形成にどのように作用するのかを明らかにすることを目的とし、胚体内部を生きたまま観察できる脊椎動物モデルであるゼブラフィッシュを用いて解析を行った。

後脳は菱脳節と呼ばれる分節構造を持ち、それぞれの中央付近はシグナルセンターと呼ばれる特定の神経細胞が集合している。後脳の血管が形成される時、このシグナルセンター付近に血管枝の出芽が起こることから、シグナルセンターからの誘導因子と菱脳節境界からの反発因子の可能性について、発現解析と機能解析を行い、関与する遺伝子の分子機構を調べた。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have revealed that the developmental process of the vascular system follows a reproducible stereotypic program in each species. From the comparative anatomical point of view, a common developmental pattern is highly conserved throughout the vertebrates during early development. The brain vessels have an essential role for survival commonly in all vertebrates and in this study zebrafish was used for the research of brain vascular patterning.

The rhombomere is a common segmental structure in the developing hindbrain. Each center of rhombomere is characterized as a signaling center and determine neuronal development. The molecular mechanisms for the relationship between the vascular patterning and neuronal/non-neuronal development has not been uncovered. I examined that guidance cue(s) from each area in rhombomere and carried out gain- and loss- of function to figure out the relationship between hindbrain central arteries and rhombomere area-specific cell clusters.

研究分野：血管生物学

キーワード：脳血管 ガイダンス因子 後脳 発生 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

血管と神経は、ともに全身に張り巡らされており、両者が伴行する部位があることが古くから知られている。伴行形成において、血管と神経の相互作用が明らかにされ、血管と神経の発生を包括的に理解することが極めて重要となってきた。一方で、脳の内部の血管発生様式については、細胞の由来や挙動、分子メカニズムのいずれもほとんど解明されていない状態であった。

ゼブラフィッシュは、脳の深部の発生過程を生きたまま解析するのに適した優れたモデル生物である。これまでに、血管内皮細胞特異的に緑色蛍光タンパク質 eGFP を発現するトランスジェニック系統を用いてタイムラプスイメージング解析により、脳底動脈の形成過程と分子メカニズムの一端を明らかにしている。

2. 研究の目的

脳底動脈は、成体においても脳血管系の中心的な役割をする動脈である。脳底動脈の形成後期に、後脳中心血管と呼ばれる血管が後脳内部に分岐・伸長して形成され、後脳内に血液循環をもたらす。その後も後脳の神経発生に伴って後脳中心血管は発達する。この後脳中心血管について、形態形成の特徴を明らかにし、発生中の後脳内の神経細胞との相互作用を調べることを本研究の目的とした。

発生段階の後脳は、菱脳節と呼ばれる分節構造を取っており、その中心部にシグナルセンター、周辺部に神経細胞というように領域が分かれてくる。こうした領域の違いが血管パターンニングにどのような影響を与えているか、または逆の作用が関与しているのかどうか、に着目して中枢神経内の血管発生と神経の相互作用を解析した。

3. 研究の方法

菱脳節という分節性のある構造と血管のパターン形成の分子機構を明らかにするために、菱脳の内部の3つの異なる領域について、遺伝子発現解析と遺伝子ノックダウン解析を行い、後脳中心血管の出芽位置決定への関連を網羅的に調べる。

(1)平成26年度：蛍光二色 RNA in situ hybridization 法と切片解析により、菱脳シグナルセンター・菱脳中央(非神経系)・菱脳周囲(神経系)と出芽血管との位置関係を明らかにする。

菱脳のシグナルセンターと呼ばれる中央付近の特定の細胞は、*fgf20a* を発現していることが報告されている。このシグナルセンターと後脳中心血管の出芽位置との関係を調べるために、血管マーカーの *fli1a* と *fgf20a* の二つのプローブを用いて蛍光二色 RNA in situ hybridization を行う。出芽枝も *fgf20a* 陽性細胞も数細胞からなるため、共焦点レーザー顕微鏡や凍結切片法を利用する。観察する発生段階としては、後脳中心血管の出芽の

前後を含めた受精後 30、36、48 時間を用いる。*fgf20a* のシグナルを受けて菱脳の中央は神経分化が阻害されて非神経領域に分化し、*fgfr2・erm・sox9b・cyp26b1* が発現しているため、これらの遺伝子について発現領域と血管の走行位置について同様に発現解析により調べる。*fgf20a* のシグナルを受けなかった菱脳の周辺部位では神経分化が起こり *neurog1・neurod4* が発現してくるため、これらの遺伝子について発現領域と血管の走行位置について同様に発現解析により調べる。

(2)平成27年度：非神経領域の分化を阻害した場合の血管の出芽パターンを解析する。*fgf20a* を欠損させると、非神経領域に保たれるべき菱脳の中央に神経分化が進む。この時、後脳中心血管の出芽及び出芽位置がどのように影響を受けるかを調べるため、*fgf20a* に対する翻訳阻害を行うため、モルフォリノアンチセンスオリゴのインジェクションを行う。受精後 36 時間胚の後脳中心血管の出芽の有無を共焦点レーザー顕微鏡により確認する。FGF 阻害剤により FGF シグナル全般を阻害した場合についても検討する。

(3)平成28年度：神経領域の分化を抑制した場合の血管の出芽パターンを解析する。菱脳節境界細胞の神経分化を阻害するため、*neurog1* の翻訳阻害をモルフォリノアンチセンスオリゴのインジェクションにより行う。*neurod4* の発現を確認することで神経分化の阻害を確認し、血管出芽がどのような影響を受けるかを共焦点レーザー顕微鏡画像から解析する。ここまで得られた後脳血管のパターンニングに関するガイダンス因子について、タイムラプスイメージングを行って、出芽位置や細胞の挙動について詳細に調べる。血管出芽や走行パターンに影響を及ぼさない場合、神経領域が存在しているかどうかは血管の出芽に影響していない可能性を含む。以上、菱脳の各領域の特徴に基づく表現型解析と遺伝子ノックダウン解析を統合して、どの位置のどの細胞が後脳中心血管の出芽と走行パターン決定に対して誘導・反発作用を持っているのかを明らかにする。

4. 研究成果

(1)平成26年度

発現解析の結果、着目した遺伝子については出芽枝の近傍で発現が認められ、後脳中心血管の出芽位置と方向性に対して誘導的にガイダンス因子として働く可能性が強く示唆された。染色の技術的な精度の問題があり、出芽枝が伸長してきた際に細胞同士が接しているのか少し離れているのかは具体的には特定に至らなかった。

並行して、菱脳節境界からの反発的なガイダンス因子の探索を試みた。ゼブラフィッシュ胚の発現データベースに基づいて菱脳節境界に特異的に発現する遺伝子を挙げ、受精

後 30、36、48 時間における後脳での発現部位を確認して絞り込みを行った。発現時期と発現パターンの血管との位置関係から、ガイダンス因子としての有力な候補遺伝子を挙げることができた。

(2) 平成 27 年度

シグナルセンターに発現する *fgf20a* と得られたガイダンス因子の候補について、モルフォリノアンチセンスオリゴを用いて遺伝子ノックダウン実験を実施した。モルフォリノアンチセンスオリゴは、配列によって毒性や非特異性があることが報告されているため、変異体とノックダウン胚が同じ表現型を示す既知のものを選択した。1 つ目の候補遺伝子は、変異体では体節の形態形成に異常を生じることが知られており、その表現型が現れることを確認した後、血管のパターニング異常について調べた。胴尾部では体節の異常に伴って体節間血管の走行に異常が認められ、同様に頭部後脳でも血管の走行に異常が認められた。

2 つ目の候補遺伝子は、ガイダンス因子としては抑制的な機能が報告されていたため、遺伝子ノックダウン胚では出芽位置の多様化や血管枝の過形成などを予測していたが、脳血管の低形成が観察された。新規の機能について詳細に調べるために、複数の関連遺伝子について発現解析・機能解析を行っていく必要があると考えられる。

その他の候補遺伝子については、特異性や再現性が不足しており継続して実験を行うこととなった。

(3) 平成 28 年度

得られたガイダンス因子候補の作用機序について、既知のシグナルトランスダクションの情報をもとに発現解析や機能阻害実験を行い、後脳の神経領域・非神経領域と血管パターニングとの関連性を調べた。関与が示唆されている遺伝子が挙げられているが、その作用機序についてまだ十分な検討結果が得られていないため、引き続き実験を要すると判断している。

遺伝子ノックダウン実験は既知のモルフォリノアンチセンスオリゴを選択したため、候補としてあげられたガイダンス因子が絞られてしまった。そこで、新たなガイダンス因子の追加のための探索を行い、幾つかの候補遺伝子を選別した。順次クローニングを行い、後脳中心血管の発生と関連する発生段階について発現部位を確認し、機能阻害実験を行っていく。並行して、モルフォリノアンチセンスオリゴ注入以外の方法として、変異体の入手や遺伝子ノックアウトの作製についての準備も進めた。

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)

藤田深里、脈管発生研究のモデル生物：ゼブラフィッシュとメダカ(総説) 査読無
Sci. J. Kanagawa Univ., 2017

〔学会発表〕(計 5 件)

Misato Fujita, Erina Saito, Sumio Isogai. Differentiation of the Vascular Endothelial Cells in the Developing Zebrafish. 9th European zebrafish meeting. Oslo, Norway. 2015.

Hayato Endo, Misato Fujita. Patterning of the central arteries by dorsal hindbrain region in zebrafish. 21st Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, Osaka, Japan. 2015.

Wakana Ohishi, Naoki Murata, Misato Fujita. The relationship between patterning of the central arteries and rhombomere boundary formation in zebrafish. 21st Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, Osaka, Japan. 2015.

Misato Fujita. Patterning of the central arteries in the zebrafish hindbrain. The 24th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, Nagasaki, Japan. 2016.

Misato Fujita. Assembly and patterning of the vascular network of the zebrafish hindbrain. 2017 Exchange Symposium for Kanagawa University-National Taiwan University, Taipei, Taiwan. 2017.

〔図書〕(計 0 件)

該当無し

〔産業財産権〕

該当無し

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
該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 深里 (FUJITA, Misato)
神奈川大学・理学部生物科学科・特別助教
研究者番号：60633550

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()