

トランスジェニックウズラ胚を用いた血管のタイムラプス観察 Time-Lapse Imaging Analysis of Blood Vessels in Transgenic Quail Embryo

佐藤 有 紀
Yuki Sato

熊本大学大学院先端機構発生再生医学分野

要 旨 血管は、生体機能の維持にとって欠くことのできない非常に重要な器官である。胚発生期においても、心血管系は最初に機能を開始し、胚発生の維持に必須の役割を果たす。血管は機能的なネットワークを作りながらも、胚の成長にあわせて走行パターンを変化させていく。筆者は、血管ネットワークがどのような個々の血管内皮細胞の動きによって形成され、またどのようにして胚の成長に対応するのかを解明するため、トランスジェニックウズラ Tie1:H2B::EYFP 胚のタイムラプス観察を行ってきた¹⁾。このウズラ胚を用いれば、からだの三次元的構造の中での血管形成の様子をタイムラプス観察できることから、高等脊椎動物の血管イメージングモデルとして今後の貢献が期待される。本稿では、Tie1:H2B::EYFP 胚のタイムラプス観察結果をもとに、羊膜類胚において血管形成がどのような血管内皮細胞の挙動によって支えられているのかを紹介する。

キーワード：血管，トランスジェニックウズラ胚，タイムラプス観察

1. はじめに

ノックアウトマウスおよびゼブラフィッシュ変異胚の解析から、多くの血管形成に関わる遺伝子群が同定されている。特に血管成長因子 (Vascular growth factor: VEGF), Notch, Eph, Hedgehog などのシグナル情報伝達経路が、共通して脊椎動物の血管形成に必須であることは、よく知られている²⁾。これらのシグナル伝達経路に関わる遺伝子がひとつでも欠損すれば、血管形成に異常をきたし、胚発生の初期段階において胚性致死に至ることから、正常に血管形成が起こることが胚発生の維持にとって重要であることがわかる。培養された血管内皮細胞や胚性幹細胞 (ES 細胞) 等を用いた *in vitro* モデルでは、血管内皮細胞の分化や管腔形成誘導の分子機構がさかんに研究されている。従来の研究から得られた成果は、血管の増殖や伸長を制御するしくみを明らかにし、腫瘍形成時の血管新生メカニズム解明等に応用されている。多くの研究成果から、すでに理解され尽くしているという印象を受ける血管形成過程ではあるが、発生生物学的な観点から見たときに、次のような謎が未だ残されている。(1) からだの各所で個別に生まれる血管内皮細胞が、どのように分化と増殖を空間的・時間的に制御し、からだの三次元的立体構造の中で秩序だった血管ネットワークの形成に寄与していくのか？(2) いったん形成された血管網は、発生中の胚のからだの末端まで酸素や栄養を行き渡らせるために、血液循環を保ちな

がらネットワークパターンを刻々と変化させる。その過程は個々の血管内皮細胞のどのような動きにより支えられているのか？(3) これらの血管内皮細胞の動態は、どのような分子メカニズムによって制御されるのか？以上の疑問に答える為には、従来の固定した状態の胚や、培養細胞等の *in vitro* モデル系を用いる方法論だけでなく、実際に生きている個体内での血管形成を直に観察するアプローチが必要不可欠である。Rusty Lansford 博士 (カリフォルニア工科大学, 米国) が樹立したトランスジェニックウズラ Tie1:H2B::EYFP は、血管内皮細胞の核を特異的に可視化できる¹⁾。筆者は、この血管イメージングモデルを用いて、生体内における血管内皮細胞の動きを制御するメカニズムの解明と、その発生生物学的な意義の理解を目指している。

2. 血管形成研究におけるタイムラプス観察の重要性

従来型の血管形成研究は、固定した胚の組織切片を用い、組織の形態やマーカー発現の有無などの、ある発生時期での定性的な特徴を見いだすことが中心であった。その一方で、血管パターンの経時的な変化率を調べるための定量的アプローチ法に乏しい。血管のような複雑なネットワークパターン形成を制御するしくみを理解するためには、血管内皮細胞が「いつ、どこで、どのように、どれくらい」動くのか？という視点からの理解が必要となる。近年の様々な蛍光タンパク質や蛍光プローブの開発、さらに共焦点レーザー顕微鏡の汎用化によって、細胞を生きたまま観察する方法論が確立された現在、組織の形態形成現象を細胞単位の動きから理解する試みがさかんに行われている。室温で発生が進行し、から

〒 860-0811 熊本市中央区本荘 2-2-1 共用実験棟 1
TEL & FAX: 096-373-6823
2012 年 8 月 17 日受付

だが透明なために励起光が内部に届きやすいゼブラフィッシュ胚は、タイムラプス観察に適したモデル動物である。変異体が多数作製され、その原因遺伝子の同定もかなり進んでおり、遺伝学的手法を用いて着目する発現現象の分子メカニズムに迫ることができる。これもゼブラフィッシュ胚の大きな利点である。血管内皮細胞を特異的に可視化するトランスジェニックゼブラフィッシュ胚のタイムラプス観察からは、これまでに多くの知見が得られている³⁾。しかしながら、魚類と羊膜類とは血管が作り上げられる過程や血管サイズ、心臓の構造などに大きな違いがあり、ゼブラフィッシュ胚における血管形成メカニズムは、鳥類やほ乳類などの羊膜類胚と必ずしも同等でない。遺伝子工学技術が最も進歩しているモデル動物のマウスについては、近年、全胚培養法の進化を受けて、タイムラプス観察の成功例がいくつか報告されている。しかし、体幹部の腹側部に位置する主要な血管群のタイムラプス観察は、非常に難しいようである。

3. トランスジェニックウズラ Tie1:H2B::EYFP

筆者が研究で用いているウズラ胚（およびニワトリ胚）は、卵殻に穴を開けたのち、その穴を透明なテフロン膜で密封し直せば、卵の中で発生が進む様子をタイムラプス観察することができる⁴⁾。さらに卵殻外での全胚培養も可能である⁵⁾。血管内皮細胞の挙動は、血流から受ける剪断応力（ずれ応力）や、酸素分圧を感知する機構によっても制御される⁶⁾。このため、血管内皮細胞の正常な動きを観察する為には、循環器機能が正常に保たれた状態の個体を用いなければならない。ウズラ・ニワトリ胚では、心臓・血液循環等の生体維持に必須の機能を正常に保ったままで初期胚を生育させることができる。ウズラ・ニワトリ胚は、エレクトロポレーション法による遺伝子導入が可能である。遺伝子の機能解析実験は、血管形成の分子メカニズムを解明する上で欠かすことができない。これまでに様々なエレクトロポレーション用のベクターが用途別に開発されており、ウズラ胚ではそれらを用いて緻密な遺伝子発現実験を組み立てることができる⁷⁾。このようなモデル生物としての利点を最大限に生かしながら血管形成メカニズムを解明することを目的として、Tie1:H2B::EYFPトランスジェニックウズラは作製された。

鳥類のモデルとして広く用いられているニワトリではなく、ウズラ胚を選択したのは、ウズラの方が遺伝学的なアプローチに適しているからである。孵化するまでと性成熟までに要する期間が短いこと。さらに成体のサイズが小さく、限られたスペースの動物飼育施設で無理なく系統を維持できることが、具体的な理由として挙げられる。Tie1:H2B::EYFPトランスジェニックウズラは、血管内皮細胞において特異的に発現するTie1遺伝子のプロモーターの下流に、ヒストンH2BとEYFPをコードする遺伝子を導入されている¹⁾。共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行えば、血管の三次元的な構造や、そこにどのようなパターンで血管内皮細胞が分布しているのかを知ることができる（図1）。前述したように、

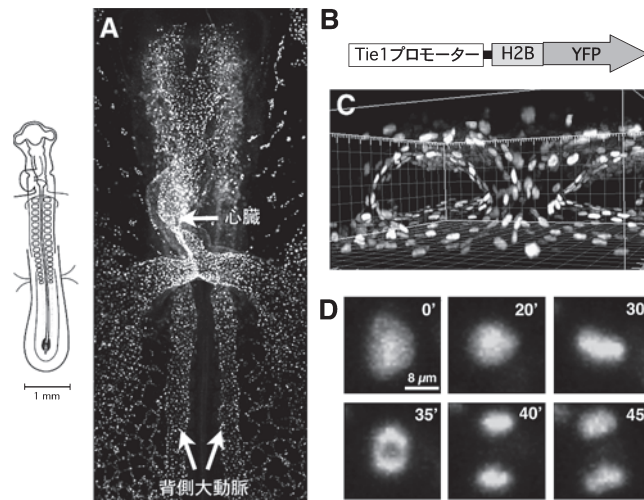


図1 Tie1:H2B::EYFPトランスジェニックウズラ胚

A. 蛍光実体顕微鏡で撮影した初期のTie1:H2B::EYFP胚。B. ウズラゲノムに挿入した遺伝子。C. 共焦点レーザー顕微鏡画像をもとに立体構築した背側大動脈を断面から見たところ。グリッド型：20 μm。D. 分裂増殖中の血管内皮細胞のEYFPシグナル（単位：分）。

ウズラ胚はイメージング解析に適した羊膜類のモデルと言える。その反面、鳥類は、ゲノムへの遺伝子導入法が確立されている他のモデル動物と異なり、生殖巣への遺伝子導入効率がきわめて低く、トランスジェニック系統の作製が容易でないという技術的課題を持つ。実際に、Tie1:H2B::EYFPトランスジェニックウズラは、2年以上に及ぶ遺伝子導入キメラ作製とスクリーニングの後に樹立された、数少ないトランスジェニック鳥類の一つである。

鳥類胚の従来のイメージング解析では、エレクトロポレーション法や蛍光色素標識法を用いて細胞を可視化してきた。しかしこれらの方法の技術的な限界により、注目する組織に存在する全ての細胞を標識できるわけではない。したがって、その組織内に異なる挙動をする細胞群が存在していたとしても、標識されなければ、それらの細胞の動きを観察できないということである。リモデリングを繰り返しながら確立されていく血管形成のしくみを理解するには、全体の血管内皮細胞の動きを捉えた上で、その中から血管の形態変化につながる特徴的な動きを見いだすことが重要である。Tie1:H2B::EYFPトランスジェニックウズラは、無数に存在する血管内皮細胞の識別と追尾を、画像解析ソフトウェア（アメリカ国立衛生研究所（NIH）のImageJなど。筆者はBitplane社のImarisを利用している）を用いて自動的に行うことを念頭に置いて作製されている。これによって、視野内に存在する全ての血管内皮細胞の動きを定量化し、統計的な評価を行うという解析スキームを実施することができる。

4. 発生初期の血管内皮細胞の挙動

Tie1:H2B::EYFPトランスジェニックウズラ胚では、血管内皮細胞が分化を開始する時期から、血島と呼ばれる胚体外

中胚葉に位置する最初の造血組織において EYFP シグナルを認めることができる¹⁾。血管形成に寄与する組織の発生運命地図は、ウズラーニワトリキメラ胚解析によってかなり詳細に調べられている。1970年代後半から90年代にかけ、さかんに行われたウズラーニワトリキメラ胚解析から、血島が血管内皮細胞・血管平滑筋・血球の共通前駆組織であることは示されていた⁸⁾。しかしながら、血島で分化する血管内皮細胞が、どのように胚の内部へと移動し、血管を作り出していくのかはよく知られていなかった。Tie1:H2B::EYFP 胚のタイムラプス観察から、胚体外の血島で生まれた血管内皮細胞が胚体内へ長距離を移動し、体幹部の血管を作り上げる過程が明らかになった(図2)。Tie1 プロモーターが活性化してから、EYFP レポーターの発現レベルが検出感度になるまでに時間差があるので、EYFP シグナルの検出時期が血管内皮細胞の分化タイミングと必ずしも一致する訳ではない。しかし、血島で EYFP シグナルを検出できることを踏まえると、Tie1:H2B::EYFP 胚では、分化後の早い段階から血管内皮細胞を可視化できるようである。細胞分裂中の血管内皮細胞で

は、染色体の凝集に伴う EYFP シグナルの形態変化が見られ、その後2つに分かれるという有糸分裂中期から後期の特徴を観察することができる(図1)。この特徴を利用し、増殖中の血管内皮細胞を検出することが可能である。タイムラプス撮影画像に対して、EYFP のシグナルが検出され始める場所(=血管内皮細胞が分化する場所)と EYFP シグナルが2つに別れる場所(=細胞分裂が起こる場所)をそれぞれプロットした(図2)。その結果、血管内皮細胞が供給される過程がわかった。(1)最初に血管内皮細胞は現れる場所は、血島が存在する胚体外領域である。(2)次に側板中胚葉でも血管内皮細胞が生まれるようになる。(3)体幹部に背側大動脈が形成される時期になると、体節中胚葉からも血管内皮細胞が現れる。これらの結果は、ウズラーニワトリキメラ胚を用いた細胞運命マッピングにより示唆された血管内皮細胞の供給源の時間的な変遷と、見事なまでに一致している⁸⁾。血管内皮細胞の総数に占める、新規に分化する血管内皮細胞の割合は、血島で血管内皮細胞をさかんに作り出す初期が最も高く、発生の進行に従って減少する。その一方で、細胞分裂によって増える血管内皮細胞の割合は、発生段階を通じてある一定の頻度で維持される。つまり、血管内皮細胞の供給の仕方には2つのモードがあり、最初は血島からの分化がほとんどで細胞増殖が占める割合は多くないが、次第に新たに分化する細胞の割合は減少し、細胞増殖が一定の割合で起こることによって血管内皮細胞の数が適性に維持されるようである。

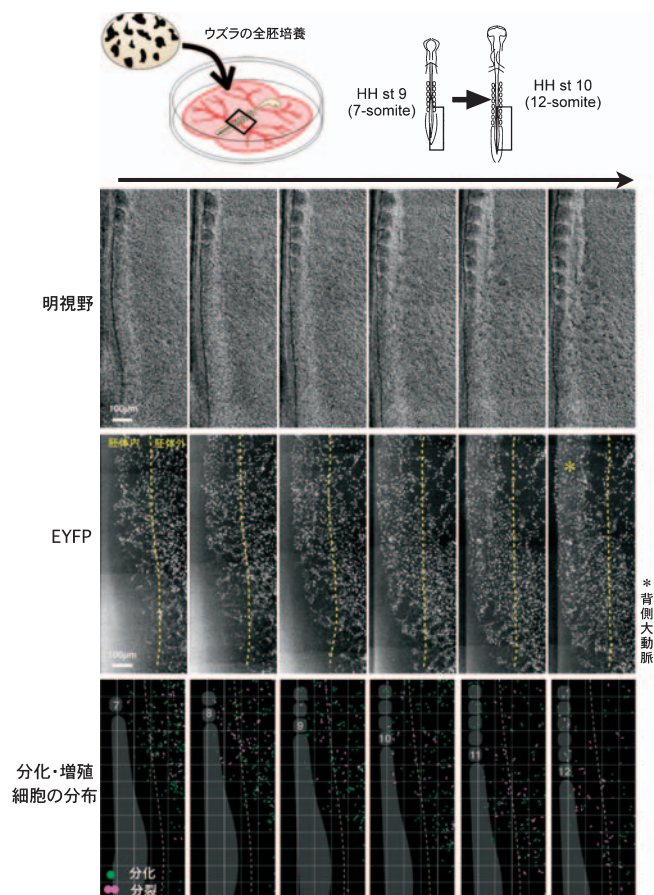


図2 体幹部の血管内皮細胞の位置変化

始めは胚体外に多く存在している EYFP 陽性血管内皮細胞が胚体内へ移動し、背側大動脈を形成する様子がわかる。下段：血管内皮細胞が分化・増殖する場所をそれぞれプロットしたもの。発生が進行するに従い、血管内皮細胞が分化・増殖する場所、分化と増殖の比率が変化する。

5. 背側大動脈形成時の血管内皮細胞の動き

背側大動脈は、体幹部に最初に形成され、すぐに機能を開始する太い血管である。この血管は、側板の直下に並行して出現し、わずか数時間の間に内腔を拡大しながら正中線方向へ向かって位置を変化させ、最終的にからだの中央で融合して一本の太い血管を形成する。この背側大動脈の融合によっ

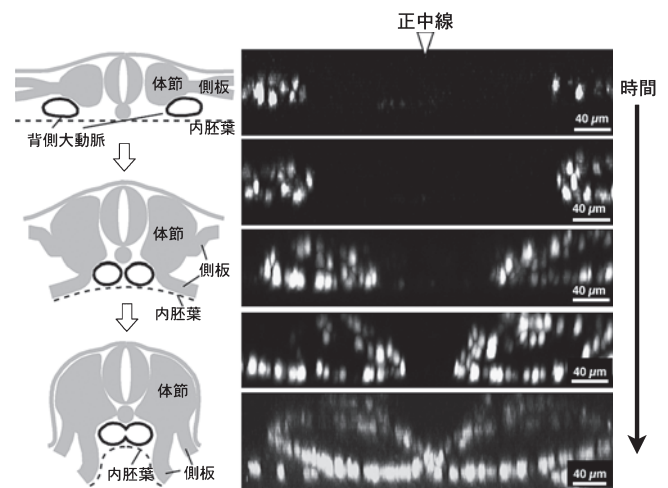


図3 背側大動脈のトランスポジション

Tie1:H2B::EYFP 胚のタイムラプス観察画像を再構築して、断面からみた背側大動脈。からだの側方から正中軸方向へ血管の位置が移動する。

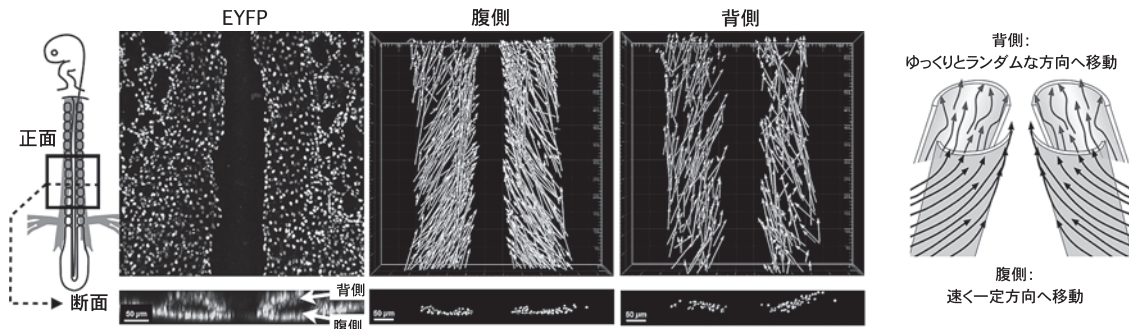


図4 背側大動脈を形成する血管内皮細胞の動き

Tie1:H2B::EYFP 胚のタイムラプス観察から明らかにした、背側大動脈の血管内皮細胞の移動方向を矢印で示す。上段：正面からみた背側大動脈の内皮細胞の動き。全体的に前方へ向かってベクトルが伸びているが、背側と腹側とではベクトルの傾向が異なる。下段：断面からみた背側大動脈。

て形成される血管が、大動脈である(図3)。Tie1:H2B::EYFP トランスジェニックウズラ胚のタイムラプス観察画像について行った各 EYFP シグナルの追尾解析から、背側大動脈を構成する血管内皮細胞が、以下の特徴をもつ移動様式をとることを見いだした¹⁾。背側大動脈の腹側に位置する細胞は、一様に側方から正中線へ斜め前方方向へ位置を変化させる。その一方で、背側大動脈の背側に位置する血管内皮細胞の移動様式には決まった傾向がなく、前方へ向かって動いていく(図4)。移動方向だけでなく、両者の間には移動速度にも差があり、腹側部の内皮細胞の方が背側部よりも速く移動する。一本の血管を構成する血管内皮細胞が、位置によって全く異なる移動様式をとることを示すこの観察事実は、筆者にとって大変な驚きであった。

腹側部分は側板中胚葉から、背側部分は体節から血管内皮細胞を供給されることがすでに知られている。筆者が発見した、腹側と背側とで異なる背側大動脈の血管内皮細胞の動きは、それぞれが異なる組織に由来することや、接している周辺組織群の違い等と何らかの関連性があると予想している。特に、腹側部分が接している内胚葉では、*VEGF* や *Sonic hedgehog (Shh)*、*SDF1* などの血管内皮細胞の誘引に関わる分泌性因子群を発現している。筆者は、移動時に内胚葉と常に接している腹側の血管内皮細胞の方が、背側の血管内皮細胞よりもこれらの誘引因子群の影響を受けやすい環境にあると想像している。背側大動脈が側方から正中線方向へ向かって位置を変化させる現象は、腹側の血管内皮細胞が規則的に移動することによって進行する可能性が高い。この特徴的な細胞移動様式を制御する分子メカニズムを解明することにより、多くの謎に包まれている背側大動脈のトランスポジションのしくみに迫ることができると予想している。なお、背側大動脈の血管内皮細胞が前方へ移動するしくみについても、今後、解明していく必要がある。

6. 血管イメージングの課題

2本の背側大動脈は、正中軸方向で出会ったのちに融合する(図3)。この現象は、血管が内部に血流を保持しながら

再構成するメカニズムを理解する上で、よいモデルである。筆者は、背側大動脈が融合する際に、血管内皮細胞がどのように動いて脈管構造を再編成するのかを明らかにしたいと考え、背側大動脈融合時期の Tie1:H2B::EYFP トランスジェニックウズラ胚のタイムラプス観察を試みてきた。しかしながら、この時期の胚では、背側大動脈の背側半分の EYFP シグナルを鮮明に観察することができなかった(図5)。背側大動脈のタイムラプス観察は、倒立型の共焦点レーザー顕微鏡を用い、胚の腹側を対物レンズに向けて行う。早い段階には検出できていた深部の EYFP シグナルが、時間経過と共に検出できなくなっていく一方で、対物レンズから見て手前側に位置する EYFP シグナルの強度は全く影響を受けない(図5)。つまりこの現象は、長時間の励起光照射による蛍光タンパク質の光漂白に起因するものではなく、胚の何らかの変化によってもたらされるものと推測された。背側大動脈内では、心臓が拍動を開始する時期から血流循環が始まるが、その段階では血流中に放出されている赤血球は少なく、ほとんどが液性の成分である。しかし数時間後には、血島から遊離した赤血球が、大量に背側大動脈内へ流入してくる。実験的胚操作によって血球数を減少させた Tie1:H2B::EYFP 胚では、背

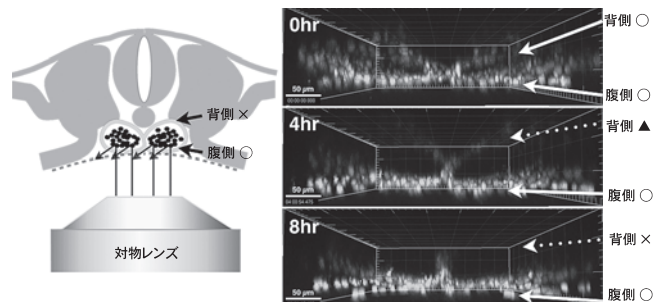


図5 融合中の背側大動脈観察の難しさ

対物レンズから見て手前に位置する背側大動脈の腹側部は、高感度で EYFP シグナルを取得できる。その一方で、血流の背面に位置する背側部は、早い時期には観察可能だが(0 hr)、多量の赤血球が流れ始めると、背側部の観察が困難になる(4-8 hr)。

側部の EYFP シグナルを観察できるようになる。従って、背側大動脈内の血球数の増大が、その背後にある EYFP シグナルを検出不能とする主な原因であると考えられる。赤血球内のヘモグロビンタンパク質は赤色をしているため、励起光が赤血球により吸収・散乱し、対物レンズから見ると血球の背後にある血管内皮細胞まで到達できないのだろう。

血管の動静脈パターンニングとその後の血管機能の維持にとって、血流から受ける剪断応力は欠くことができない。従って、正常な血管形成メカニズムの研究を成り立たせるためには、血管内皮細胞の観察の為に血球を取り除くことはできない。何らかの工夫が必要となってくる。筆者は、従来の共焦点レーザー顕微鏡による観察では、赤血球の背後に位置する血管内皮細胞の検出は難しいと考えている。背側大動脈のように豊富に血流を循環させる太い血管のタイムラプス観察には、ライトシート顕微鏡 (DSLM: Digital Scanned Light-sheet Microscopy など) が威力を発揮するのではないかと予想している。ライトシート顕微鏡は、シート状に照射される励起レーザーの高い透過力と、複数方向からの照射によって、厚みのある生体試料の全体像の観察を可能にする最新の蛍光観察技術である⁸⁾。この顕微鏡を Tie1:H2B::EYFP 胚のタイムラプス観察に用いれば、血球による光散乱の影響を避けて、発生後期の背側大動脈の血管内皮細胞をくまなく検出できるのではないかと期待している。

7. まとめ

Tie1:H2B::EYFP トランスジェニックウズラは、*in vivo* における血管内皮細胞の挙動をつぶさに追跡できる高等脊椎動物のモデル動物である。このトランスジェニックウズラ胚に、エレクトロポレーション法による局所的な遺伝子機能解析を組み合わせることで、着目する細胞の移動速度や向き、増殖などの挙動を制御する分子群の役割を定量的に評価できるよ

うになる。筆者は、この方法を用いて、背側大動脈形成のしくみを、個々の血管内皮細胞の挙動から理解していきたいと考えている。

謝 辞

Tie1:H2B::EYFP トランスジェニックウズラの樹立は、筆者の前所属機関、米国カリフォルニア工科大学バックマン研究所バイオイメージングセンターの Rusty Lansford 博士の発案の下、Greg Poynter 氏と David Huss 氏により行われた。系統樹立までの2年間に及ぶスクリーニングと系統維持管理業務に対して、感謝と敬意を表したい。

文 献

- 1) 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)
- 2) Herbert, S.P.: *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 12, 551–564 (2011)
Stainier, D.Y., Kulesa, P.M., Bailey, C.M., Cooper, C. and Fraser, S.E.: *Cold Spring Harb. Protocol*, pdb prot5446 (2010)
- 3) Isogai, S., Lawson, N.D., Torrealday, S., Horiguchi, M. and Weinstein, B.M.: *Development.*, 130, 5281–5290 (2003)
- 4) Kulesa, P.M., Bailey, C.M., Cooper, C. and Fraser, S.E.: *Cold Spring Harb. Protoc.*, pdb prot5446 (2010)
- 5) Chapman, S.C., Collignon, J., Schoenwolf, G.C. and Lumsden, A.: *Dev. Dyn.*, 220, 284–289 (2001)
- 6) 安藤 稔二 編: 血管のメカノバイオロジー, 血管医学, 11 (2010)
- 7) Sato, Y., Kasai, T., Nakagawa, S., Tanabe, K., Watanabe, T., Kawakami, K. and Takahashi, Y.: *Dev. Biol.*, 305, 616–624 (2007)
- 8) Dieterlen-Lievre, F. and Le Douarin, N.M.: *Mech. Dev.*, 121, 1117–1128 (2004)
- 9) 野中茂紀: 胚まるごとのライブイメージングを可能にする顕微鏡 DSLM, メディカルバイオ, 1月号 (2009)