

授与番号	甲第 1879 号
------	-----------

## 論文内容の要旨

Early development of the pulmonary vascular system: An anatomical and histochemical reinvestigation of the pulmonary venous return development in mice

(肺血管系の早期発生：マウスにおける肺静脈還流形成の解剖学的及び組織学的再検討)

(阿部志津香, 村嶋亜紀, 木村英二, 依馬正次, 人見次郎)

(Acta Histochemica 124 巻, 2 号, 令和 4 年 2 月掲載)

### I. 研究目的

正常な肺静脈還流路の形成は出生後の体循環から完全に独立した肺循環の形成に必須である。この発生過程に異常が起こると先天性心疾患の一つである肺静脈還流異常症 (anomalous pulmonary venous return, APVR) が生じ、生後早期から重篤なチアノーゼや心不全症状をきたす場合もある。APVR の病態及び病因の理解には正常な肺静脈還流路の形成過程を理解することが必須である。今日まで肺循環、特に肺静脈形成に関してその起源や解剖学的特徴について多くの議論がなされてきたが、体循環と混交して発生してくる初期の呼吸器原基の還流路や、肺静脈内皮細胞の組織学的特徴については不明なままである。本研究は血管内皮細胞マーカーであるエンドムチン (Emcn), CD31, CD34, Flk1 を用いてマウス胚における肺循環形成過程を 3 次元的に解析し、初期の呼吸器原基の還流路から肺静脈が左房への還流路として確立するまでの変遷を時空間的に明らかにすることを目的とした。

### II. 研究対象ならび方法

研究には ICR マウス及び Flk1-GFP BAC トランスジェニックマウスの胎生 (E) 8.5-16.5 日胚を用いた。抗 Emcn 抗体、抗 CD31 抗体及び抗 CD34 抗体を用いてホルマウント免疫蛍光染色を行い、透明化処理後に共焦点レーザー顕微鏡で観察・撮影した。得られたデータは必要に応じ、Amira や imaris, imageJ などの画像解析ソフトウェアを用いて解析し、各分子マーカーの発現を認める血管を同定した。また上記抗体を用いてパラフィン連続切片を免疫組織化学法にて染色し、肺静脈の開口部の組織学的解析を行った。上記動物実験は岩手医科大学の動物実験に関する基本指針に則り試行した。

### III. 研究結果

Ramos ら (1990) の報告に基づき、肺静脈還流路の形成過程を 3 つのステージに分けて解析した。

#### 1. Precirculatory stage (E8.5-E9.0)

E8.5 では背側大動脈や前後主静脈, 総主静脈および卵黄囊静脈において *Emcn*, CD31, CD34, Flk1-GFP の発現が見られたが, 初期の呼吸器原基の血管系となる splanchnic plexus (SP: 前腸周囲の血管叢) の形成はいずれの分子マーカーでも検出されなかった。E9.0 になると, 解析した胚のうち 71% (5/7) で *Emcn* と CD31, 50% (2/4) で Flk1-GFP による SP の形成が確認された。また 20% (1/5) で CD34 による SP の形成が確認されたが, *Emcn* と比較して発現が乏しかった。*Emcn* 染色標本の 3 次元解析により, SP は洞房領域及び静脈洞との連絡のほか, 背側大動脈, 総主静脈, 卵黄静脈との連絡が確認できた。このうち洞房領域との連絡は肺静脈共通幹原基であり, また, 切片の免疫組織化学では, 洞房領域の心内膜の膨出 (pulmonary pit) 部において, *Emcn* が発現していた。

#### 2. Peripheral and intermediate drainage stage (E9.5-E10.0)

E9.5 で初めて気管咽頭溝の形成が確認できた。このとき SP では, 解析した胚のうち全てにおいて *Emcn* と CD31, CD34, Flk1-GFP の発現を認め, 洞房領域や静脈洞, 卵黄静脈, 総主静脈との接続を認めた。E10.0 になると SP は pulmonary plexus (PP) と, 尾側の gastrointestinal plexus (GP) に区別でき, 背側大動脈との連絡のほか, PP は洞房領域と総・前主静脈, GP は静脈洞と卵黄静脈との連絡を認めた。流入路としては肺動脈が初めて観察され, PP を介した還流路は, 洞房領域のみならず静脈洞および体循環系の静脈であることが推察された。切片では洞房領域左側後壁から PP へと続く肺静脈共通幹の管腔形成が確認された。

#### 3. Central drainage stage (E10.5-)

E10.5 では肺静脈共通幹や肺動脈は前のステージよりも太くなり, 肺循環の確立が顕著に認められた。PP の体循環系静脈への還流路はほぼ認められなかったが, GP との部分的な連絡は持続しており, GP は依然卵黄囊静脈や臍静脈へ還流していた。

### IV. 結語

*Emcn* が肺静脈発生早期からその起源である SP の血管内皮細胞で発現していることを明らかにした。また, *Emcn* の発現解析から, 肺血管系の還流路が, 静脈洞や主静脈などの体循環系静脈系と, 肺静脈原基を介して心臓に戻る循環系より成ることを, 3 次元的に初めて画像化し, これらの時空間的变化を明らかにした。この結果が APVR などの肺静脈形成異常の病因の解剖学的理解を深める新たな知見を提供し, 今後の肺静脈形成に関わる組織学的解析の一助となることを期待する。

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授 前門戸 任 (内科学講座呼吸器内科分野)  
副査 教授 齋野 朝幸 (解剖学講座細胞生物学分野)  
副査 教授 齊藤 元 (呼吸器外科学講座)

本研究は血管内皮細胞マーカーであるエンドムチン (Emcn), CD31, Flk1を用いてマウス胚における肺循環形成過程を3次的に解析し, 初期の呼吸器原基の還流路から肺静脈が左房への還流路として確立するまでの変遷を時空間的に明らかにすることを目的とした。

研究にはICRマウス及びFlk1-GFP BACトランスジェニックマウスの胎生 (E) 8.5-16.5日胚を用いた。抗Emcn抗体及び抗CD31抗体を用いてホルマウント免疫蛍光染色を行い, 透明化処理後に共焦点レーザー顕微鏡で観察・撮影した。得られたデータは必要に応じ, AmiraやimageJなどの画像解析ソフトウェアを用いて解析し, 各分子マーカーの発現を認める血管を同定した。また上記抗体を用いてパラフィン連続切片を免疫組織化学法にて染色し, 肺静脈の開口部の組織学的解析を行った。

結果は下記となる。

E8.5では背側大動脈や前後主静脈, 総主静脈および卵黄囊静脈においてEmcn, CD31, Flk1-GFPの発現が見られたが, 初期の呼吸器原基の血管系となるsplanchnic plexus (SP:前腸周囲の血管叢)の形成はいずれの分子マーカーでも検出されなかった。

E9.0になると解析した胚のうち50% (5/10)でEmcn, 25% (1/4)でFlk1-GFPによるSPの形成が確認された。このときCD31の発現を認めたものはなかった (0/6)。Emcn染色標本の3次的解析により, SPは洞房領域及び静脈洞との連絡のほか, 背側大動脈, 総主静脈, 卵黄囊静脈との連絡が確認できた。このうち洞房領域との連絡は肺静脈共通幹原基であり, また, 切片の免疫組織化学及び免疫蛍光染色では, 洞房領域の心内膜の膨出 (pulmonary pit) 部において, EmcnとCD31が共に発現していた。

E9.5で初めて気管咽頭溝の形成が確認できた。このときSPでは, 解析した胚のうち全てにおいてEmcnとFlk1-GFP, 67% (4/6)でCD31の発現を認め, 頭側の気管咽頭溝またはその前兆である前腸腹側の肥厚上皮周囲を取り囲むpulmonary plexus (PP)と, 尾側のgastrointestinal plexus (GP)に区別できた。PPは洞房領域と前主静脈, GPは静脈洞と卵黄囊静脈との連絡を認めた。E10.0になると全ての胚においてPP及びGPにおけるEmcn, CD31, Flk1-GFPの発現を認めた。肺静脈共通幹に加え, PPと前主静脈の連絡はE9.5同様認められた。流入路としては肺動脈が初めて観察され, PPを介した還流路は, 洞房領域のみならず静脈洞および体循環系の静脈であることが推察された。切片では洞房領域左側後壁からPPへと続く肺静脈共通幹の管腔形成が確認された。

E10.5では肺静脈共通幹や肺動脈は前のステージよりも太くなり, 肺循環の確立が顕著に認められた。PPの体循環系静脈への還流路はほぼ認められなかったが, GPとの部分的な連絡は持続しており, GPは依然卵黄囊静脈や臍静脈へ還流していた。

本研究結果をまとめるとEmcnが肺静脈発生早期からその起源であるSPの血管内皮細胞で発現していることを明らかにした。また, Emcnの発現解析から, 肺血管系の還流路が, 静脈洞や主静脈などの体循環静脈系と, 肺静脈原基を介して心臓に戻る循環系より成ることを, 3次的に初めて画像化し, これらの時空間的变化を明らかにした。この結果がAPVRなどの肺静脈形成異常の病因の解剖学的理解を深める新たな知見を提供し, 今後の肺静脈形成に関わる組織学的解析に貢献する研究である。

### 試験・試問の結果の要旨

本研究が肺動脈還流異常に具体的にどのように結びついていくかについて試問を行い, 適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考え。また, 学位論文の作成にあたって, 剽窃・盗作等の研究不正は無いことを確認した。

### 参考論文

- 1) 肺循環の成り立ちと肺静脈形成の分子機構 (阿部志津香, 他2名と共著) 岩手医学雑誌, 2021年 掲載予定
- 2) 胃内ポリ塩化ビニル手袋変性塊を回復除去した精神遅滞児 (高橋学, 他7名と共著) 岩手医学雑誌, 73巻, 4号