

マウス初期胚の眼球形成領域の血管形成

清野太郎^{1), 2)}, 木村英二¹⁾,
村嶋亜紀¹⁾, 黒坂大次郎²⁾

¹⁾ 岩手医科大学, 解剖学講座人体発生学分野

²⁾ 岩手医科大学医学部, 眼科学講座

(Received on January 23, 2017 & Accepted on February 20, 2017)

要旨

マウス胚子における眼の血管発生についての報告は散見されるが, 初期発生段階における報告は少ない. 本研究ではマウス初期胚の眼球形成領域を中心とする頭部の血管形成について, whole-mount 蛍光免疫染色により血管内皮細胞を可視化し, その走行を詳細に解析した. 結果, 頭部血管系発生の初期過程を4次元的に可視化することに成功し, さらに, その過程は大きく4つのステージからなることが分かった. すなわち, 眼胞形成領域の表面を覆う血管

系が, 眼杯形成と硝子体血管系に先んじて形成され, これらは原始内頸動脈基部および頭側部, 原始上顎動脈, 原始嗅動脈と連続し, 眼胞形成が進むに従いその表面を立体的に覆うように伸展することが明らかとなった. さらにこれらの血管形成には, 背・腹大動脈の脈管形成とは独立した血管床が寄与している可能性が示唆された. 以上の結果は眼の血管形成メカニズムを解明する上で有用な基盤情報となる.

Key words : *ocular vasculature, mouse, primary vascular morphogenesis, annular vessels, CUBIC*

I. 緒 言

眼の血管系が正常に形成され機能することで, 視機能は維持される¹⁾. 血管系の異常が関与する眼科疾患は数多く, 糖尿病網膜症, 高血圧性網膜症や網膜動静脈閉塞症などがその代表例として知られている. また血管発生過程の異常が原因として考えられる疾患として第一次硝子体過形成遺残, 家族性滲出性硝子体網膜症, 小眼球症や未熟児網膜症が挙げられる^{2,7)}. これらの疾患群ではすでにいくつかの原因遺伝子が報告されているものも含まれるが^{8,9)}, 病態の理解をさらに深め, 新たな治療方法を確立するためには初期を含めた血管発生過程を正確に理解する必要がある.

ヒト成体の眼においては, 内頸動脈から眼動脈が分岐後, 眼窩内でさらに網膜中心動脈と毛様動脈が分岐し, これらの2つの血管系によって眼の血行動態は支配されている. Padgett は, 胎児眼球の連続切片を各発生段階で作成し, それらを3次元的に再構築することで初期の眼を含む頭部血管形成過程を報告している^{10, 11)}. すなわち, 胎生 28 日前後で, 第2と第3の大動脈弓が形成されると共に, 第1大動脈弓が消退するが, その時, 内頸動脈と連絡する背側・腹側原始眼動脈が観察され, その後, 背側原始眼動脈から硝子体動脈や耳側毛様動脈が分岐する. また腹側眼動脈からは鼻側毛様動脈が分岐する. 硝子体動脈は眼胞の胎生裂を通して第一次硝子体中に進入し硝子体固有血管板を形成するが, 硝子体動脈はその後消退し, 網膜中心動脈が形成される. アブミ骨動脈からの血液供給

Corresponding author: Taro Seino
t.seino1008@gmail.com

は眼窩領域で一過性に認めるがやがて退縮するため、直接眼球へ向かう経路はヒトでは認められない。

一方で、モデル生物として頻繁に使用されるマウスの眼の血管発生については涌沢の報告がある¹²⁾。涌沢は、交尾後9.5日から14.5日の胚子を取り出し、発生段階ごとに墨汁又はベルリン青水溶液を注入（浦の方法¹³⁾）した標本を作成した。ホルマリン固定後ブロック切片を作成し、動静脈を色分けして記載した。マウスでは、9.5日胚子で第1大動脈弓は消退しつつあり、内頸動脈から二条の内眼動脈が分岐して、これらが硝子体動脈や毛様動脈に血流を供給する。発生が進むにつれて内眼動脈は徐々に退縮していき、代わりに第2大動脈弓由来のアブミ骨動脈からの外眼動脈が血液を供給するようになる。またこの頃ヒト、マウスともに眼球を覆う血管網が形成されることが示されている。以上よりヒトとマウスでは最終的な眼動脈の分岐する元は異なるが、その初期形成過程は非常に類似していることがわかる。しかしながら、彼らの報告は色素注入法、あるいは連続切片の再構築法によるものであり、血管の管腔が形成された段階以降での血管形成過程を対象としており、管腔形成以前の内皮細胞の挙動については解析できていない。

小型魚類であるゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は、胚子が透明で胎外発生し、遺伝子操作も容易で世代間隔も短いため、近年疾患モデルとして、また初期発生過程の研究のためのモデル生物として確固たる地位を築いている。血管系の形成に関しては、蛍光色素による血管造影法を用いた詳細な発生アトラスが報告され¹⁴⁾、さらに血管内皮細胞で特異的に蛍光を発する遺伝子組み換えゼブラフィッシュと二光子顕微鏡を組み合わせたタイムラプス・イメージング解析から、脳血管の形成過程や¹⁵⁾、脊髄を栄養する血管系の形成過程¹⁶⁾、脳脊髄血管系の連結過程が明らかになっている¹⁷⁾。また頭部血管

形成のごく初期に発生する2つの血管床からの血管新生により、眼を支配する動脈系と静脈系の形成が行われることも報告されている¹⁸⁻²⁰⁾。

ゼブラフィッシュでは、その特性から頭部血管形成過程のごく初期から明らかとなっており、これは Padget や涌沢が報告したヒト、マウスの発生段階よりも早い時点での血管形成過程を含んでいる。血管系で特異的に緑色蛍光蛋白を発現する遺伝子組み換えマウスを用いた血管系の解析や、血管内皮細胞に対する蛍光免疫染色法による3次元解析を用いたマウスの血管系の解析に関してはすでにいくつかの報告があるが²¹⁻²⁵⁾、眼を栄養する血管のごく初期の血管形成過程に関しては、いまだ十分な解析が行われていない。そこで本研究では、哺乳類のモデル生物としてマウスを用いて、初期胚の頭部、特に眼球形成領域の血管系の形成過程を、血管内皮細胞に対する蛍光免疫染色法を用いて3次元解析した。また得られたマウスにおける所見と、ゼブラフィッシュにおいて報告された所見を比較、解析することで、眼を栄養する血管系の初期形成過程における脊椎動物間での相違性についても明らかにした。

II. 研究材料および方法

1. 研究倫理

本研究ではマウス胚子を用いた whole-mount 蛍光免疫染色を行った。動物実験は、岩手医科大学動物実験委員会の承認後（承認番号：26-026）、動物実験規定を遵守して実施した。

2. マウス胚子の取り出し

ICR の妊娠マウス（日本クレア、東京）を用いて、これまでの報告から血管形成が開始されると想定される 7.875 ~ 8.375 days post coitum (dpc) の間で胚子の取り出しを行った。取出しに際しては、イソフルランによる麻酔をかけた後、腹腔内から子宮を取り出し、リン酸緩衝液 (pH7.0-7.3) 内で羊膜を切除し、胚子周囲の膜性部の除去を行った。取り出した胚子は

ただちに固定液 (2% PFA) 中に移し 1 時間浸透固定した。固定後, メタノール系列で脱水し, 100% メタノール中に胚子を浸透させ, -25°C で保存した。

3. 蛍光免疫染色

血管内皮細胞と特異的に反応する一次抗体として, ラット抗マウス CD31 (PECAM-1) モノクローナル抗体 (MEC13.3; BD Pharmingen), またはウサギ抗 ETV2 モノクローナル抗体 [EPR5229 (3); abcam] を用い, 二次抗体としてペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (ab6845; abcam), または HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (ab6721; abcam) を用い, 免疫染色を行った。蛍光の発色には TSA Fluorescein Tyramide システム (SAT701001EA; パーキンエルマー) を用いた。胚子はメタノール系列で水和した後, 10% Triton-X 水溶液による浸透処理を施し, その後, 3% 過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼの失活を行った。ブロッキングした後, 一次抗体として抗 CD31 (PECAM-1) 抗体は 3 倍希釈 (抗体濃度 $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$), 抗 ETV-2 抗体は 2500 倍希釈 (抗体濃度 $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$) し 48 時間反応させ, 洗浄後, 二次抗体を, 抗 CD31 抗体との反応では 500 倍希釈, 抗 ETV-2 抗体との反応では 2500 倍希釈で使用し, 24 時間反応させた。二次抗体を洗浄後, TSA Fluorescein Tyramide システムにより蛍光シグナルを増幅させ, その後 CUBIC- II 液 26,27) に浸漬し, 遮光保存して十分な透明化が得られた後に観察した。

4. イメージングと 3 次元再構築による解析

CUBIC- II 液で透明化処理した標本を, 共焦点顕微鏡 (LSM 510; Zeiss) を用いて観察した。取得したイメージングデータから, 3 次元再構築ソフト (Amira; VSG) を用いて血管のつながりを立体的に解析し, 得られた画像をもとに各血管の同定を行った。

III. 結果

1. 頭部の血管系

発生初期における頭部の血管系の形成を, CD31 染色の胚子を用いて解析した。図 1 に 8.375 dpc 胚の頭部血管網を示す。第 1 大動脈弓と連絡する原始内頸動脈が頭側に向かい, 初めに原始上顎動脈 (Primitive maxillary artery; mxp) を分岐している。その後, 原始内頸動脈はさらに背側に走行し, 頭側部 (Cranial division of internal carotid artery; CrDI) と尾側部 (Caudal division of internal carotid artery; CaDI) に分岐する (図 1A, B)。原始内頸動脈の頭側部は, 鼻方へ向かい原始嗅動脈 (Olfactory artery primordium; olp) となる (図 2A)。これらの血管走行はこれまでのヒト, マウスでの報告と概ね一致していた^{10, 12)}。本研究では, マウス初期胚における眼を栄養する初期血管系が, 上記の血管系からどのように発生するのかを, 経時的に観察し, 硝子体血管系に先駆けて形成される眼球形成領域の外表面を覆う血管網の存在を発見した。そこで, この頭部表面血管系の発達に応じて, 4 つのステージ, ステージ 1: 血管形成の開始, ステージ 2: 血管の伸展と分岐, ステージ 3: 眼球形成領域周囲の冠状吻合, ステージ 4: 輪状血管網の形成, に分けることで, それぞれのステージにおける血管系の解剖学的構造を以下に詳細に解析した。

2. ステージ 1 (血管形成の開始)

8 日胚の前半 (Theiler stage 12) では, 前脳の神経板の背面に眼溝が形成されるが, その時期に合致して, 原始内頸動脈とその頭側部の末端である原始嗅動脈からの枝がそれぞれ, 眼球形成領域の外表面に分布する (図 2A 矢印)。すなわち, 第 1 大動脈弓と連絡する原始内頸動脈は, 原始上顎動脈を出した後, 頭頂方向へ向かう (図 2B)。その後, 原始内頸動脈は頭側部と尾側部を分岐し, 頭側部は鼻方に伸長し, 終脳腹側面で原始嗅動脈となる (図 2C)。さらに,

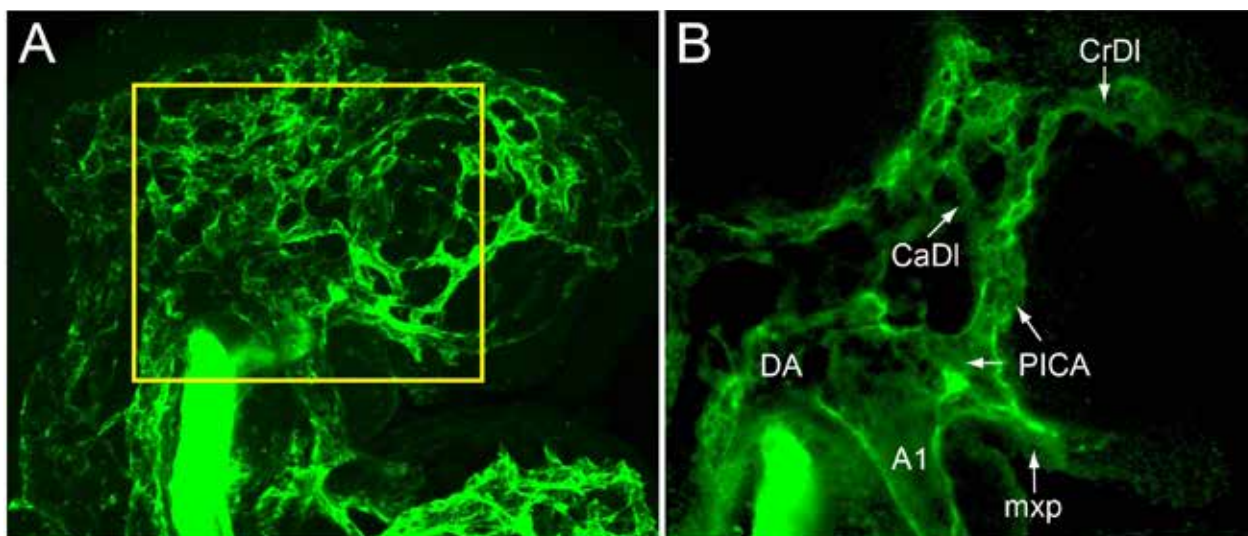


図1. 眼胞形成領域に分布する血管と第1大動脈弓 (交配後 8.375 日目胚子)

A: 頭部を中心とした血管分布 (右外側より観察). B: 第1大動脈弓と連絡する血管 (Aの黄色囲み部分の拡大像). 第1大動脈弓と原始内頸動脈と原始上顎動脈が連結し, 原始内頸動脈は背側に向かい頭側部, 尾側部に分岐する.

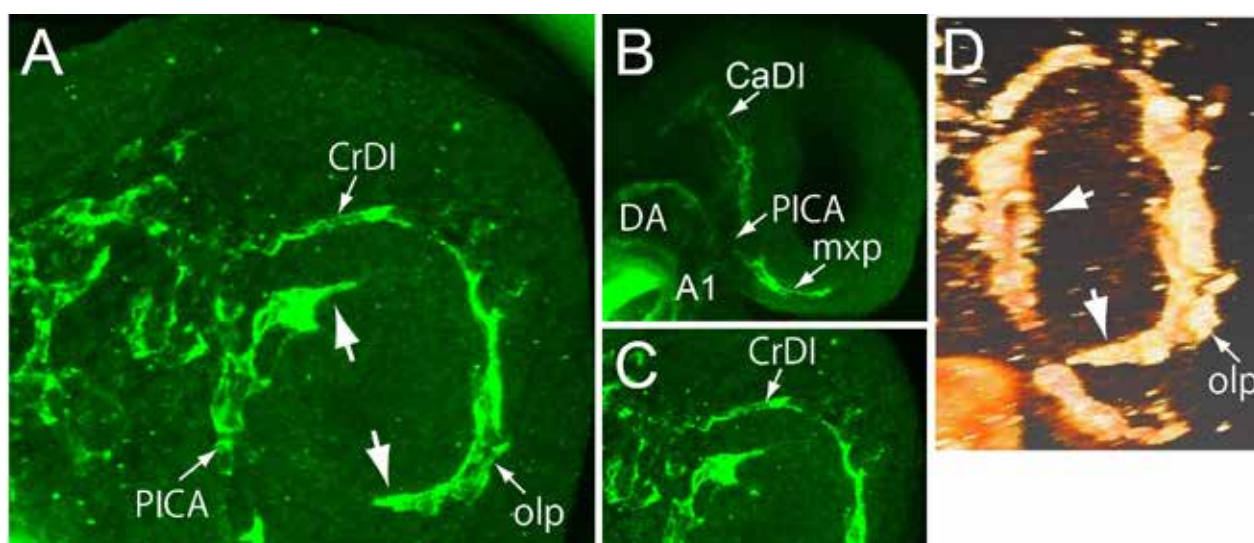


図2. 眼球形成領域の初期血管系; ステージ1

A: 頭部を中心とした血管分布 (右外側から観察). B: 第1大動脈弓と連絡する原始内頸動脈, 原始上顎動脈の走行. C: 原始内頸動脈, 原始嗅動脈から分岐する表面血管系の走行. D: 眼胞表面を取り囲む表面血管系の立体的な血管走行 (右外側上方からの観察). (矢印; 表面血管系)

付図において使用した血管解剖に関する略語集

A1: 1st aortic arch	第1大動脈弓
CaDI: Caudal division of internal carotid artery	内頸動脈尾側部
CrDI: Cranial division of internal carotid artery	内頸動脈頭側部
DA: Dorsal aorta	背側大動脈
mxp: Primitive maxillary artery	原始上顎動脈
olp: Olfactory artery primordium	原始嗅動脈
PICA: Primitive internal carotid artery	原始内頸動脈

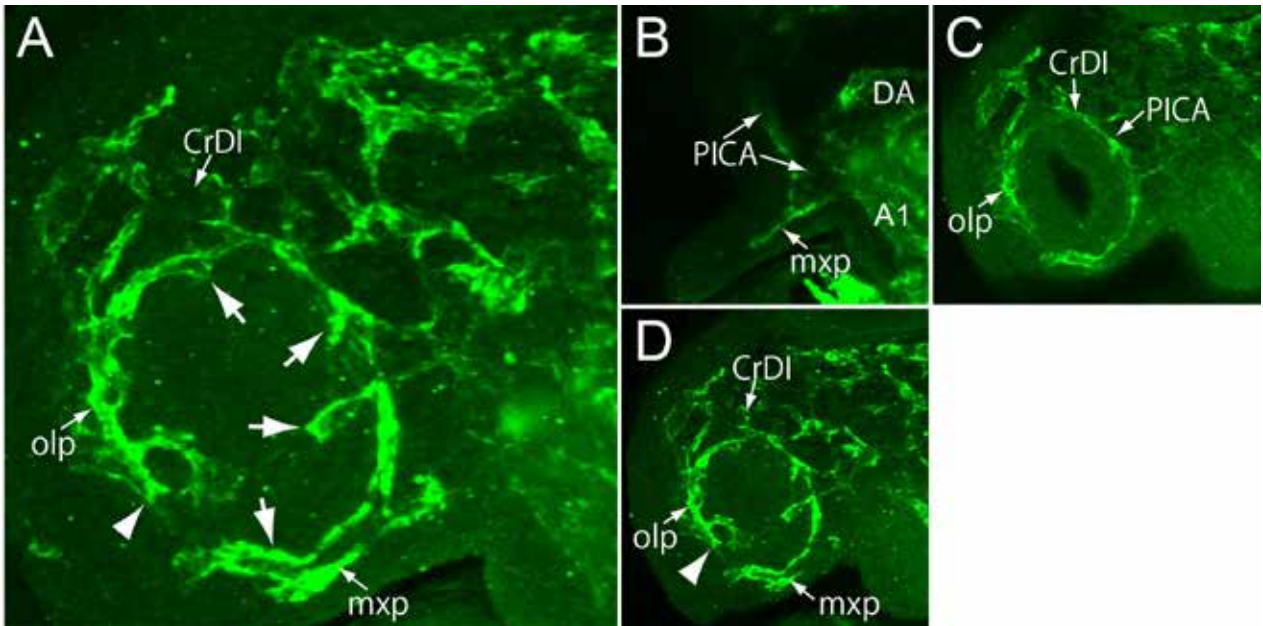


図 3. 眼球形成領域の初期血管系; ステージ 2

A: 頭部を中心とした血管分布(左外側から観察). B: 第 1 大動脈弓と連結する原始内頸動脈, 原始上顎動脈の走行. C: 原始内頸動脈, 内頸動脈頭側部, 原始嗅動脈, 原始上顎動脈からの表面血管系の分岐と内頸動脈から内頸動脈尾側部への分岐. D: 眼胞表面を取り囲む表面血管系の走行. (矢印; 表面血管系 矢頭; リング状を呈する表面血管系)

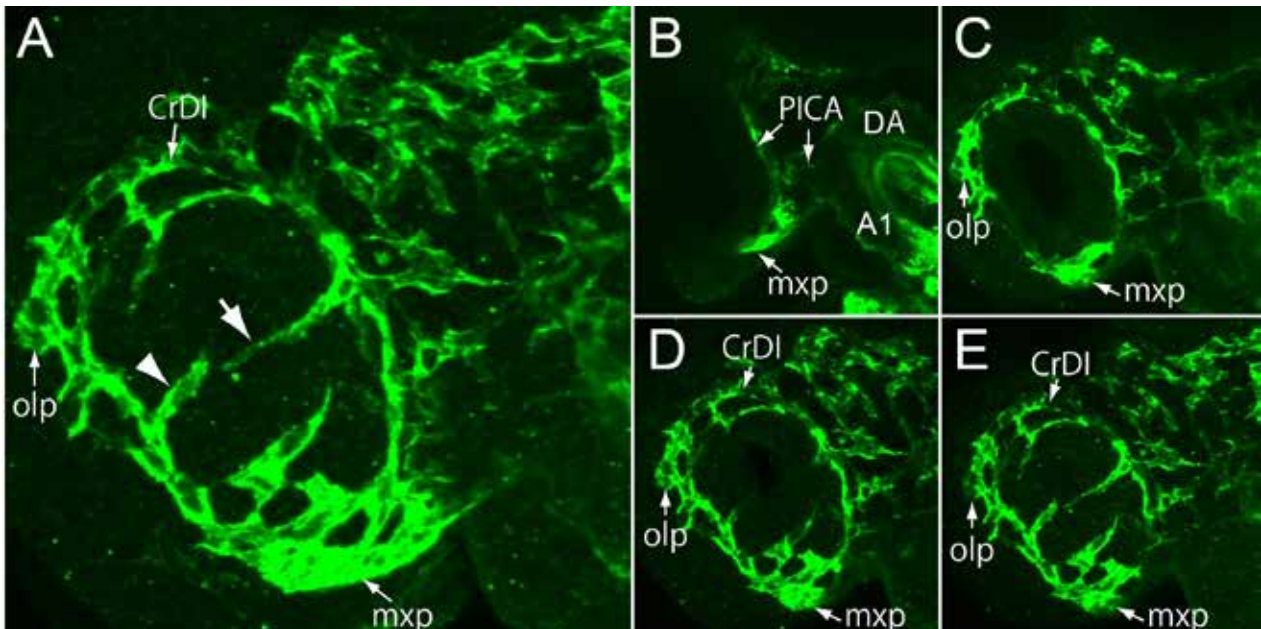


図 4. 眼球形成領域の初期血管系; ステージ 3

A: 頭部を中心とした血管分布(左外側から観察). B: 第 1 大動脈弓と連結する原始内頸動脈, 原始上顎動脈の走行. C: 内頸動脈頭側部, 原始嗅動脈, 原始上顎動脈からの表面血管系の分岐と原始内頸動脈から内頸動脈頭側部, 尾側部への分岐とそれらの伸展過程. D: 原始内頸動脈, 内頸動脈頭側部, 原始嗅動脈, 原始上顎動脈からの表面血管系の分岐. E: 眼胞表面を取り囲む表面血管系の走行. (矢印; 表面血管系 矢頭; リング状を呈する表面血管からの血管新生)

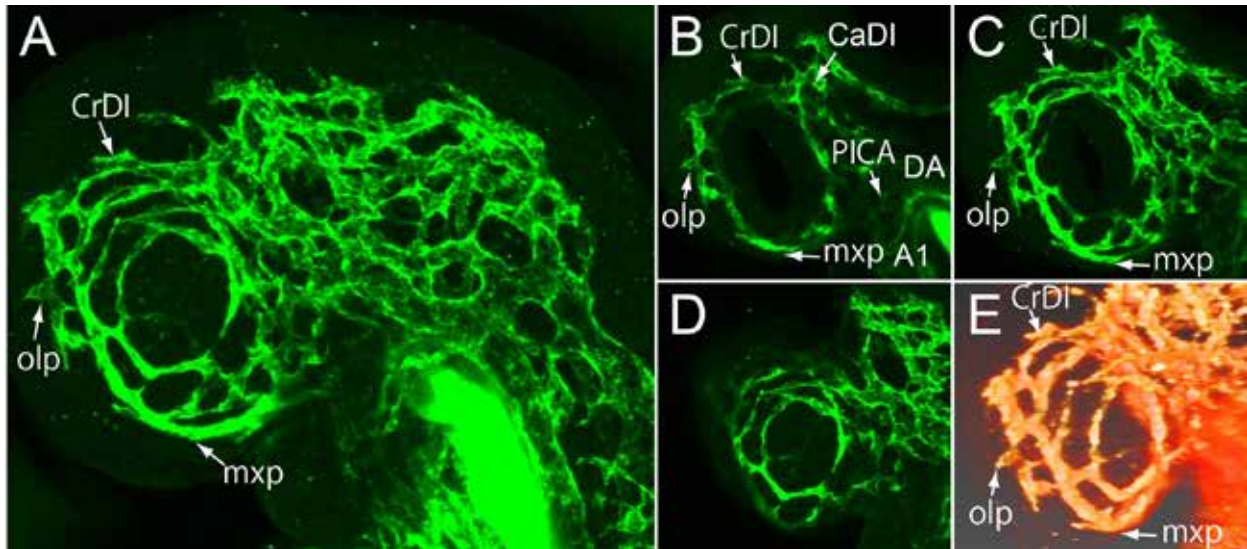


図5. 眼球形成領域の初期血管系; ステージ4

A: 頭部を中心とした血管走行の全体像 (左外側から観察). B: 内頸動脈頭側部, 原始嗅動脈, 原始上顎動脈からの表面血管系の分岐. C: 原始内頸動脈, 内頸動脈頭側部, 原始嗅動脈, 原始上顎動脈からの表面血管系の分岐. D: 眼胞表面を取り囲む表面血管系の走行. E: 眼胞表面を取り囲む表面血管系の立体的な血管走行 (左外側前方からの観察).

原始内頸動脈の基部から分岐する枝と, 原始嗅動脈から分岐する枝が, 眼球形成予定領域を取り囲むように伸展していくことが確認された. また3次元解析により, これらの血管は前脳の表面を外側に伸展していくことが確認された (図2D 矢印).

3. ステージ2 (血管の伸展と分岐)

ステージ2では, 原始内頸動脈, 内頸動脈の頭側部, 原始嗅動脈, 原始上顎動脈から, 眼球形成領域の表面中心に向けて血管新生が認められた (図3A 矢印). 各血管の位置関係を確認するために, 3次元データから該当領域を抽出し画像化したものを示す (図3B-D). ステージ1と比べて, 原始嗅動脈から分岐した血管は吻側にさらに伸長し, 終末部ではリング状を呈しており (図3A, D 矢頭), 原始上顎動脈の枝の間に吻合も認められる.

ステージ3 (眼球形成領域周囲の冠状吻合)

ステージ3では, ステージ2において眼球形成領域の外側を取り巻くように伸展した血管がそれぞれ吻合する (図4A 矢印). 3次元デー

タから該当領域を抽出し画像化し, その走行を確認した (図4B-E). 第1大動脈弓と連絡する原始内頸動脈から原始上顎動脈が分岐し (図4B), 原始内頸動脈はさらに頭側部から, 原始嗅動脈へと伸展している (図4C). 眼球形成領域の表面血管系の形成に関しても, ステージ2と同様に原始内頸動脈, 内頸動脈頭側部, 原始嗅動脈, 原始上顎動脈からの枝が確認された (図4D, E). これらの血管が眼球形成領域の周囲表面で吻合し (図4A 矢印), 冠状血管を形成していく過程が確認された. ステージ2でリング状を呈していた原始嗅動脈と原始上顎動脈の吻合部辺りからも新たな血管新生が始まっていることが観察された (図4A 矢頭).

4. ステージ4 (輪状血管網の形成)

ステージ4は, 8日胚後半 (Theiler stage 13) にあたり, 眼胞形成が確認される. 眼球形成領域の表面における血管網がさらに分岐を出しながら発達し, 眼胞を中心に同心円状に血管網が発達する (図5A). 3次元データから該当領域を抽出し画像化し, 各血管の走行を観察し

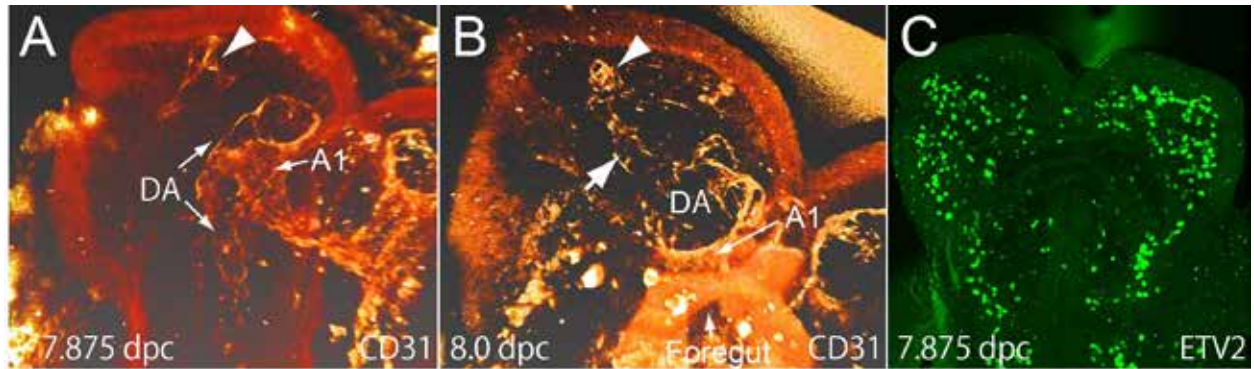


図6. 大動脈の脈管形成から独立した頭部血管系に寄与する血管床

A: 背側大動脈および第1大動脈弓と連続性をもたない独立した血管内皮細胞（腹外側から観察）。B: 頭部の血管内皮細胞と大動脈をつなぐ原始内頸動脈（腹外側から観察）。C: ETV2を用いたマウス初期胚の頭部における血管芽細胞の分布。A 矢頭；頭部血管床 B 矢印；頭部血管床と大動脈との間の連結部位。

た（図5B-D）。内頸動脈の頭側部から伸展した原始嗅動脈は、表面血管系を介し原始上頸動脈と吻合している（図5B）。それぞれの血管は分岐を出しつつ吻合し、複数の同心円状の血管網を形成した（図5C, D）。これらの眼胞表面の血管は、同心円状に吻合し、眼胞表面を覆って発達している（図5E）。

5. 頭部血管系を構築する独立した血管床

8日胚の眼球形成領域の内皮細胞の起源を明らかにするために、原始内頸動脈が形成される以前の、より早い段階の胚子（7.875 dpc）（Theiler stage 12 初期）のCD31染色標本を用いて観察した。その結果、第1大動脈弓との連続性を持たない独立した血管内皮細胞集団が予定頭部領域吻側に確認された（図6A 矢頭）。発生が進むにつれて、この独立した血管内皮細胞集団と第1大動脈弓との間に吻合が形成された（図6B 矢印）。3次元再構築画像の解析により、このCD31陽性細胞は眼球形成領域の外背側を中心に分布しており、将来の原始内頸動脈の頭側部、尾側部の分岐部にあたることを確認された。マウスの発生過程において9.5dpc胚子までその発現が確認されており、血管芽細胞マーカーとして知られるETV-228,29を用いた免疫染色では、この時期の頭部で、前脳の外側

表面にETV-2陽性細胞が広汎に散在することが確認された（図6C）。以上の結果から眼を栄養する血管の内皮細胞は大動脈からすべて供給されているわけではなく、頭部の独立した血管床からも一部供給されている可能性が示唆された。

IV. 考 察

本研究では、マウスの眼球の初期血管発生過程について、蛍光免疫染色し、透明化したマウス胚子を観察することで詳細に明らかにした。マウスの眼の血管発生については過去に涌沢の報告があるが¹²⁾、これは色素注入法を用いたものであり、管腔が形成された後の9.5日（Theiler stage 15）以降の胚子の観察となるため、最も初期の眼球形成領域の血管発生についての記載はない。またWallsらは我々と同様に、CD31免疫染色標本を用いて、光投射型断層撮影イメージング技術により、マウス胚子の全身血管発生のアトラスを報告しているが³⁰⁾、眼球形成領域の血管形成とその起源という点に関しては十分な解析が行われていない。我々はマウスの眼球形成領域の初期血管発生過程を、whole-mount 蛍光免疫染色法を用いて血管内皮細胞を特異的に染色し、それを共焦点顕

微鏡にて撮影することで詳細に解析した。また得られたデジタルデータを用いて3次元再構築法を併用することで、対象を自由に回転、拡大等することが可能となり、血管の走行をより詳細に観察することが可能となった。マウスの眼球形成領域の表面血管系に関して、涌沢の報告によると、原始上顎動脈、内頸動脈頭側部、原始内頸動脈基部から起こり、眼胞周囲に血管網が分岐すると記載がある¹²⁾。一方ヒトの眼に関して、初期には原始上顎動脈、内頸動脈頭側部、原始内頸動脈基部から数条の枝が眼胞に達するとPadgettにより報告されている¹⁰⁾。これらの報告から示される表面血管系の起源は、今回得られた結果とほぼ同じであった。一方、我々は、表面血管系が伸展を開始する段階からその過程をより詳細に観察し明らかにした。結果に示したように、我々はこの過程を4つのステージに分類した。ステージが進むにつれ、伸展した表面血管系は眼胞中央へ向かい、それぞれ分枝を出しながら伸展していく過程や、表面血管系同士の間で吻合し、リング状に眼胞表面を覆う過程が段階的に観察された。すなわち、眼胞表面の血管系は、原始内頸動脈から分岐した血管それぞれから血管新生が起こり、それらが吻合することで眼胞表面を覆う血管系を形成する。

眼球の血管系としては、眼球の表面を覆う血管系と硝子体血管系の2つの系がその初期に存在することが知られている。硝子体血管系に関しては、ヒトでは背側原始眼動脈から分岐した原始硝子体動脈が眼杯裂を通り、第一次硝子体中に侵入するのが始まりであることが報告されている¹⁰⁾。一方マウスでは、10日6時間の胚子において、眼杯表面を覆う血管網は消退しつつ、眼杯の翻転縁に沿う輪状血管が明瞭となり、その輪の腹側から眼杯裂内に突出する血管芽が形成され、これが硝子体動脈の原基になると涌沢は報告している¹²⁾。すなわち表面血管系は、マウスでは硝子体血管系に先んじて形成される。今回の我々の解析では、観察した胚

子の段階は、硝子体血管系が形成される以前のものであり、眼杯裂内に侵入する血管の存在は確認できなかった。今後さらに後半のステージの解析をすすめ、表面血管系のみならず硝子体血管系の伸展の様子を観察し、表面血管系との関係性を解析していく必要がある。一方ゼブラフィッシュでは、眼の血管は硝子体血管系と毛様血管系の2つの血管系から成り立ち、毛様血管系の形成に先んじて硝子体血管系が形成されることが明らかになっている。硝子体血管系はoptic arteryとoptic veinから成り、発生が進むにつれ両者は吻合し、眼胞内で硝子体動脈の血管叢を形成する。一方毛様体血管系は表面血管系と脈絡膜血管叢から成る。静脈系の血管床である原始中脳静脈管 (primordial midbrain channel) から分岐した背側毛様静脈 (dorsal ciliary vein) が伸長するとともに、さらに眼球表面で嘴側へ向きを変えて内頸動脈頭側部と原始中脳静脈管の吻合部近傍に達し、鼻側毛様動脈 (nasal ciliary artery) となる (橋浦, 木村ら投稿中)。この際に静脈由来の内皮細胞がNotch 遺伝子の活性により動脈化することが報告されている²⁰⁾。また、同時期に原始中脳静脈管から枝が伸展し脈絡膜血管叢を形成する。これらの報告から、ゼブラフィッシュでは、眼の血管を構成する脈管の起源や発生時期が哺乳類とは異なることが明らかとなった。またマウスでは、表面血管系を構成する内皮細胞は動脈由来であり、静脈系の血管床から脈絡膜血管叢を含む表面血管系が形成されるゼブラフィッシュとは由来が異なっていることが示唆された。眼球の血管系の形成過程における魚類と哺乳類との間のこれらの相違性がいかにして生じているのか、その形成・分化メカニズムを含めて今後さらなる解析を進めていく必要がある。

頭部全般の血管系を構成する内皮細胞の起源に関して、第1大動脈弓から分岐する原始内頸動脈や三叉神経動脈がその起源としてこれまで想定されてきた³¹⁾。今回の我々の解析では、眼

球形成領域の表面血管系の構築に、原始内頸動脈由来の血管系が、主に寄与していることが確認できた。一方、ゼブラフィッシュを用いた解析では、頭部に動脈性・静脈性の独立した血管床がそれぞれ存在することが報告されており¹⁵⁾、哺乳類においてこれらの頭部血管床の存在の有無を検証することは非常に興味深い。今回我々は、原始内頸動脈の形成以前に、CD31陽性細胞が眼胞形成領域の外背側を中心に分布していることを確認したが、それらは将来の原始内頸動脈の頭側部と尾側部の基部に一致している。また、同時期の脳胞の外側表面に、ETV-2陽性の細胞（血管芽細胞）が広汎に散在していることも明らかとなり、このことから、第1大動脈弓由来の血管とは独立した頭部の血管床が哺乳類において存在している可能性が示唆された。今後、より詳細な解析のため動脈、静脈マーカーを用いた染色や、遺伝子組み換えマウス胚のライブイメージング法などを用いることでこれらの血管床の存在をより詳細に解析する必要がある。

本研究では、マウス胚子の眼球形成領域の初期血管系の形成過程を形態学的に解析し、初めてその詳細を明らかにした。また眼の血管形成における、魚類と哺乳類の相違性についても明らかにするとともに、頭部の独立した血管形成の可能性を示した。今後はより詳細に頭部における独立した血管床の存在を検証するとともに、その分化・形成メカニズムについて解析を行っていく。本研究で得られた知見は、眼の血管発生異常を原因とする病態の理解をさらに深め、新たな治療方法を確立するための有用な基盤情報を与える。

稿を終えるにあたり御指導、御協力を賜りました岩手医科大学解剖学講座人体発生学分野の人見次郎教授、及川里百合研究補助員、菊池恵子事務員に深く感謝致します。動物実験にあたりましては御指導、御協力賜りました岩手医科大学医歯薬総合研究所動物実験センターの技術員諸兄に深く感謝いたします。

利益相反：著者には開示すべき利益相反はない。

References

- 1) **Fruttiger M**: Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* **10**, 77-88, 2007.
- 2) **Shastri BS**: Persistent hyperplastic primary vitreous: congenital malformation of the eye. *Clin Exp Ophthalmol* **37**, 884-890, 2009.
- 3) **Sizmaz S, Yonekawa Y and Trese MT**: Familial Exudative Vitreoretinopathy. *Turk J Ophthalmol* **45**, 164-168, 2015.
- 4) **Gilmour DF**: Familial exudative vitreoretinopathy and related retinopathies. *Eye (Lond)* **29**, 1-14, 2015.
- 5) **Gupta A, Srinivasan R, Pandian DG, et al.**: Lenz microphthalmic syndrome in an indian patient. *Indian J Ophthalmol* **55**, 462-463, 2007.
- 6) **Shah PK, Prabhu V, Karandikar SS, et al.**: Retinopathy of prematurity: past, present and future. *World J Clin Pediatr* **5**, 35-46, 2016.
- 7) **Saint-Geniez M and D'Amore PA**: Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int J Dev Biol* **48**, 1045-1058, 2004.
- 8) **Chaney S, McLoone E and Willoughby CE**: A mutation in Norrie disease gene (NDP) associated with familial exudative vitreoretinopathy. *Eye (Lond)* **25**, 1658-1668, 2011.
- 9) **Collin RW, Nikopoulos K, Dona M, et al.**: ZNF408 is mutated in familial exudative vitreoretinopathy and is crucial for the development of zebrafish retinal vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 9856-9861, 2013.
- 10) **Padgett DH**: The development of the Cranial Arteries in the human embryo. *Contributions to embryology vol.212*, Carnegie Inst, Washington, 1948.
- 11) **Padgett DH**: The development of the Cranial Venous System in man, from the viewpoint of comparative anatomy. *Contributions to embryology Vol. 247*, Carnegie Inst, Washington, 1957.
- 12) **Wakusawa S**: The development of the arterial system of the mouse's eye. *日眼会誌* **72**, 231-256, 1968.
- 13) 浦 良治：頭の血管の発生について。 *岩手医誌* **20**,

- 619-623, 1969.
- 14) **Isogai S, Horiguchi M and Weinstein BM:** The vascular anatomy of the developing zebra fish: an atlas of embryonic and early larval development. *Dev Biol* **230**, 278-301, 2001.
 - 15) **Proulx K, Lu A and Sumanas S:** Cranial vasculature in zebrafish forms by angioblast cluster-derived angiogenesis. *Dev Biol* **348**, 34-46, 2010.
 - 16) **Isogai S, Lawson ND, Torrealday S, et al.:** Angiogenic network formation in the developing vertebrate trunk. *Development* **130**, 5281-5290, 2003.
 - 17) **Kimura E, Isogai S and Hitomi J:** Integration of vascular systems between the brain and spinal cord in zebrafish. *Dev Biol* **406**, 40-51, 2015.
 - 18) **Gore AV, Monzo K, Cha YR, et al.:** Vascular development in the zebrafish. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006688, 2012.
 - 19) **Hartsock A, Lee C, Arnold V, et al.:** In vivo analysis of hyaloid vasculature morphogenesis in zebrafish: A role for the lens in maturation and maintenance of the hyaloid. *Dev Biol* **394**, 327-339, 2014.
 - 20) **Kaufman R, Weiss O, Sebbagh M, et al.:** Development and origins of zebrafish ocular vasculature. *BMC Dev Biol* **15**, 18, 2015.
 - 21) **Yokomizo T, Yamada-Inagawa T, Yzaguirre AD, et al.:** Whole-mount three-dimensional imaging of internally localized immunostained cells within mouse embryos. *Nat Protoc* **7**, 421-431, 2012.
 - 22) **Ishitobi H, Matsumoto K, Azami T, et al.:** Flk-1-GFP BAC Tg mice: an animal model for the study of blood vessel development. *Exp Anim.* **59**, 615-622, 2010.
 - 23) **Yokomizo T, Ng CE, Osato M, et al.:** Three-dimensional imaging of whole midgestation murine embryos shown an intravascular localization for all hematopoietic clusters. *Blood* **117**, 6132-6134, 2011.
 - 24) **Yokomizo T and Dzierzak E:** Three-dimensional cartography of hematopoietic clusters in the vasculature of whole mouse embryos. *Development* **137**, 3651-3661, 2010.
 - 25) **Drake CJ and Fleming PA:** Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. *Blood* **95**, 1671-1679, 2000.
 - 26) **Susaki E, Tainaka K, Perrin D, et al.:** Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* **157**, 726-739, 2014.
 - 27) **Tainaka K, Kubota S, Suyama T, et al.:** Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. *Cell* **159**, 911-924, 2014.
 - 28) **Lee D, Park C, Lee H, et al.:** ER71 acts down stream of BMP, Notch, and Wnt signaling in blood vessel progenitor specification. *Cell stem cell* **2**, 497-507, 2008.
 - 29) **Koyano-Nagasawa N, Kweon J, Iacovino M, et al.:** Etv2 is expressed in the yolk sac hematopoietic and endothelial progenitors and regulates Lmo2 gene expression. *Stem Cells* **30**, 1611-1623, 2012.
 - 30) **Walls JR, Coultas L, Rossant J, et al.:** Three-dimensional analysis of vascular development in the mouse embryo. *PLoS One* **3**, e2853, 2008.
 - 31) **Evans HM:** The development of the vascular system. In "Manual of human embryology", eds by Keibel F, Mall FP, pp. 570-709, J B Lippincott company, Philadelphia, USA, 1912.

Development of primary vasculature of the eye in the mouse embryo

Taro SEINO^{1),2)}, Eiji KIMURA¹⁾,
Aki MURASHIMA¹⁾ and Daijiro KUROSAKA²⁾

¹⁾Division of Human Embryology, Department of Anatomy,
School of Medicine, Iwate Medical University, Yahaba, Japan

²⁾Department of Ophthalmology, School of Medicine,
Iwate Medical University, Morioka, Japan

(Received on January 23, 2017 & Accepted on February 20, 2017)

Abstract

Attempts have been made to clarify the development of primary ocular vasculature in mammals. However, the details remain unclear. In this study, we examined the stepwise process of the development of the primary ocular vasculature using whole-mount immunostaining with PECAM-1 (CD31) antibodies, which enabled us to visualize endothelial cells in mouse embryos. We succeeded in capturing images of primary ocular vasculature development, and classified this process into four stages. In mouse embryos, the vascular plexus surrounding the ocular surface develops first, prior to the hyaloid

vascular system, and originates from the base of the primitive internal carotid artery, cranial division of the internal carotid artery, primitive maxillary artery, and olfactory artery primordium, respectively. As ontogeny progresses, angiogenesis from these vessels extends to the surface of the ocular vesicle and sterically covers it. We also succeeded in demonstrating the arterial cranial angioblast cluster, which is independent of the dorsal aorta and contributes to cranial vasculature development. These detailed morphological data will help to elucidate the mechanism of ocular vasculature development.
