

## 論文内容の要旨

Live imaging of primary ocular vasculature formation in zebrafish  
(ゼブラフィッシュの眼を支配する初期血管系の形成過程のライブイメージング)  
(橋浦 哲哉, 木村 英二, 藤澤 志津子, 及川 里百合, 野中 茂紀, 黒坂 大次郎, 人見 次郎)  
(PLOS ONE 平成 29 年 4 月掲載)

## I. 研究目的

初期の血管系が個体内でいかにして形成されるのか, 連続切片の再構築や色素の血管注入法による数多くの報告がヒト胎児やニワトリ胚などを用いて成されてきた (Padgett DH. *Contrib Embryol* 1948; Sabin F.R. *Contrib Embryol* 1917). しかしこれらの手法では, 同一の個体を連続して観察することができず, 血管系がどこからどのようにして形成されるのか, 十分明らかになってない. 小型魚類のゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は, 透明で子宮外発生するため初期の発生過程を顕微鏡下で連続して観察できる. 本研究では, 血管系で特異的に蛍光タンパク質を発現する遺伝子組み換えゼブラフィッシュ胚を, 二光子顕微鏡でタイムラプス解析し, 初期の眼を支配する血管系がいかにして形成されるのか, 形態学的に明らかにした.

## II. 研究対象ならび方法

- 1) 血管系で特異的に緑色蛍光蛋白質 (EGFP) を発現する遺伝子組み換えゼブラフィッシュを, 二光子顕微鏡で生きたまま連続してタイムラプス撮影し, 眼を支配する血管系の初期形成過程の詳細を記録した.
- 2) 樹脂包埋した発生過程のゼブラフィッシュ胚を用いて連続切片標本を作製し, 光学顕微鏡を用いて観察・撮影した. 取得した連続画像を, 3次元再構築ソフトの Amira を用いて再構築し, 血管系と周囲組織 (眼胞) との位置関係を解析した.
- 3) 眼を支配する動静脈の発生母地における動静脈分化の過程を, 動脈のマーカー遺伝子として *hey2* を, 静脈のマーカー遺伝子として *flt4* を用いて, *in situ* hybridization 法を用いて観察した.

### III. 研究結果

我々は、まず眼を支配する初期血管系の解剖学的構造を同定した。ゼブラフィッシュでは、2つの血管系が存在する。すなわち硝子体血管系は、optic artery (OA) と optic vein (OV) からなり、眼胞内で OA は網目状の hyaloid artery (HA) へとつながっている。毛様体血管系は、眼の表面を栄養する nasal ciliary artery (NCA) と dorsal ciliary vein (DCV)、眼球を包みこむ choroidal vascular plexus (CVP) により構成されている。ゼブラフィッシュの頭部血管系は、12 体節期に眼胞吻側の ROC(rostral organizing center)と、眼胞と耳胞の間に MOC(midbrain organizing center)から形成されることが既に報告されているが(Proulx et al., Dev Biol, 2010)、我々は *in situ* hybridization 法による解析から、ROC から脳の動脈性の血管床 (aCAC: arterial cerebral angioblast cluster) が分化し、一方 MOC からは脳の静脈性の血管床 (vCAC: venous cerebral angioblast cluster) が形成されることを明らかにした。そしてこれら2つの血管床からいかにして眼を支配する血管系が形成されるのかを、タイムラプス解析により明らかにした。まず aCAC から OA が、vCAC から OV が形成されて眼胞内で吻合する。OA は眼胞内で血管叢を形成し、HA となる。一方で vCAC からの枝が外側に伸展し、DCV が形成される。DCV は、水晶体の辺縁で吻側に伸びて NCA となる。これらの二つの血管系は、その後 OV が外側に変位することで吻合する。そして眼球を包むように CVP が形成され、眼を支配する初期の血管系が完成する。また、眼球周囲の連続切片を3次元再構築し、血管の位置関係を解析したところ、OA と OV は眼裂から眼胞内に侵入し、その後 OA と OV の間で眼裂が閉鎖することで、OV のみが外側に変位し、一方、OA は視神経を貫くことが確認できた。

### IV. 結 語

ゼブラフィッシュの眼を初期血管系の形成過程を明らかにした。血管系が関与する先天性および後天性疾患による視覚障害を治療するうえで、初期の眼の血管形成過程を理解することは、その形態形成、あるいは病態メカニズムを解明する際に有用な基盤情報となる。

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授 齋野朝幸 (解剖学講座：細胞生物学分野)

副査 教授 増田友之 (病理学講座：機能病態学分野)

副査 講師 村井憲一 (眼科学講座)

血管系が関与する先天性、および後天性疾患による視覚障害を治療する上で、初期の眼の血管発生過程を理解することは、形態形成や病態メカニズムを考える上で有用な基盤情報となる。本研究はモデル動物としてゼブラフィッシュを用い、眼球の血管形成過程を明らかにすることを目的としている。これまでヒトやマウスなどの哺乳類を対象とした眼を栄養する血管系の初期形成過程に関しては、いずれも血液循環の開始以降で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、いまだに眼の初期血管形成に着目しその詳細を明らかにした報告は無かった。そこで本研究では、眼球形成領域の血管系の形成過程を、血管内皮細胞で特異的に蛍光を発現する遺伝子組み換え体を用いて3次元的に解析した。

結果、ゼブラフィッシュの眼を支配する初期の血管系は、4つの過程を経て形成される。すなわち、①. optic artery と optic vein が眼胞内で吻合して硝子体血管系が形成される、②. 眼球表面の血管系が形成される、③. ①と②の2つの系が統合される、④. 眼球周囲の血管網が形成され、脈絡膜血管叢ができる。初めて眼球形成領域の初期血管系の詳細を明らかにした貴重な論文である。

今回得られた結果は血管発生学に大きなインパクトを与えることが予想される。また眼の発生の詳細を知る上でも極めて重要な情報となるであろう。学位に値する研究である。

### 試験・試問の結果の要旨

本文の要旨についての質問に加え、実験に用いたゼブラフィッシュへの血管標識物質の意義、血管発生の解析手法および血管発生異常を伴う疾患に関する諮問を行い、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られる。

### 参考論文

- 1) 極小切開白内障手術における眼内レンズ電動挿入主義の違いによる切開創への影響 (橋浦哲哉, 他6名と共著). 日本白内障学会誌 28巻, 1号 (掲載年2016年): p89-92.
- 2) マルフアン症候群に伴う水晶体偏位術後20年して前房内に脱臼した Soemmering' s ring の1例 (小笠原 聡, 他5名と共著). 日本白内障学会誌 28巻, 1号 (掲載年2016年): p85-88.