

論文内容の要旨

マウス胚の頭部初期血管系の形成過程の形態学的解析

(齊藤美帆, 木村英二, 人見次郎)

(岩手医学雑誌 70 巻, 4 号 平成 30 年 10 月掲載)

I. 研究目的

頭部血管形成の過程として, 第一大動脈弓 (first aortic arch; AA) から伸長した原始内頸動脈が尾側への分枝血管を介して原始後脳血管路 (primordial hindbrain channel; PHBC) につながり, さらに, 背側大動脈 (dorsal aorta; DA) から派出した原始三叉神経動脈など, いくつかの脳神経に対応した動脈枝が PHBC と連絡して, 最も初期の脳血液循環路が確立するとされている. 同時に, これらの血管が頭部の血管網を形成する内皮細胞を供給すると考えられてきた. しかしながら, 原始後脳血管路と繋がる複数の動脈枝には, 種差があり, 供給母体としての普遍性に欠けていることも指摘されている. また, 小型魚類のゼブラフィッシュでは, 伸長する原始内頸動脈から離れて, その吻側に, 頭部血管系の発生母地となる独立した血管床の存在が認められている. そこで, 本研究では, 哺乳類のモデル生物として, マウスの胚の頭部初期血管系の発生過程を明らかにすることを目的とした. また解析では, 最も初期の発生過程の血管内皮細胞のマーカーとして認知される PECAM-1 (CD31) の発現に着目し, この細胞群を可視化することで, 形態学的に初期の頭部血管形成過程を明らかにした.

II. 研究対象ならび方法

血管形成が始まると想定される交尾後 7.5~8.5 日目 (days post coitum; dpc) のマウス胚を対象とした. ICR 妊娠マウスを麻酔後, 緩衝液中で胚を脱落膜ごと摘出し, 脱落膜に割を入れたのち, 室温で 1~2 時間, 2%PFA (paraformaldehyde) もしくはクエン酸・亜鉛溶液で固定した. その後メタノール系列による脱水処理を行い, 亜鉛固定した標本は, 切片作成用に親水処理後パラフィンに包埋し, PFA 固定した標本は, ホールマウント蛍光免疫染色用に 100%メタノール液中で保存 (-30°C) した.

次に血管網の観察のため, 血管内皮細胞のマーカー PECAM-1 を用いて, 連続パラフィン切片の DAB 発色による PECAM-1 染色を行うとともに, 胚のホールマウント蛍光免疫染色を行った. 連続切片は, 光学顕微鏡 (BX51; OLYMPUS, UPlanApo 10x/0.40) で観察・撮影 (DP72; OLYMPUS) した. ホールマウント染色した胚は CUBIC-II 液を用いて透明化処理を施した後,

共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510; Zeiss, Plan-Neofluar 10x/0.3) を用い観察, 撮影を行った. 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) を用いて血管のつながりを立体的に解析し, 胚子の初期血管網の全体像を確認した. 心臓形成と DA が形成される 8 dpc 前後の胚を対象に 55 個体を観察したが, その際, Theiler のステージ分類の 10 から 13 の記載に則って, 胚の成熟度を区別した.

III. 研究結果

1) 背側大動脈と第一大動脈弓

胚の連続切片の免疫染色では, PECAM-1 の陽性細胞の追跡により, 左右の DA は平行に, 脊索板のやや外側を, 前腸ポケットの背側の上皮の基底面に接して, 体軸の前後を走行しており, 心内膜筒と AA で連絡した後, さらにその前方の頭部中胚葉内を伸長し, 頭部の腹側及び外側の神経板の上皮の基底面に接していることが観察された.

2) 背側大動脈と頭端部神経板

ホールマウント標本でも, 心臓原基から心内膜筒への変化と AA の形成過程が観察されたが, いずれの標本も DA が AA を超えて伸長し, その先端部は大きく拡張するとともに, 神経板に接していることが確認できた. 同時に, DA の背側の外側後方には, 血管洞が観察され, 将来の原始後脳血管路と思われる血管が観察された.

3) 頭部の脈管形成

心臓形成と DA の形成との関係を確認するために, 心内膜筒が形成される以前の胚を観察した. 神経板の下面では心臓原基の細胞索が膨らんで, 馬蹄形に広がっている一方で, 頭端部の神経板の外側から正中部に沿って走行する血管洞が確認された. この血管洞と大動脈弓と連絡はなかった. AA と連絡が無く, 同時に DA との連絡のない血管洞は, ステージ 11 の他の個体でも確認され, ステージ 12 以降で確認できる背側大動脈や原始後脳血管路と区別するため, 「神経板頭端血管洞 anterior sinus of neural plate」と名付けた.

IV. 結語

これまで頭部の初期血管形成を担うのは, AA から伸長する原始内頸動脈と考えられていたが, 内頸動脈形成以前に, DA が, 鰓弓を超えて前脳領域まで一気に形成され, その先端部分が頭部血管網形成に深くかかわっている可能性が示唆された. さらに, 背側大動脈の先端部分となり, さらに, 頭部血管系の起点となる血管洞として, ステージ 11 で AA と DA とも連絡が無く, PECAM-1 陽性細胞から形成される「神経板頭端血管洞」の存在が想定された.

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 中隋 克己 (生理学講座統合生理学分野)

副査 教授 増田 友之 (病理学講座機能病態学分野)

副査 教授 佐藤 孝 (病理学講座機能病態学分野)

胚子の頭部血管系において、最も初期の血液循環路の形成過程と血管内皮細胞の供給母体については未だ不明な点が多い。本研究論文では、哺乳類頭における頭部初期血管系の発生過程の解明を目的として、マウス胚を用いて PECUM-1 (血管形成初期の内皮細胞マーカーの一つ) を発現する細胞を免疫組織学的に可視化し、PECUM-1 陽性細胞の胚子内分布様式を発生段階に対応させながら形態学的に解析した。交尾後 7.5~8.5 日のマウス胚では、内頸動脈が形成される以前に背側大動脈が頭部中胚葉内を頭端方向へと伸張して神経板に到達した。また心内膜筒が形成される以前に背側大動脈の頭端で神経板に並走する新たな血管路が確認され、神経板頭端血管洞と命名された。

本論文は哺乳類の発生初期における頭部血管形成過程の理解を一層深化させるもので、発生異常の病態解明や再生医療分野への応用に役立つ有益な知見を示した論文といえる。学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

実験対象となる胚子の発生段階の設定や血管内皮細胞マーカーの選択といった実験方法に関する点や、脳血管内皮細胞の起源や多元的な血管内皮細胞の供給母体といったデータ解釈・文献的考察に関する点について試問を行い、適切な回答を得た。学位に値する学識を有していると考ええる。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ないことを確認した。

参考論文

- 1) IL-13 及び β_2 アドレナリン受容体遺伝子多型が気管支喘息患者の肺機能へ及ぼす影響 (齋藤美帆 他 1 名と共著)
岩手医学雑誌, 66 巻, 5 号 (2014) : p179-184
- 2) Merkel 細胞癌術後の Carboplatin/Etoposide 併用療法中に著名な血小板減少を来し治療に難渋した 1 例 (齋藤美帆 他 14 名と共著)
癌と化学療法, 44 巻, 8 号 (2017) : p685-687.