

胚発生期の脊髄神経組織における血管の成り立ち

高橋 輝明

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 遺伝子発現制御講座

(別所 康全 教授)

平成 27 年 2 月 20 日提出

序論

血管は、体中に酸素や栄養素、老廃物を運搬する上で重要であり、この機能を果たすためには適切な血管ネットワークが形成されることが必要である。血管が適切な位置に配置されることを研究する血管パターンニングの研究は解剖学的な知見が古くから数多く知られるものの、その分子メカニズムの解析は近年多く見られるようになってきた。代表的な例が NIH の向山洋介博士によるマウス表皮における末梢神経と動脈の並走に関する研究である(Mukouyama et al., 2002)。これは末梢神経軸索のパターンによって動脈形成がなされるという報告である。またその反対に、表皮のような組織では、血管や神経の標的組織に依存してできるものであり、神経のパターンと血管のパターンが必ずしも一致してできるわけではないという報告もなされ(Oh and Gu, 2013a)、神経と血管がいかにして決まったパターンを形成するのかは非常に混沌としたものとなっている。

本研究では、脳や脊髄といった中枢神経組織における血管の形成過程を調べることにより、神経と血管の発生過程における相関性を明らかにすることを目的とする。

脳や脊髄といった中枢神経組織は、末梢組織に比べて、血管が密になっており、供給される酸素量やグルコースなど消費量が極めて高く、血管パターンの乱れは重篤な病につながる(Eichmann and Thomas, 2012; James and Mukouyama, 2011; Ma et al., 2013; Quaegebeur et al., 2011)。この研究では、特に中枢神経組織の中でも脊髄における血管走行ルートを知り、そのルートを規定するメカニズムを知ること（血管パターンニング）に焦点をあてる。本研究で脊髄に着目したことは、胚発生期の脊髄内の血管パターンニング研究は重要であるにも関わらず脳や網膜における研究に比べて少ない点と脊髄を容易に遺伝子操作する実験系が確立されている点が理由として挙げられる。また、モデル動物として脊髄に遺伝子操作しやすいトリ胚を用いた。

脊髄における血管形成

胚発生期の脳および脊髄における血管形成は、まず血管がこれらの中枢神経組織の周囲を取り巻く所から始まる（図 1）。この中枢神経組織を取り巻く血管は Peri-neural vascular plexus (PNVP) と呼ばれ、体節中胚葉に由来し、脈管形成（vasculogenesis）によって形成される。脈管形成は、血管内皮の前駆細胞（angioblast）が体内の適切な位置に移動した後に、原始血管叢（メッシュ状の

未熟な血管)を形成するプロセスである(Risau, 1997)。発生が進み、PNVP が中枢神経組織を取り巻き終わる頃になると、PNVP の一部が分岐し、組織内部への侵入が開始される。PNVP から脳および脊髄内部へと侵入した血管は Intra-neural vascular plexus (INVP) と呼ばれるようになる(Bautch and James, 2009; Eichmann and Thomas, 2012; James et al., 2009; James and Mukouyama, 2011; Kurz, 2009; Kurz et al., 1996; Ruhrberg and Bautch, 2013; Stenman et al., 2008)。PNVP から INVP に至る血管形成は、既存の血管内皮が分岐・伸長する血管新生 (angiogenesis) というプロセスである(James et al., 2009; Kurz et al., 1996)。

トリ胚の脊髄における INVP 形成はニワトリ胚で発生 4 日目頃、ウズラ胚で発生 3.5 日目頃から始まり、脊髄腹側の底板 (floor plate) の両脇にある PNVP から侵入してくる(James et al., 2009; Kurz et al., 1996)。脊髄内に侵入した INVP は発生が進むにつれて背側方向へと伸長していき、やがて脊髄側部 (表層部) の PNVP から分岐し、新たに侵入してきた INVP と融合することによって脊髄循環器の基礎をつくる。さらに発生が進むとこの INVP は血管リモデリングを繰り返し、より 3 次元的に複雑な血管網へと成長していく。本論文では、主に、脊髄腹側から最初に侵入してくる INVP の形成過程に焦点を当て、解析を進めた結果を報告する。

脊髄における神経層形成

脳と脊髄は生命機能を維持する上で必須な器官であり、その神経発生過程はよく調べられている。ここでは本研究に特に関わりのある層形成について記述する。脳、脊髄どちらの層形成も神経管と呼ばれる一層の神経上皮層から形成が始まる(Rowitch and Kriegstein, 2010; Sgaier et al., 2005)。神経上皮層は発生過程を経るに従って増殖と分化を繰り返し、分化した神経細胞 (ニューロン) が上皮基底膜側、つまり神経上皮内腔面と逆方向に移動することで新たな層 (本論文では分化神経層と呼ぶ) が形成されていく(Rowitch and Kriegstein, 2010)。脳および脊髄における層形成は初期の段階ではよく似ているように見えるが、発生過程が進むにつれてその複雑さは脳の構造の方が圧倒的に複雑なものになっていく(Dehay and Kennedy, 2007; Franco and Müller, 2013; Miyata et al., 2010)。

胚発生期の脊髄も発生が進めば進む程、複雑なものになっていくが、本研究では、脊髄内にはじめの INVP の侵入・伸長がみられる時期であるニワトリ胚発生 4 日目から 5 日目頃までを主な解析の対象とした。この時期は大きく分けて 3 種の分化状態の細胞層が存在する(Roztocil et al., 1997; Xie et al., 2011)。(1) 増殖期にある神経前駆細胞が存在する Ventricular zone (VZ: 本研究では神経前駆細胞層と呼ぶ)、(2) 神経前駆細胞から分化した神経 (ニューロン) へと移行

する途中段階の細胞が存在する Intermediate zone (IZ) および (3) ニューロンが存在する Mantle zone (MZ、分化神経層) である。ちなみに、この層構造はマウスにおいてもみられる (Gui et al., 2007; Misra et al., 2008)。本論文では脊髄腹側から最初に侵入してくる INVp が神経前駆細胞層と分化神経層の間の領域 (厳密には Intermediate zone の分化神経層側) を通る決まった走行ルートもつことを示し、さらに神経前駆細胞層が血管非形成領域となっており、神経前駆細胞層が INVp の走行ルート規定に必要であることを示した結果を報告する。

中枢神経組織の血管形成に関わる分子

血管形成に関わる分子の中でも最も重要で、知見が豊富なのが、血管内皮成長因子 Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A、本論文中では VEGF と略記する) である (Carmeliet et al., 1996; Chauvet et al., 2013; Ferrara and Alitalo, 1999; Mackenzie and Ruhrberg, 2012; Quaegebeur et al., 2011; Risau, 1997; Ruhrberg and Bautch, 2013; Yancopoulos et al., 2000)。VEGF は血管内皮細胞に発現するチロシンキナーゼ型受容体の Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) に結合することによって、細胞増殖や遊走、分化といった多岐にわたる役割を発揮することが知られている (Adams and Alitalo, 2007; Eichmann et al., 2005; Eilken and Adams, 2010; Gerhardt et al., 2003; Geudens and Gerhardt, 2011; James and Mukoyama, 2011; Phng and Gerhardt, 2009)。VEGF の null ノックアウトマウスは中枢神経組織の血管形成が起きる前に致死となるため、中枢神経組織における VEGF の役割は、Nestin-cre driver による VEGF コンディショナルノックアウトマウスや VEGF のアイソフォームを欠損させたミュータントマウスなどから、その重要性が明らかにされてきた (Haigh et al., 2003; Ruhrberg et al., 2002)。Nestin Cre driver による VEGF コンディショナルノックアウトマウスでは、前脳や脊髄において組織内に侵入する血管の数が顕著に減少する (Haigh et al., 2003)。また、VEGF は、マウス胚体内において VEGF121、VEGF164 および VEGF188 の主に三つのスプライシングバリエントが機能することが知られており、これらのスプライシングバリエントは Heparan sulfate proteoglycan (HSPG) への結合領域をもつかどうかで大きく二つのグループに分けられる。HSPG 結合領域をもつのは VEGF164 と VEGF188 であり、HSPG 結合領域をもたないのが VEGF121 である。HSPG 結合領域をもつ VEGF164 と VEGF188 を欠損させた場合、後脳における血管分岐が正常に起こらないことが報告されている (Ruhrberg et al., 2002)。このことは HSPG 結合領域をもつ VEGF が中枢神経組織内の血管形成に必要であることを示している。また、VEGF164 は中枢神経組織において最も豊富に存在することが知られている (Ng et al., 2001)。これらのこ

とから本実験の脊髄における VEGF 強制発現実験では VEGF164 を用いている。脊髄における VEGF の役割はウズラ胚における VEGF 強制発現実験により、脊髄側部から侵入してくる INVP の侵入点が増えるという報告がある (James et al., 2009)。しかしながら、脊髄腹側から侵入する INVP の走行ルートの規定についてはいまだ不明瞭な点がある。

脊髄における血管形成において VEGF 以外の重要なシグナルとして知られているのが、Wnt シグナリングである (Stenman et al., 2008)。Wnt7a と Wnt7b を中枢神経組織において欠損させたコンディショナルダブルノックアウトマウスでは、脊髄内における一部の血管が減少し、Wnt の下流にある β -カテニンを血管内皮特異的に欠損させると、脊髄内部における血管の侵入は起こらなくなることが知られている。

本論文で得られた成果

本論文では、トリ胚において脊髄腹側から侵入してくる INVP が神経前駆細胞層と分化神経層の間の領域を通る決まった走行ルートもつことを明らかにした。また、その血管パターン形成において、脊髄の神経前駆細胞層が重要な役割を担っており、血管非形成領域を形成すること、さらに、その血管非形成領域は神経前駆細胞層の単なる物理的な障壁によるものだけではなく、何らかの分子メカニズムによって形成されうる可能性を示した。加えて、その分子メカニズムとして、血管誘引分子 VEGF と血管形成抑制分子 VEGFR1 あるいは細胞反発分子 Sema3E を用いた解析から、一つの生体内分子モデルを提示した。本論文では、これらの解析結果とこれまでに知られていることを踏まえて、より神経と血管の関係を深める議論をしたい。

材料と方法

ニワトリ胚とウズラ胚

ニワトリ有精卵は城山鶏園（神奈川）、ウズラ胚はモトキ（埼玉）より購入した。それぞれの有精卵を 38.5°C、湿度 100% の条件で温め、各実験に適した発生段階（主に胚発生 4 日目から胚発生 5.5 日目）の胚を得た。本論文中に記す発生段階は、Hamberger-Hamilton の発生段階表(Hamberger and Hamilton, 1992)に従った。

血管可視化のための蛍光インクインジェクション

ニワトリ胚およびウズラ胚への血管インクインジェクションは高瀬らの報告に従って実施した(Takase et al., 2013)。各実験に適した発生段階（主に胚発生 4 日目から胚発生 5.5 日目）にまで胚の発生を進め、vertical micropipette puller (Narishige, PC-10) を用いて先端を約 1mm にしたガラスキャピラリー (Narishige, GD-1) を用いて胚体外血管から蛍光インク (ZEBRA sparky-2 もしくは PILOT spotlitter) をインジェクションした (インク量 1 μ l から 3 μ l)。胚全体の血管にインクが広がったのを蛍光実体顕微鏡 (Leica) 下で確認した後、胚を卵から取り出し、横断組織片の作成あるいは脊髄の平坦試料の作成を行った。

脊髄の平坦試料の作成 (オープンブック)

脊髄の平坦試料の作成は神経軸索研究で使われた方法(Lyuksyutova, 2003; Wolf et al., 2008)を参考に改変した方法を用いた (なお、このオープンブックは培養系ではないことに注意すること)。蛍光インクインジェクションにより血管を可視化した胚を、眼科用ハサミを用いて卵から切り出し、PBS 内で卵黄をよく洗い落とした後、PBS を満たしたシリコンシャーレ上に移した。次に、胚の胴体領域にあたる脊髄組織を、眼科用ナイフ (FEATHER) を用いて切り出し、脊髄組織を取り巻く軟膜を脊髄組織が極力傷つかないように細心の注意を払いながら、取り除き、脊髄の背側領域に切れ目を入れた (E4 以前の脊髄組織は軟膜を取り除くと非常に丸まりやすいため一部の胚においては脊髄底板領域に接する軟膜を残してある)。この脊髄組織を、先端をカットした P1000 用チップのついたピペットで吸い上げ、35mm ガラスボトムディッシュ (MATSUNAMI) に移した後、脊髄内腔面がディッシュの底面になるように配置し、組織周囲の PBS をピペットで注意深く取り除き、ディッシュに貼付け蛍光実体顕微鏡 (Leica) あるいはコンフォーカルレーザー顕微鏡 (Pascal、Zweiss) を用いて

像の取り込みを行った。

胚の固定、横断組織片の作成

適切な発生段階で得られたトリ胚を、4%パラホルムアルデヒド/PBS 溶液を用いて 4°Cで一晩固定した。続いて、PBS で洗浄後、30%スクロース/PBS 溶液で脱水し、O.C.T compound/30%スクロース (=2:1) 溶液に 4°Cで一晩かけて置換した。さらに O.C.T compound/30%スクロース溶液に置換された胚を O.C.T compound によって包埋し、-30°Cで凍結後、クリオスタットを用いて厚さ 10 μ m あるいは 100 μ m の横断組織片を作成した。10 μ m の組織片は APS コートスライドガラス (MATSUNAMI) に張り付け、100 μ m の組織片は PBS を入れた 24 well-plate (IWAKI) 内に入れた。この後、免疫組織化学染色、in situ hybridization あるいは封入の処理へと移行した。

免疫組織化学染色

各組織片の免疫組織染色は1次抗体として QH-1 抗体、抗 ZO-1 抗体、抗 Smooth muscle actin 抗体、抗 Sox2 抗体、抗 HuC/D 抗体、抗 β -tublinIII (Tuj-1) 抗体、抗 Neurofilament 抗体を用いて行った。

10 μ m 組織片

2%スキムミルク/PBS溶液を用いて1時間ブロッキング処理した後、1次抗体を 4°Cで一晩反応させ、2次抗体を室温で1時間反応させた後、FluorSave reagent (Calbiochem) を用いて封入した。抗体の洗浄はPBSを用いて行い、10分間、3回の条件で洗浄した。1次抗体、2次抗体はそれぞれ2%スキムミルク/PBS溶液を用いて適当濃度に希釈された (希釈率に関して、一次抗体は表参照、二次抗体は表の下に記した)。

1 次抗体名 (2 次抗体の反応に必要な IgG)	生産会社名	希釈率
QH-1 抗体 (mouse IgG)	DSHB	2 倍
ZO-1 抗体 (rabbit IgG)	Zymed	50 倍
Smooth muscle actin 抗体 (1A4) (mouse IgG)	Sigma	400 倍
β -tublinIII (Tuj-1) 抗体 (mouse IgG)	R&D systems	300 倍
Neurofilament 抗体 (rabbit IgG)	Millipore	200 倍

なお、二次抗体は Alexa 568 goat anti-mouse IgG、 Alexa 488 goat anti-rabbit IgG または Alexa 647 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) を 500 倍希釈で使用した。

封入された 10 μ m 組織片はアポトームシステムのついた Axioplan 2 顕微鏡を用いて像の取り込みを行った。

100 μ m 組織片

100 μ m の組織片を 24 well-plate (IWAKI) 内の溶液に float させた状態で以下の通り処理した。0.5% Triton-X/PBS で 10 分処理した後、2% スキムミルク/PBS 溶液を用いて 2 時間ブロッキング処理した後、1 次抗体を 4°C で一晩反応させ、2 次抗体を室温で 1 時間反応させた後、FluorSave reagent (Calbiochem) を用いて封入した。このときの封入には APS コートなしのスライドガラス (MATSUNAMI) を用いてビニールテープを張り付けたカッターナイフでくりぬいた場所に組織片を置いてから封入した (組織片に厚みがあり、つぶれるのを防ぐため)。抗体の洗浄は PBS を用いて行い、30 分間、4 回の条件で洗浄した。1 次抗体、2 次抗体はそれぞれ 2% スキムミルク/PBS 溶液を用いて適当濃度に希釈した (希釈率は表参照、なお二次抗体はすべて 500 倍希釈)。

抗体名	生産会社名	希釈率
Human-Sox2 抗体 (goat IgG)	R&D systems	50 倍
HuC/D 抗体 (mouse IgG)	Molecular Probes	100 倍
抗 β -tubulinIII (Tuj-1) 抗体 (mouse IgG)	R&D systems	300 倍

なお、二次抗体は Alexa 488 donkey anti-goat IgG、Alexa 488 goat anti-mouse IgG もしくは Alexa 405 donkey anti-goat IgG (Molecular Probes) を 500 倍希釈で使用した。

封入された 100 μ m 組織片はコンフォーカルレーザー顕微鏡 (Pascal、Zweiss) を用いて像の取り込みを行った。

ヒアルロン酸の検出

ヒアルロン酸の検出は以前に報告された方法を参考にして行った (Meszar et al., 2008)。検出にあたっては biotinylated HA-binding probe (HABP, Hokudo) を終濃度 5 μ g/ml PBS で使用した。組織片を 0.5% Triton-X/PBS で 10 分処理した後、1% BSA/PBS にて 1 時間ブロッキングし、HABP/PBS を 4°C で一晩反応させた。最終的に Streptavidin-Alexa 555 または Streptavidin-Alexa 647 (Molecular

Probes) をブロッキング液で 500 倍希釈し、反応させたものを封入し、コンフォーカルレーザー顕微鏡 (Pascal、Zweiss) を用いて像の取り込みを行った。これらの反応および封入方法は 100 μ m 組織片の免疫組織化学染色法と同じ手順である。

RNA プローブの作成

RNA プローブの作成は利根川あかね博士ら、および大畑絵美博士らの以前の報告の通りに行った (Ohata et al., 2009; Tonegawa et al., 1997)。RNA プローブの作成に必要な cDNA 断片を含むプラスミドを下記に記した反応系を用いて作成した。なお、プローブ作成に用いたプラスミドは pCMS-EGFP か pBS-SK(+) であり、T3/T7 RNA polymerase による反応系である。

T3/T7 RNA polymerase による反応系 (計 20 μ l)

-10x DIG-labeled dNTP mix (Roche)	2 μ l
-5x transcription buffer including DTT (STRATAGENE)	4 μ l
-RNase inhibitor (TAKARA)	0.5 μ l
-H ₂ O	10.5 μ l
-cDNA templat (1 μ g/ μ l)	2 μ l
- T3/T7 RNA polymerase (STRATAGENE)	1 μ l

プローブ作成に用いたプラスミド

pCMS-NeuroM (高橋輝明 製作、クローニングは下記発現ベクターの項参照、T3-anti-sense 用)

pBS-SK-VEGF (当研究室、利根川あかね博士 製作、T7-anti-sense 用)

pBS-SK-Quek1 (VEGFR2) (当研究室、利根川あかね博士 製作、T7-anti-sense 用)

pCMS-sFLT-1 (東京医科歯科大学 渋谷正史博士より cDNA を供与頂いた。
高橋輝明によりサブクローニング、T3-anti-sense 用)

pCMS-Sema3E (高橋輝明 製作、クローニングは下記発現ベクターの項参照、T3-anti-sense 用)

In situ hybridization

DIG ラベルされた RNA プローブを一本鎖にするため、RNA プローブ溶液を 90°C で 5 分間、熱処理し、その後すぐに、氷上で 5 分間静置した。このプローブ溶液をあらかじめ 65°C に温めておいた ULTRAhyb™ と混合し使用するまで

65°Cで保温した。10 μ m の横断組織片のついたスライドグラスを 50°Cで一晩乾かした後、PBT で洗浄し O.C.T. compound を除去した。続けて、pre-hybridization buffer を満たした洗瓶内に移し、5 分間静置し液をなじませた。あらかじめ 65°C に温めておいた RNA プローブを含む ULTRAhyb™ を pre-hybridization 後の組織片上に添加し、65°Cで一晩 hybridization させた。余分なプローブを除去するために、hybri-wash buffer 1 (50% formamide、5x SSC、1%SDS)、hybri-wash buffer 2 (50% formamide、2x SSC)、hybri-wash buffer 2 : TBST (TBS+0.1% Tween20、TBS; 0.14 mM NaCl、2.7 mM KCl、25mM Tris-HCl[pH7.5]) を用いて 65°Cでそれぞれ洗浄した後、TBST で洗浄した。次に、blocking buffer 1 (2%BBR、TBST)、blocking buffer 2 (2%BBR、20%FBS、TBST) を用いてブロッキングし、blocking buffer 2 で 1000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識の抗 DIG 抗体を 4°Cで一晩反応させた。余分な抗体を除去するために、TBST で洗浄後、NTMT (100mM NaCl、100mM Tris-HCl[pH9.5]、50mM MgCl₂、0.1% Tween20) に置換し、0.45mg/ml nitroblue-tetrazolium chloride (NBT、Roche) と 0.175 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphatase (BCIP、Roche) を添加して発色反応を行った。発色反応後、PBT で洗浄し、4% PFA/PBS を用いて 4°Cで 20 分間固定し、PBS で洗浄後、FluorSave reagent (Calbiochem) で封入した。

発現ベクター

pBI-EGFP は Clontech から購入した。pCAGGS-tTA、pBI-DN-Rac1、pBI-DN-RhoA は当研究室の渡辺忠由博士によってサブクローニングされたものを使用した(Watanabe et al., 2007; Watanabe et al., 2009)。pBI-D-EGFP は東北大学、斉藤大介博士より供与して頂いたものを使用し、pBI-D-sFLT-1 は pBI-D-EGFP の MluI-NheI サイトに Full-length の sFLT-1 (ニワトリ由来、東京医科歯科大学、渋谷正史博士より供与) を挿入した(Yamaguchi et al., 2002)。pCAGGS-DsRed express は当研究室の渡辺忠由博士によってサブクローニングされたものを使用し(Watanabe et al., 2007)、pCAGGS-VEGF164 (マウス由来) は熊本大学、佐藤有紀博士が作成したものを使用した(Sato et al., 2008)。Wnt7a、SFRP2 は pBI-EGFP に、Noggin および BMP4 は pCMS-EGFP に挿入されたものを使用した (SFRP2 は下北英輔博士、Wnt7a、Noggin および BMP4 は東北大学、斉藤大介博士より供与、なお、Wnt7a の pBI-EGFP へのサブクローニングは高橋輝明により行われた)。NeuroM、Sema3A、Sema3C、Sema3E についてはそれぞれ E3 のニワトリ胚の胴体部および脳領域から得られた cDNA から KOD plus (TOYOBO) を用いた PCR 反応でクローニングし、その後 pCMS-EGFP に挿入し、さらに pBI-EGFP にサブクローニングした (クローニングに使用したプラ

イマー下記)。

クローニングに使用したプライマー

Fw-MluI-NeuroM

atACGCGTgccgcatgacgaagacgtacaccaa

Rv-NheI-NeuroM

atGCTAGCctactcgttgaagatggcgt

Fw-MluI-Sema3A

atACGCGTtacagtggctgctgcagcatg

Rv-EcoRV-Sema3A

atGATATCtcagacactccgtgggtgcc

Fw-MluI-Sema3C

atACGCGTctgaagagatggcagttctt

Rv-EcoRV-Sema3C

atGATATCttaagaagcaggttaactgatttc

Fw-NheI-Sema3E

atGCTAGCgccgcatgttgggcaggatggca

Rv-NheI-Sema3E

atGCTAGCtcaagagtcagctatgttcttc

In ovo electroporation

ニワトリ胚の神経管へのエレクトロポレーションは以前、百瀬剛博士によって開発され、さらに当研究室にて改変が加えられた方法を参考にして行った (Momose et al., 1999; Saito et al., 2012; Yokota et al., 2011)。DNA は EB 溶液 (Qiagen) に懸濁し、Fast Green FCF の終濃度が 4%になるように加え、DNA 溶液の終濃度が 6.0 μ g/ μ l になるように調整した。この DNA 溶液を vertical micropipette puller (Narishige, PC-10) を用いて先端を約 1mm にしたガラスキャピラリー (Narishige, GD-1) で吸い上げ、E2 の神経管内腔へと尾部から注入した。この溶液が拡散しない内に素早くタングステンニードルおよび白金線(ともに直径 0.5mm) で神経管を挟み込むようにして電気パルスを通した。パルス条件は 10-15V、25ms (インターバル 975ms) で 5 回に設定した。

ニワトリ胚の背側大動脈へのエレクトロポレーションは Rossello らによってすでに報告された方法に従った (Rossello and Torres, 2010)。ニワトリ胚発生 1.75 日から 2 日の間にニワトリの頸部にガラスキャピラリーを刺し、背側大動脈に DNA 溶液を流し込む直後に、腹側と背側に電極を当て電気パルスを通した。

DNA 溶液の調整は神経管へのエレクトロポレーションと同じである。極力、心臓の拍動を止まるまで冷やしてから行った（冷蔵庫で冷やすよりは室温で放置の方が良い）。パルス条件は 20V、20ms（インターバル 200）、で 5 回に設定した。

細胞培養

アフリカミドリザル腎臓由来 COS-7 細胞は Dulbecco's Modified Eagle Mededium (DMEM、日水製薬) に 1.5 g/l sodium bicarbonate、4.5 g/l glucose、10% fetal bovine serum (FBS)、50IU/ml penicilin、50mg/ml Streptomycin を加えた培養液を用いて 39°C、5% CO₂、湿度 100% の条件下で培養した。継代は、細胞が培養皿面積の約 9 割程度に増えた段階で行った。培養皿と細胞および細胞どうしの接着をはがすために、1.25% trypsin (GIBCO) /1mM EDTA を 37°C で 5 分間作用させた。続けて、培養液を加えて trypsin の反応を停止させ、ピペッティング後、室温、1000rpm で 3 分間遠心し、細胞上清を除去し、細胞を回収した。そこへ新たな培養液を加え、細胞再懸濁後、必要量を新たな培養皿に播種し、CO₂ インキュベーターに戻して培養を続けた。

細胞移植

6cm dish で培養した VEGF/tomato 共安定発現 COS-7 細胞（東北大学、斉藤博士より供与）を培養皿面積の約 9 割に増えた段階で trypsin/EDTA 処理し、遠心回収後、新たな培地 500μl に再懸濁させ、PCR tube に回収した。細胞を使用する直前に PCR tube をスピンドウンし、細胞上清を極力除去してからガラスキャピラリーで細胞懸濁液を吸い、5 分間静置した後、E2 ニワトリ胚の胴体領域の脊髄内腔に約 1μl 注入した。その後、移植された胚が E5 になるまで培養を続けた。この実験のコントロールは VEGF/tomato 共安定発現 COS-7 細胞のかわりに tomato 安定発現細胞（東北大学、斉藤博士より供与）を用いた。なお、これらの細胞株の作成方法は作成の仕方は(Saito et al., 2012)を参照のこと。

結果

INV P は神経前駆細胞層と分化神経細胞層の境界付近の決まったルートを走行する

胚発生期の INV P の形成過程を調べるにあたり、当研究室で開発された血管組織の 3 次元構造を安価かつ高感度に可視化する蛍光インクインジェクション法(Takase et al., 2013)を用いてトリ胚体内の血管を可視化した。インクインジェクションは孵卵後 3 日から 7 日の各発生段階において行った（なお、図 2 には主な解析時期である胚発生 4 日目から胚発生 5 日目までの結果を示す）。血管が可視化された胚の観察は、胚から脊髄を摘出し、その背側領域を切り開いて 2 次元的に平坦な試料を作成し観察するオープnbック法による観察と胚全体を凍結横断組織片にする観察の両方で行った。また、これらの観察は前肢から後肢までの胴領域で行った。

(1) オープnbック法による観察

オープnbック法による観察では、脊髄両端が背側領域となり、中央領域が腹側領域となる。胚発生 4 日目において INV P が脊髄腹側から侵入し始める様子が見られた（図 2B ; n=8）。胚発生 4.5 日目において腹側から侵入した INV P は、分岐と伸長を繰り返し、さらに背側方向へと血管形成領域を広げていった（図 2C; n=18）。一つの分岐点から伸びた血管は別の分岐点から伸びた血管と融合し、一つのループを形成することを繰り返すことによって亀の甲羅様の血管網を形成していった。また、この一つ一つの分岐から伸びる血管は別の分岐から伸びる血管と融合する前から内腔を作り血液が流れ始めていることがわかった。胚発生 5 日目までに INV P の形成領域は腹側から背側までの約 4 分の 3 の領域にまで広がっていたのに対して、背側の一部の領域には血管が形成されていなかった（図 2D; n=20）。INV P が形成されない背側の一部の領域は、少なくとも発生 7 日目までは血管が形成されていないようであった。

(2) 横断組織片による観察

蛍光インクにより可視化された INV P の脊髄横断組織片による観察結果は図 2E-H に示す。オープnbック法による観察と同様に、胚発生 4 日目において INV P が脊髄腹側から侵入し始める様子が見られた（図 2E; 矢印、n=8）。胚発生 4.5 日目においてはさらに背側方向に INV P が伸長していた（図 2F; 矢印、

n=18)。胚発生 5 日目になると、腹側から伸びる INVP はより背側へと伸長し、脊髄背側の約 4 分の 1 の領域を残す所まで伸長していた (図 2G; 矢印、n=20)。また脊髄側方部からも INVP が侵入してくる様子が観察された (図 2G; 緑)。

続いて、インクにより可視化された血管は細胞レベルで血管をどの程度まで可視化できているのか調べるために、ウズラに特異性のある血管内皮細胞および血管内皮前駆細胞 (angioblast) を染色することが知られる抗体、QH-1 抗体による免疫組織化学染色 (James et al., 2009; Kurz et al., 1996; Moyon et al., 2001; Pardanaud et al., 1987; Pouget et al., 2006; Sato et al., 2008) とインクにより可視化された血管を比較した。この比較実験ではインクインジェクションによる血管の可視化もウズラ胚を用いて行い、QH-1 抗体による免疫組織化学染色の結果、および血管内皮の Apical 側に蓄積する ZO-1 (細胞上皮マーカー) に対する抗体を用いた免疫組織化学染色の結果と相互に比較した (図 3A-E'; n=8)。結果、脊髄内のほとんどの血管内皮において、インクのシグナルと QH-1 による血管部分のシグナルが一致した (図 3A、3B および 3D)。しかしながら、蛍光インクインジェクション法では血管内皮細胞の最先端部にあたる糸状仮足や血管内皮前駆細胞は染色されなかった (図 3E および 3E')。また、ZO-1 を示すシグナルとインクのシグナルに関しては完全に一致しているようにみえた (図 3A、3C および 3D)。これらのことから、蛍光インクインジェクション法による血管の可視化は血管内皮の中でも主に内腔領域が形成された部分までを示すものであることがわかった。また、これらの血管には、すでに血管平滑筋 (血管ペリサイト) マーカーである α SMA (Ohata et al., 2009; Pouget et al., 2006; Sato et al., 2008) 陽性のペリサイトが存在していることもわかった (図 3F; n=15)。

次にニワトリ胚の横断組織片を用いて INVP が脊髄内のどの領域に形成されるのかを、蛍光インクインジェクション法と神経前駆細胞マーカーである Sox2、ニューロン (本論文中では分化神経と呼ぶ) マーカーである HuC/D、 β III-tubulin (図では Tuj-1 と表記) または分化神経に発現する中間径フィラメントに対する抗体による免疫組織化学染色法を併用することにより調べた (図 4)。その結果、INVP は神経前駆細胞層に沿うような形で、神経前駆細胞層と分化神経層の境界付近を走行するように形成されていた (図 4A-D; 矢印、4A (Movie.1); n=8、4B (Movie.2); n=3、4C; n=10、4D (Movie.3); n=6)。また、INVP は神経前駆細胞層の中には侵入していなかった。次に、INVP の走行位置を厳密に特定するために、神経前駆細胞層から分化神経に移行途中の領域 (intermediate zone) および分化神経層に蓄積することが知られるヒアルロン酸 (HA) に結合するプローブによる染色 (Meszar et al., 2008) を行った所、ヒアルロン酸の蓄積が多く見られる intermediate zone 領域の脇を INVP が走行していた (図 4E; 矢印、

n=3)。さらに、intermediate zoneに発現する転写因子 *NeuroM* (Roztocil et al., 1997; Xie et al., 2011)の in situ hybridization を行ったところ、INVP は *NeuroM mRNA* を発現する細胞の隣、つまり intermediate zone の分化神経層側に接するように走行することが明らかとなった (図 5A および 5A'; n=3)。

INVP の走行ルートの規定には神経前駆細胞層が重要な役割を果たす

ここまでの結果から、INVP は神経前駆細胞層に沿う (厳密には intermediate zone に接する) ように走行するルートをもつことがわかった。しかしながら、面白いことに、神経前駆細胞層の中への INVP の侵入はほとんど見られなかった。

では、脊髄腹側から侵入した INVP が走行ルートを規定する際に、神経前駆細胞層は何らかの役割をもっているのであろうか。このことを調べるために、神経前駆細胞層を欠損させる因子の探索を行い、神経前駆細胞層の欠損時に INVP の走行ルートがどのように規定されるのかを調べようと考えた (なお、intermediate zone と INVP に関する実験は後ほど図 19 にて記載するが、現時点では intermediate zone と INVP の関係性があることを有意に示す結果は得られていない)。

マウスの研究において細胞骨格制御因子である Rho family に関連するシグナルは forebrain や脊髄の神経前駆細胞層の形成を乱すことが知られている (Chen et al., 2009; Ghosh et al., 2008; Katayama et al., 2011)。そこで、RhoA の Dominant negative form である DN-RhoA をニワトリ孵卵後 2 日目胚の神経管 (後に脊髄となる) にエレクトロポレーション法を用いて発現させ、血管が脊髄に侵入・伸長が見られる孵卵後 5 日目もしくは 5.5 日目胚まで発生を進めた後、蛍光インクインジェクション法を用いて血管を可視化し、横断組織片を作成した。この組織片は抗 Sox2 抗体あるいは Tuj-1 抗体による免疫組織化学染色と HA プローブによる染色後に観察した (図 6)。その結果、コントロールとして EGFP を発現させた領域においては、Sox2 陽性の神経前駆細胞層が存在した (図 6A および 6A' (Movie.4) ; n=8) のに対して、DN-RhoA を発現させた領域においては一部の神経前駆細胞の欠損が見られた (図 6B および 6B'; n=6)。さらに、非常に面白いことに、その欠損領域では INVP が異所的に形成されていた (図 6B および 6B' (Movie.5) ; n=6)。なお、一部の神経前駆細胞の欠損が見られた領域では Tuj-1 によるシグナルが見られ (図 6C および 6C'; n=19)、ヒアルロン酸の蓄積が多く見られた (図 6D および 6D' (Movie.6) ; n=6)。また、RhoA と同じく Rho family の Rac1 の Constitutively active form である CA-Rac1 を脊髄に発現させた際にもコントロール (図 7A および 7A' ; n=6) と比べて、一部の神

経前駆細胞の欠損が見られ、その欠損領域では INVP の異所形成が見られた (図 7B および 7B' ; n=10)。これらの結果から、INVP の走行ルートの規定には、神経前駆細胞が必要であり重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

VEGF は INVP が腹側から脊髄内に侵入した後にも誘引伸長分子として働く

先の実験から神経前駆細胞層は INVP の走行ルートを規定するのに重要であることがわかった。血管形成に重要とされる VEGF の mRNA は神経前駆細胞に強く発現し、VEGFR2 の mRNA も INVP に発現している (図 8A; n=8 および 8B; n=4) (Bautch and James, 2009; Nagase et al., 2005; Nimmagadda et al., 2004; Ruiz de Almodovar et al., 2011)。ウズラ胚における脊髄への VEGF の強制発現により、脊髄側方 (脊髄表層領域) から INVP の脊髄内への侵入を促進することはすでに報告されている (James et al., 2009)。

脊髄腹側から侵入した INVP 伸長に対する VEGF の作用をより明確にするため、孵卵後 5 日目胚における脊髄の背側領域 (血管が形成されていない領域) を利用して、エレクトロポレーション法により VEGF 発現プラスミドを脊髄背側に局所的に導入したときの INVP への影響を蛍光インクインジェクション法とオープンブック法の併用により調べた (図 9A)。その結果、INVP は VEGF を局所的に発現領域させた領域に向かって方向性のある伸長をし、脊髄の背側の血管非形成領域に異所血管を形成する様子が見られた (図 9B-9B'' ; n=21)。また、脊髄背側に多く VEGF を発現させた横断組織片による観察においても背側方向への余剰の伸長が見られ、PNVP 領域と融合する所まで INVP が伸長していた (図 9C および 9C' (Movie.7) ; n=20)。これらのことは、VEGF が脊髄内侵入後の INVP を誘引し伸長させるのに十分であることを示す。

VEGF 以外で血管形成に関わるシグナルとして知られる Wnt シグナルや BMP シグナルが INVP にどのように影響するのか調べた結果についてもここに記す (図 10)。序論でも示したが、Nestin-cre driver を用いた Wnt7a/7b ダブルノックアウトマウスでは脊髄内の INVP が減少することが知られている (Stenman et al., 2008)。本研究では Wnt7a または Wnt シグナルの阻害分子として知られる Secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) の発現プラスミドを脊髄内にエレクトロポレーション法により導入し、VEGF 同様、INVP への影響を調べた。その結果、コントロールとして遺伝子導入されていない側と比べて (あるいは図 14B-B'' を参照) と Wnt7a または SFRP2 を発現させた領域における INVP 形成には特に有意な差異は認められなかった (図 10A-A'' ; n=5、図 10B-B'' ; n=4)。また、脊髄背側に発現し、ゼブラフィッシュの尾部の静脈形成において VEGF

とは独立して血管形成に寄与することが知られている BMP4 (Wiley et al., 2011) と BMP 阻害因子である Noggin を脊髄に発現させる実験においても INVP 形成に関してコントロールとの差異は認められなかった (図 10C-C''; n=4、図 10D-D''; n=10)。これらの結果は、INVP の伸長過程において他の分子シグナルに比べ、特に VEGF シグナルが作用しやすいことを示しているようにおもえる。ただし、マウスやゼブラフィッシュ等の研究においてこれらの分子が INVP や静脈形成に作用することは事実であり、このような違いがどのようにして生まれるのかについては考察の項にて述べることとする。

神経前駆細胞層が非血管形成領域を生み出す物理的障壁の可能性の検証

神経前駆細胞層は、細胞体部分が非常に密な状態になっており、それが物理的な障壁となって血管の侵入を妨げる要因になっている可能性が考えられる。そこで、神経前駆細胞層のさらに内側にあたる脊髄内腔領域に VEGF を発現させた COS-7 細胞の細胞塊を注入したとき、神経前駆細胞層内に INVP が侵入するかどうかを調べた (図 11A)。もし、単に物理的な障壁が神経前駆細胞層内への INVP を妨げているだけであるとすれば、脊髄内腔からより多くの VEGF を分泌させる環境を作っても INVP は神経前駆細胞層内へは侵入しないはずである。結果、非常に面白いことに、コントロールとして Tomato 発現 COS-7 細胞の細胞塊を注入した胚 (図 11B; n=12) と比べて、内腔に VEGF を発現させた COS-7 細胞を注入した脊髄において、神経前駆細胞層内への INVP の異所的な侵入が見られた (図 11C; n=10)。さらに、INVP は神経前駆細胞層の中を VEGF 発現 COS-7 細胞塊に向かって形成されただけでなく一部の胚においては脊髄内腔領域に出血が見られるものもあった (図 12B; n=5、図 12C; n=2)。また、神経前駆細胞層内に異所 INVP が形成されたときの神経前駆細胞への影響について Tuj-1 抗体を用いて調べたが、神経前駆細胞への影響があるようには見えなかった (図 12A および 12A'; n=8)。これらの結果は、先に示した脊髄背側への VEGF 局所発現実験の結果にみられたように、VEGF が INVP 誘引伸長させるのに十分であることをさらに確証づけるものであるとともに、神経前駆細胞層は物理的な障壁以外の何らかの分子メカニズムによって非血管形成領域を形成する可能性を示唆するものである。また、神経前駆細胞層が血管非形成領域を形成する生物学的意義として、脊髄内腔にある髄液と血液の混入を防ぐ役割を担っているのかもしれない。これらのことに関しては考察の項にてさらに詳しく記す。

VEGFR1 は INVP において発現し、sFlt-1 の脊髄への強制発現は INVP の伸

長を阻害する

VEGF の強制発現実験から、VEGF が腹側から侵入した後の INVP の誘引伸長に十分であることはすでに示した。また、神経前駆細胞層は物理的な障壁以外の何らかの分子メカニズムによって血管非形成領域を形成する可能性も示した。では、この血管非形成領域を生み出す分子メカニズムは何であるのか。本研究では血管の誘引伸長を促す VEGF とその血管形成を抑制する分子のバランスが重要なのではないかと考えていくつかの候補分子の探索を試みた。

まず一つ目の候補分子として、血管形成を阻害しうる分子として報告がある VEGFR1 について検討した(Fong et al., 1995; Hiratsuka et al., 1998; Shibuya, 2008, 2013)。VEGFR1 は VEGFR2 に比べて VEGF への結合能が高いわりにキナーゼ活性が低いことが知られ、VEGFR1 の null ノックアウトマウスは血管の過剰形成が起こり胎生期に致死に至るのに対して、VEGFR1 のチロシンキナーゼドメインを欠失させたミュータントマウスは正常に発生することから、VEGF に対して阻害機能を有することがあると考えられてきた。また、*VEGFR1 mRNA* の発現を *in situ hybridization* で調べると、INVP に発現が見られた (図 13A; n=2, 13B; n=2)。加えて、VEGFR1 のスプライシングバリエントである Soluble FLT-1 (sFlt-1) は VEGF への結合部位だけをもつ可溶性型分子であり、実際に VEGF への阻害能がよく知られている分子である(Ambati et al., 2007; James et al., 2009)。そこで、sFlt-1 発現プラスミドをエレクトロポレーション法により脊髄に導入し、INVP の形成に影響があるかどうかをオープンブック法および横断組織片の観察により調べた (図 14A)。その結果、コントロールとして EGFP を発現させた胚の脊髄において INVP 形成に異常が見られなかった (図 14B-B''; n=24) のに対して、sFlt-1 強制発現領域において脊髄腹側からの INVP 侵入および腹側から侵入した後の INVP の伸長が阻害された (図 14C-C''; n=13)。これらの結果は INVP の伸長に VEGF シグナルが必要であることを示す。また、sFlt-1 が神経前駆細胞層に蓄積した場合、血管非形成領域を生み出すメカニズムになりうるかもしれない。さらに、Tuj-1 抗体を用いてこれらの胚の横断組織片を免疫組織化学染色した所、sFlt-1 の強制発現により、INVP が減少した胚において Tuj-1 陽性の分化神経層が減少しているようにも見えた (図 14D および 14D'; n=6)。このことは VEGF あるいは INVP が神経分化に寄与している可能性を示している。この結果についても考察の項にて触れる。

Sema3E は INVP 形成への抑制能をもつが、他の Semaphorin 3 family は INVP 形成を抑制しない

先に示した通り、sFlt-1 は神経前駆細胞層の血管非形成領域を生み出しうる

一つの候補分子であるが、その他の分子として、分泌型 Semaphorin である Semaphorin 3 family に着目し INVP に対する作用を解析した結果を報告する(図 15)。特に、Sema3E はマウスの研究で、網膜における血管や体節間血管、背側大動脈の血管形成を反発、抑制する働きが知られている(Gu et al., 2005; Kim et al., 2011; Meadows et al., 2011; Meadows et al., 2013; Oh and Gu, 2013a, b; Sakurai et al., 2010)。また、Sema3E の受容体である PlexinD1 はトリ胚において INVP および PNVP に発現することが報告されている(Mauti et al., 2006)。そこで、本研究では、まず、Sema3E を含む Semaphorin 3 family (Sema3A、Sema3B、Sema3C) を、それぞれエレクトロポレーション法を用いて脊髄領域に発現させ、INVP 形成にどのように影響するのかを調べた(図 15)。結果、Sema3E を除く、Semaphorin 3 family はコントロール(図 15A (Movie.8) ; n=24) に比べ、INVP 形成に大きな差異は認められなかった(図 15C-D'; 15C および 15C'; n=6、15D および 15D' (Movie.11) ; n=7) のに対して、Sema3E は INVP の形成を抑制する様子が見られた(図 15B および 15B' (Movie.9) ; n=9)。なお、Sema3C に関しては結果が Sema3A、Sema3B と同じであったので図には載せていない。特に、Sema3E 強制発現細胞が集中して存在する領域において、INVP の伸長が止まる様子が見られた(Movie.10)。これらの結果は Sema3E が INVP 形成を抑制するのに十分であることを示す。また、面白いことに、Sema3E を脊髄腹側領域に集中的に発現させた胚においては、脊髄内の腹側から最初に侵入してくる INVP の形成を抑制したのに対して、脊髄側方部の INVP 形成を抑制することはなかった。このことは、脊髄腹側から侵入する INVP と脊髄側方から侵入するとされてきた INVP に独立した制御メカニズムが存在することを意味している。Sema3E と Sema3E 以外の Semaphorin 3 family の INVP に対する作用の違いがどのようにして生まれるのかは、考察の項にて記述する。

次に、INVP 形成における VEGF と Sema3E の関係性を調べるために、VEGF と Sema3E の共発現実験を、エレクトロポレーション法を用いて行った。その結果、VEGF と EGFP を共発現させたコントロール(本論文では VEGF コントロールと呼ぶ)では INVP の過剰な形成が見られた(図 16A および 16A' (Movie.12) ; n=20) のに対して、VEGF と Sema3E を共発現させた脊髄においては、VEGF による過剰な血管形成が抑制されていた(図 16B および 16B' (Movie.13) ; n=5)。これらの結果から、Sema3E は VEGF を介した INVP 形成促進能を抑制するのに十分であることがわかった。

ここまでの結果を総合して、INVP の血管非形成領域を生み出す機構として、細胞誘引因子(VEGF)と反発因子(Semaphorins)または血管形成抑制因子(sFlt-1)という観点から一つの生体内モデルを提唱する(図 18)。このモデルは細胞の

誘引反発の概念を元にして想定される一つのモデルである。このモデルの意義、本来の INVP 形成においてこうした機構が実際に存在しうるのかということや他のメカニズムから考えられる点に関しては考察の項にて記述する。また、Sema3E の発現パターンを調べた所、Sema3E は神経前駆細胞層には発現していない可能性が高いという結果をすでに得ているので図 17 (n=8) にて示す。このことも踏まえて、本来の発生過程で INVP 形成ではどういったことが考えられるのか考察する。

NeuroM の強制発現は神経分化を促進するが、INVP 形成に顕著な変化を与えない

本論文では、神経前駆細胞層の重要性を示してきたが、より INVP に密接する領域として *NeuroM mRNA* を発現する intermediate zone が挙げられる。この intermediate zone と INVP 形成に何か関係性はないのかと考え、NeuroM を脊髄内に強制発現させた時の INVP 形成パターンを調べようと試みた (図 19)。NeuroM を強制発現された細胞はほとんどが神経前駆細胞層から出て分化神経層へと移動しており、Tuj-1 陽性のニューロンへと分化していた(図 19A; 緑、n=18)。このことは NeuroM が神経分化を促進するのに十分であることを示す。しかしながら、神経分化を促進するものの、INVP の走行パターンに顕著な変化は見られなかった。

INVP の一部は背側大動脈から伸びてきうる

INVP を形成する細胞はどこからどのようにしてやってくるのであろうか。INVP は体節中胚葉に由来する (図 20A および 20A'; n=8) (Wilting et al., 1995)。しかしながら、体節中胚葉から INVP が形成されるまでの間のプロセスは十分に明らかにされていない。解剖学的には脊髄の腹側から侵入する INVP は Primary artery tracts (PATs) から分岐することが知られており、この PATs は背側大動脈 (Dorsal aorta: DA) と体節間血管 (Intersegmental vessel: ISV) を介してつながっている (Kurz, 2009; Kurz et al., 1996)。また、DA も体節中胚葉に由来することが知られている (Pardanaud et al., 1996; Pouget et al., 2006; Sato et al., 2008)。そこで本研究では、体節中胚葉から INVP が形成されるまでの過程について、INVP の前駆細胞が一度、DA になってから伸長し INVP へとなくなっていくのではないかと考えた。このことを調べるために、DA の血管を EGFP でラベリングし、実際に INVP になるかどうかを調べた。DA の血管の EGFP ラベリングに際してはすでに報告されている DA へのエレクトロポレーション法を用いて行った (Rossello and Torres, 2010)。ちなみに、この報告では、

INVP が形成される前の胚発生 3 日目までしか見ておらず、DA から INVP が形成されるまでは調べられていない。その結果、以前の報告にあるように胚発生 1.75 日から 2 日でエレクトロポレーションし、胚発生 3 日目時点で DA の血管がラベリングされている様子が見られ、また体節中胚葉に EGFP 陽性のものはなかった（図 20B-B''; n=12）。さらに、INVP が形成される E5 まで発生を進めた所、EGFP 陽性の INVP が見られた（図 20C-C''; n=5）。これらの結果から、INVP の少なくとも一部は DA から伸びてくる可能性があることを示している。

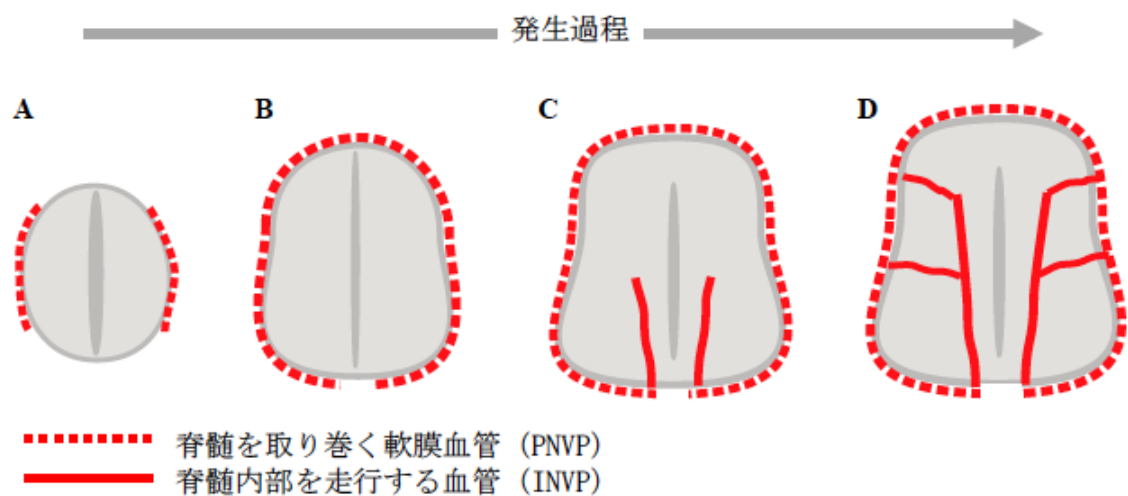


図 1.脊髄内の血管の発生過程

(A) 発生 3 日目胚の神経管（後の脊髄）。神経管を取り巻く軟膜血管が神経管の側方部分につくられ始める。(B) 発生 3.5-4 日胚の脊髄。底板を除くほぼ全ての脊髄周囲に軟膜血管が形成される。(C) 発生 4-4.5 日目胚の脊髄。脊髄の底板脇から脊髄内部への血管の侵入が始まる。(D) 発生 5 日目以降の脊髄。腹側から侵入した血管は背側へと伸長し、脊髄の側方の軟膜血管から血管が分岐し侵入する。

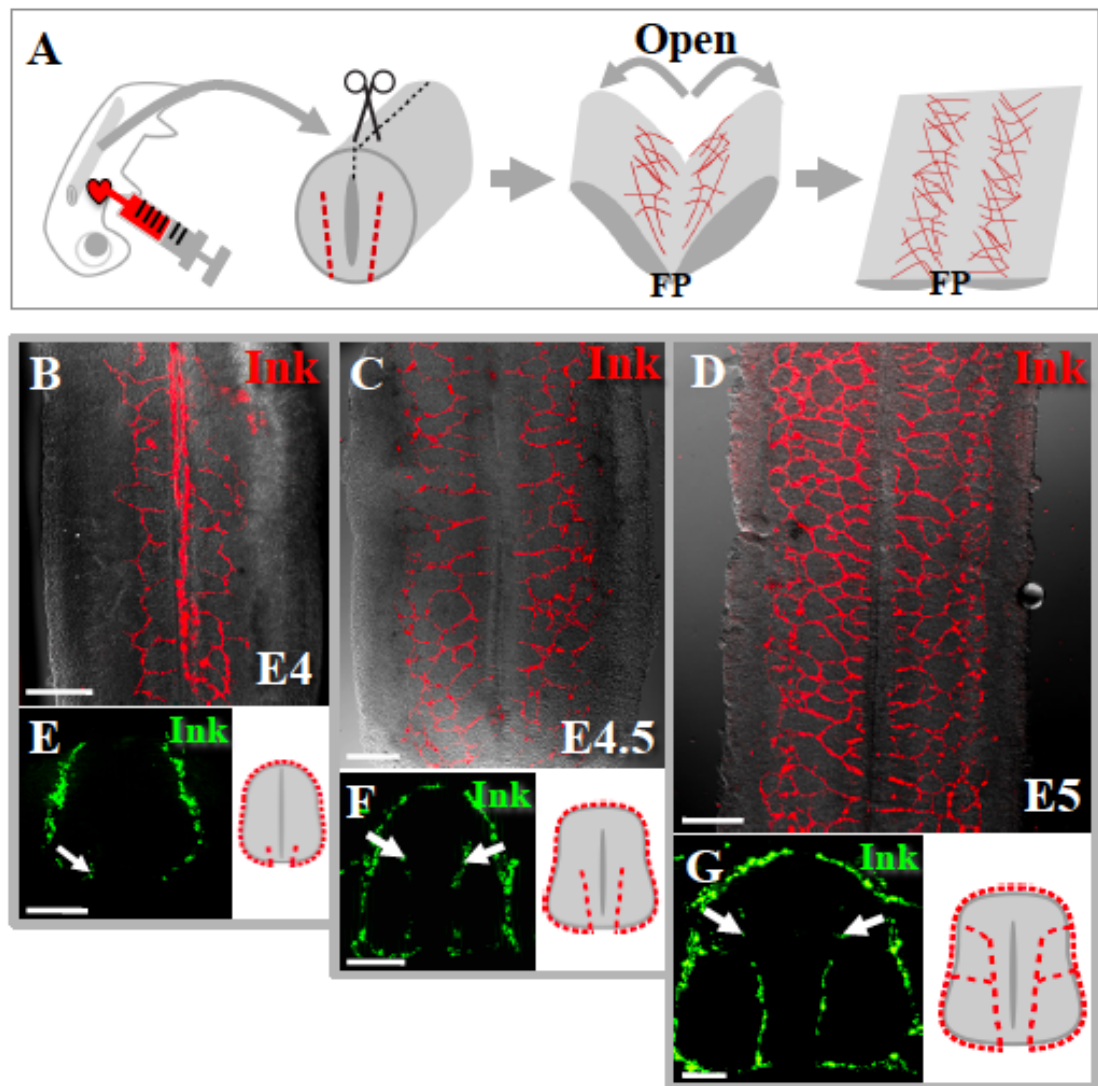


図 2. INVP は脊髄腹側から侵入し、背側方向に網目状に伸長する

(A) オープンブック法と蛍光インクインジェクション法を併用した血管可視化法の模式図。(B-D) 胚発生 4 日目、4.5 日目、5 日目において可視化された INVP (赤) (オープンブック)。胚発生 4 日目に脊髄腹側から INVP が侵入し、発生が進むにつれて網目状の血管が分岐、伸長を繰り返して背側方向に広がっていった。胚発生 5 日目までに伸長した INVP は脊髄背側の約 4 分の 1 の領域を残す所まで伸長したが、この約 4 分の 1 の領域には INVP の侵入はみられなかった。(E-G) 胚発生 4 日目、4.5 日目、5 日目において可視化された INVP の横断組織片とその模式図。オープンブックによる観察と同様に発生が進むにつれて脊髄腹側から INVP (緑) が侵入し背側方向に伸長する様子が見られた(矢印)。加えて、胚発生 5 日目には脊髄側方から侵入する INVP がみられた。スケールバー：B-D 図は 200 μ m、E-F 図は 100 μ m。

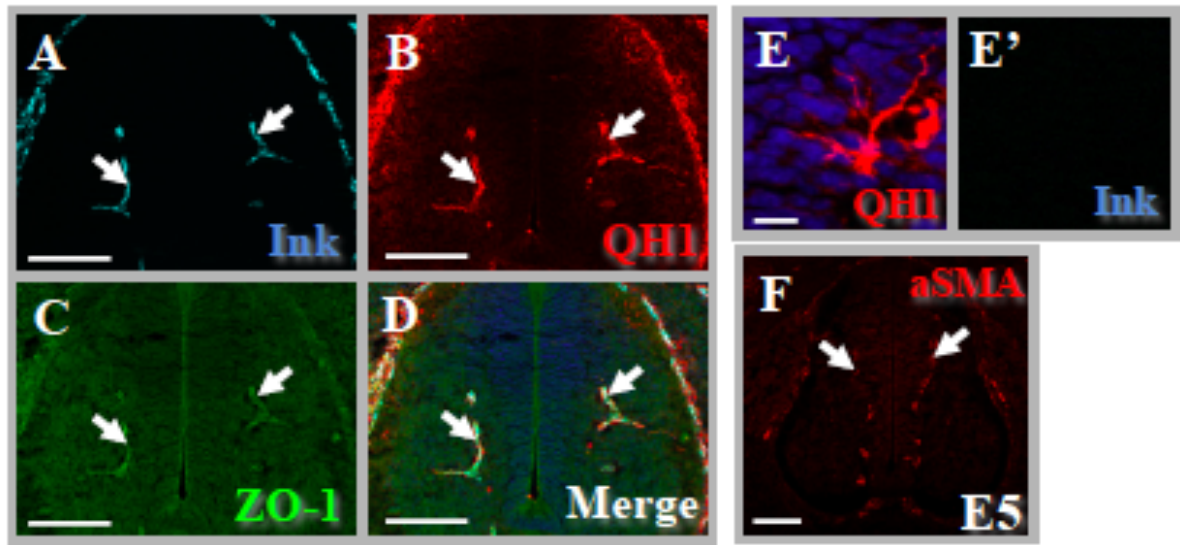


図 3. 蛍光インクインジェクション法は管腔形成された領域の血管を可視化する

(A) 蛍光インクインジェクションにより血管が可視化された発生 4 日目ウズラ胚の脊髓横断組織片像。INVP (矢印) および脊髓周囲の PNVP にシグナル (青) がみられた。(B) ウズラ特異的血管内皮および Angioblast マーカーである QH1 抗体により免疫組織化学染色された発生 4 日目ウズラ胚の脊髓横断組織片像。INVP (矢印) および脊髓周囲の PNVP にシグナル (赤) がみられ、一部 Angioblast らしきシグナルもみられた。(C) 上皮マーカーである抗 ZO-1 抗体により免疫組織化学染色された発生 4 日目ウズラ胚の脊髓横断組織片像。INVP (矢印) および脊髓周囲の PNVP にシグナルがみられた。(D) B-D の Merge 像。ほとんどの領域のシグナルが重なってみえた (矢印)。このことは蛍光インクインジェクションにより可視化される血管は管腔形成された領域であることを示す。(E-E') QH1 抗体による免疫組織化学染色と蛍光インクインジェクションにより可視化された発生 4 日目ウズラ胚の INVP の最先端部の高倍率像。INVP の最先端部 (Tip 細胞の突起) において QH1 のシグナル (赤) はみられたが、インク (青) のシグナルはみられなかった。(F) ペリサイトマーカーである抗 Smooth muscle 抗体により免疫組織化学染色された発生 5 日目ニワトリ胚の脊髓横断組織片像。INVP (矢印) および脊髓周囲の PNVP にシグナル (赤) がみられた。このことは INVP 形成の早期の段階からペリサイトが存在することを示す。スケールバー 100 μ m : A-D 図および F 図、10 μ m : E-E' 図。

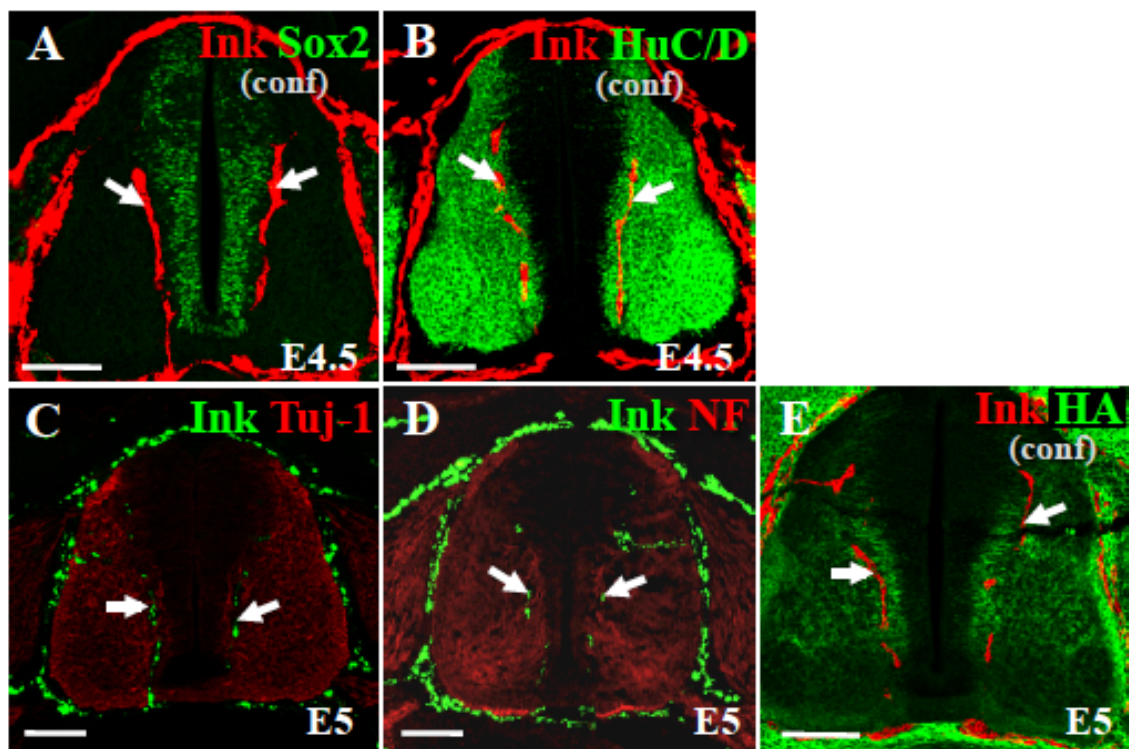


図 4. INVP は神経前駆細胞層と分化神経層の境界付近を走行する

(A) 神経前駆細胞マーカーSox2 (緑) と INVP(赤)を可視化した脊髓横断組織片像 (100 μ m 横断組織片)。INVP は神経前駆細胞層に沿うように走行していた (矢印)。(B) 分化神経細胞マーカーHuC/D (緑) と INVP(赤)を可視化した脊髓横断組織片像 (100 μ m 横断組織片)。INVP は HuC/D 陽性の領域の中でも神経前駆細胞に近い領域を走行していた (矢印)。(C) 分化神経細胞マーカーTuj-1 (赤) と INVP(緑)を可視化した脊髓横断組織片像 (10 μ m 横断組織片)。INVP は HuC/D の横断組織片像と同様に Tuj-1 陽性領域の中でも神経前駆細胞に近い領域を走行していた (矢印)。(D) 分化神経細胞マーカーNeurofilament (NF:赤) と INVP(緑)を可視化した脊髓横断組織片像(10 μ m 横断組織片)。INVP は HuC/D および Tuj-1 の横断組織片像と同様に NF 陽性領域の中でも神経前駆細胞に近い領域を走行していた (矢印)。(E)Intermediate zone (神経前駆細胞から分化神経になる移行期の細胞が蓄積する領域) から分化神経層にかけて蓄積することが知られる Hyaluronan(HA:緑)と INVP(赤)を可視化した脊髓横断組織片像 (100 μ m 横断組織片)。INVP は HA の蓄積が多く見られる Intermediate zone に接するように走行しているようにみえた (矢印)。(A)、(B)、(E) の組織片像に記載した conf はコンフォーカル顕微鏡 (PASCAL) による撮影を指す。スケールバーは全て 100 μ m。

NeuroM

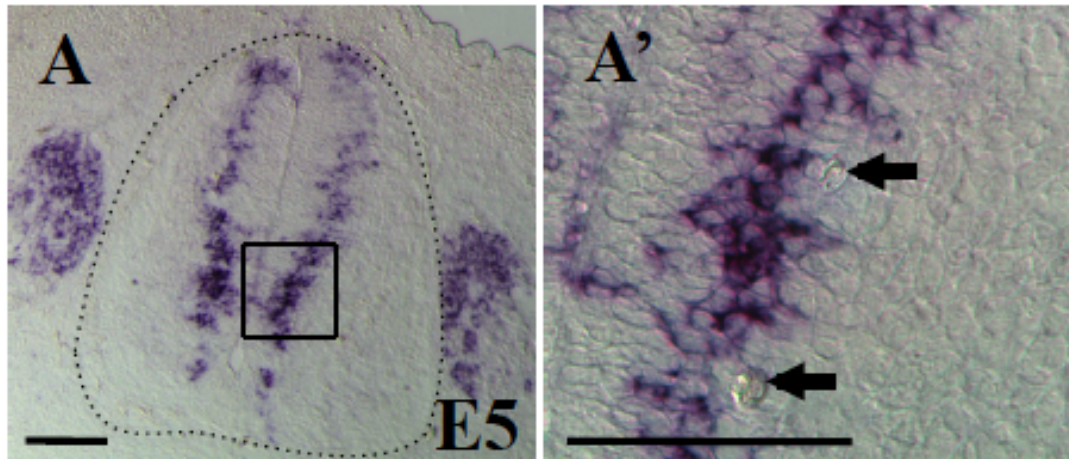


図 5. INVP は Intermediate zone に接するように形成される

(A) 脊髄における NeuroM mRNA の発現パターン。NeuroM mRNA は神経前駆細胞層と分化神経層の境界領域である Intermediate zone に発現がみられた。(A') A の四角で囲まれた領域の高倍率像。INVP (黒矢印) は Intermediate zone に接するように形成されていた。スケールバーは全て 100 μ m。

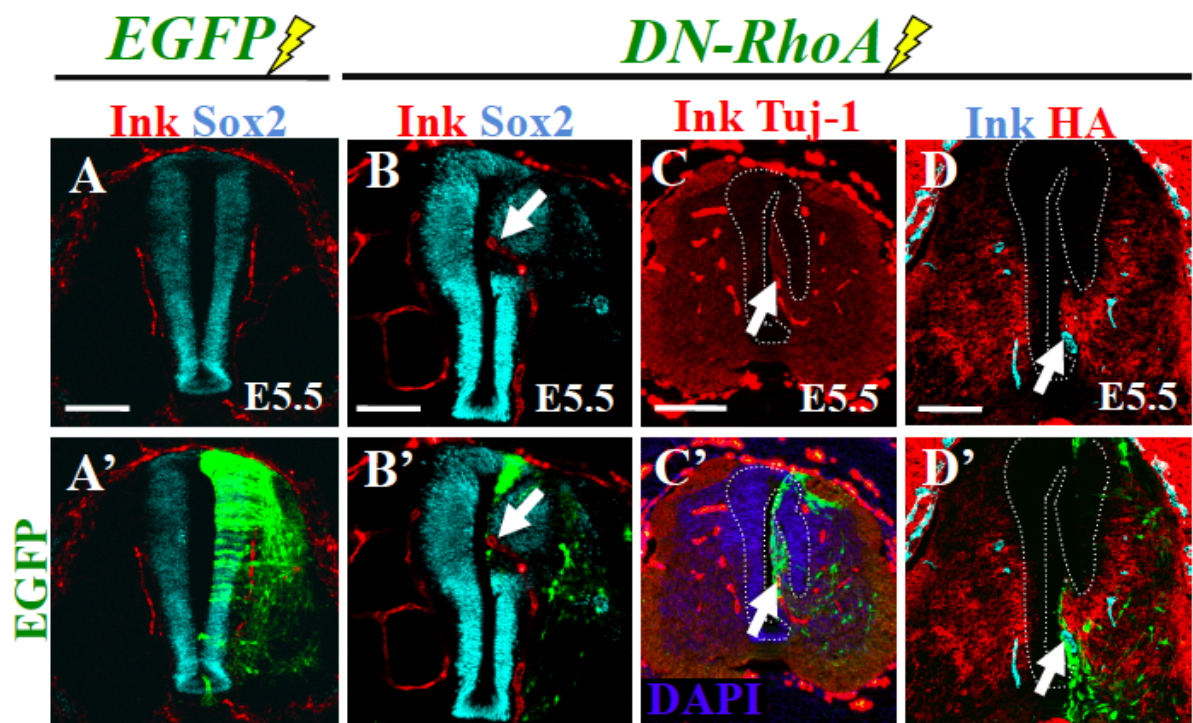


図 6. DN-RhoA の強制発現により一部の神経前駆細胞層は欠損し異所 INVP の形成が起こる

(A-A') コントロールとして EGFP を発現させた脊髄横断組織片像 (Sox2 染色、100 μ m 横断組織片)。EGFP 発現領域 (A' 図、緑) における神経前駆細胞 (青) の欠損はみられず異所 INVP 形成 (赤) もみられなかった。(B-B') Dominant negative 型 RhoA (DN-RhoA) を発現させた脊髄横断組織片像 (Sox2 染色、100 μ m 横断組織片)。DN-RhoA 発現領域 (B' 図、緑) において神経前駆細胞層の一部欠損がみられた。加えて、神経前駆細胞層の欠損部において異所 INVP 形成 (赤、矢印) がみられた。(C-C') Dominant negative 型 RhoA (DN-RhoA) を発現させた脊髄横断組織片像 (Tuj-1 染色、10 μ m 横断組織片)。DN-RhoA 発現領域 (C' 図、緑) において神経前駆細胞層の一部欠損がみられ、異所 INVP 形成 (赤、矢印) が起きていた。この領域では異所的な神経分化 (神経前駆細胞欠損部の薄い赤) が起こっていた。点線で囲まれた領域は神経前駆細胞層を示す。(D-D') Dominant negative 型 RhoA (DN-RhoA) を発現させた脊髄横断組織片像 (HA 染色、10 μ m 横断組織片)。DN-RhoA 発現領域 (D' 図、緑) において神経前駆細胞層の一部欠損がみられた。この領域では HA の蓄積 (神経前駆細胞欠損部の赤) が多くみられた。加えて、異所 INVP 形成 (青、矢印) は HA の蓄積が多くみられる所で起こっているようにみえた。点線で囲まれた領域は神経前駆細胞層を示す。スケールバーは全て 100 μ m。

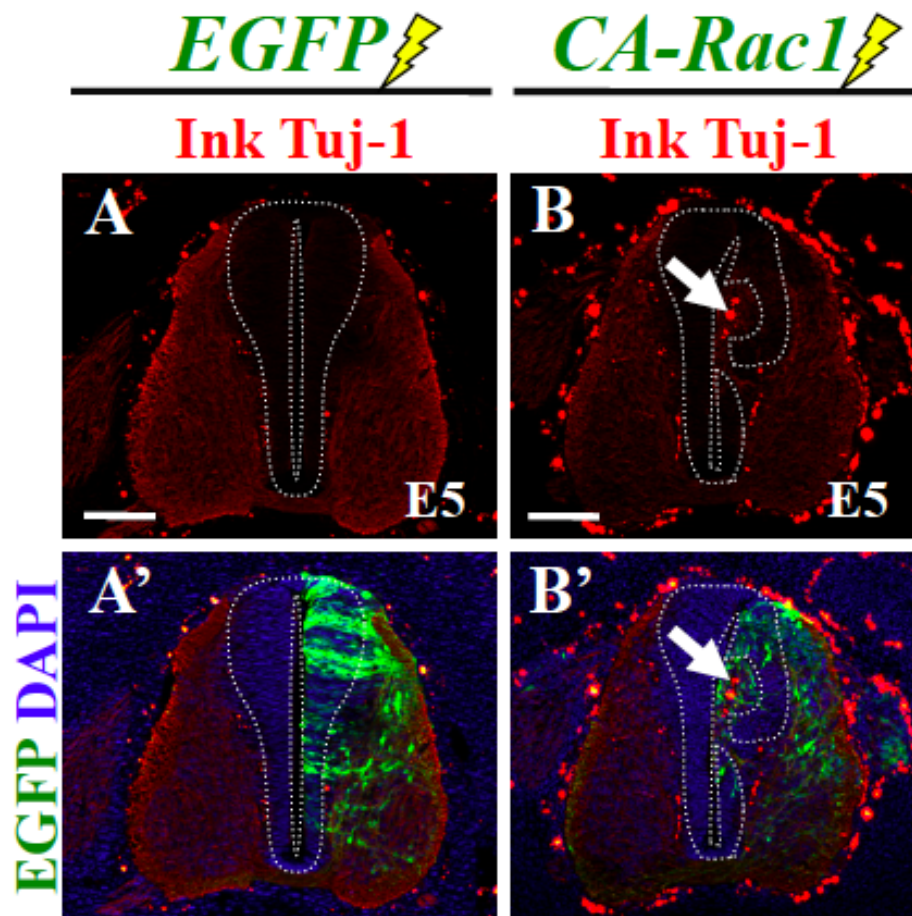


図 7. CA-Rac1 の強制発現においても一部の神経前駆細胞層は欠損し異所 INVP の形成が起こる

(A-A') コントロールとして EGFP を発現させた脊髓横断組織片像 (Tuj-1 染色、10 μ m 横断組織片)。EGFP 発現領域 (A'図、緑) における神経前駆細胞 (青) の欠損はみられず異所 INVP 形成 (赤) もみられなかった。また、神経前駆細胞層における異所的な神経分化は起こっていなかった。(B-B') Constitutively active 型 Rac1 (CA-Rac1) を発現させた脊髓横断組織片像 (Tuj-1 染色、10 μ m 横断組織片)。CA-Rac1 発現領域 (B'図、緑) において神経前駆細胞層の一部欠損がみられた。この領域では異所的な神経分化 (神経前駆細胞欠損部の薄い赤) が起こっていた。点線で囲まれた領域は神経前駆細胞層を示す。加えて、神経前駆細胞層の欠損部において異所 INVP 形成 (赤、矢印) がみられた。スケールバーは全て 100 μ m。

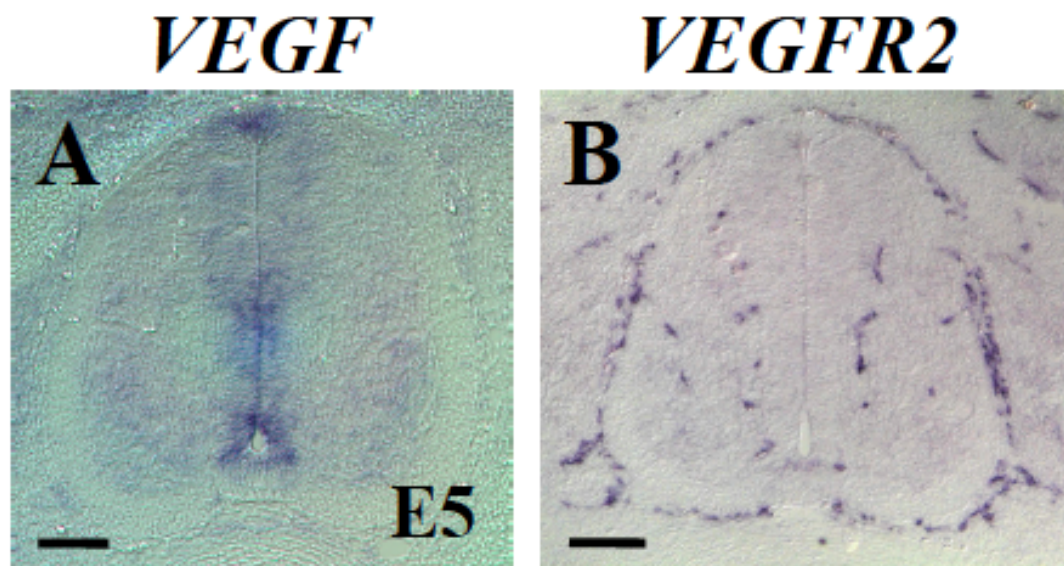
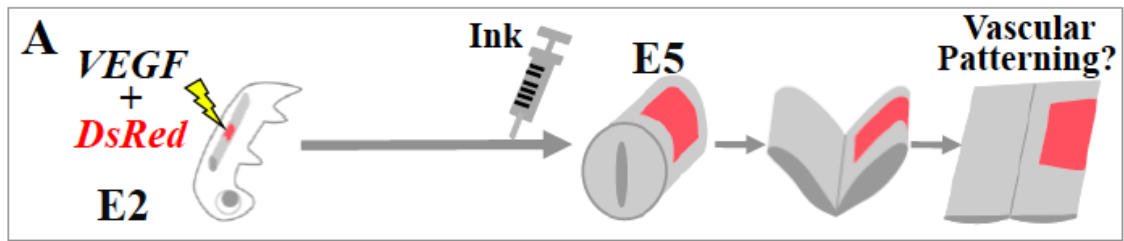
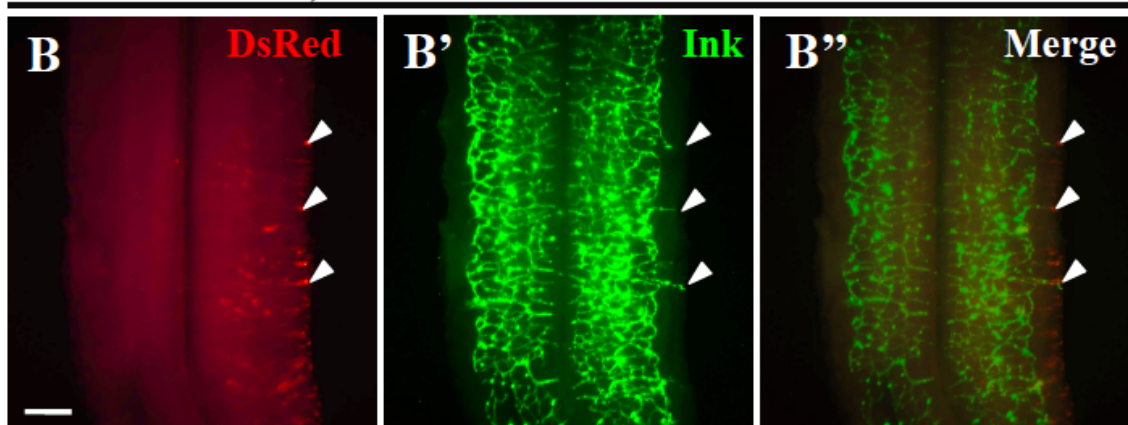


図 8. VEGF mRNA は神経前駆細胞領域に発現し、VEGFR2 mRNA は INVP に発現する

(A) 脊髄における VEGF mRNA の発現パターン (in situ hybridization)。VEGF mRNA は神経前駆細胞層に発現がみられた。(B) 脊髄における VEGFR2 mRNA の発現パターン (in situ hybridization)。VEGFR2 mRNA は INVP と脊髄周囲の Peri-neural vascular plexus(PNVP)に発現がみられた。スケールバーは全て 100μm。



⚡ **VEGF + DsRed**



VEGF + EGFP ⚡

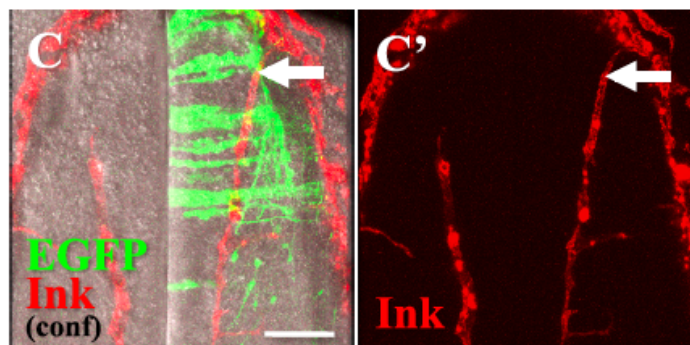


図 9. VEGF は脊髄内に侵入後の INVP の誘引伸長に十分である

(A) VEGF エレクトロポレーションとその解析方法の模式図。胚発生 2 日目の神経管にエレクトロポレーションを行い、その後、胚発生 5 日まで発生を進め、オープンブックによる解析を行った。(B-B'') 脊髄背側領域に局限して VEGF と DsRed を共発現させた際のオープンブック像。本来血管伸長の見られない背側領域に局限して DsRed を発現させた領域 (赤、矢頭) において、その領域に向かって伸びている INVP が見られた。このことは VEGF が脊髄内に侵入後の INVP の誘引伸長に十分であることを示す。(C-C') VEGF と EGFP を共発現させた脊髄横断組織片像。脊髄背側に多くの VEGF が導入 (緑) されると INVP (赤、矢印) はより背側へと伸長した。スケールバー: B-B'' 図は 200 μ m、

C-C'図は 100 μ m。

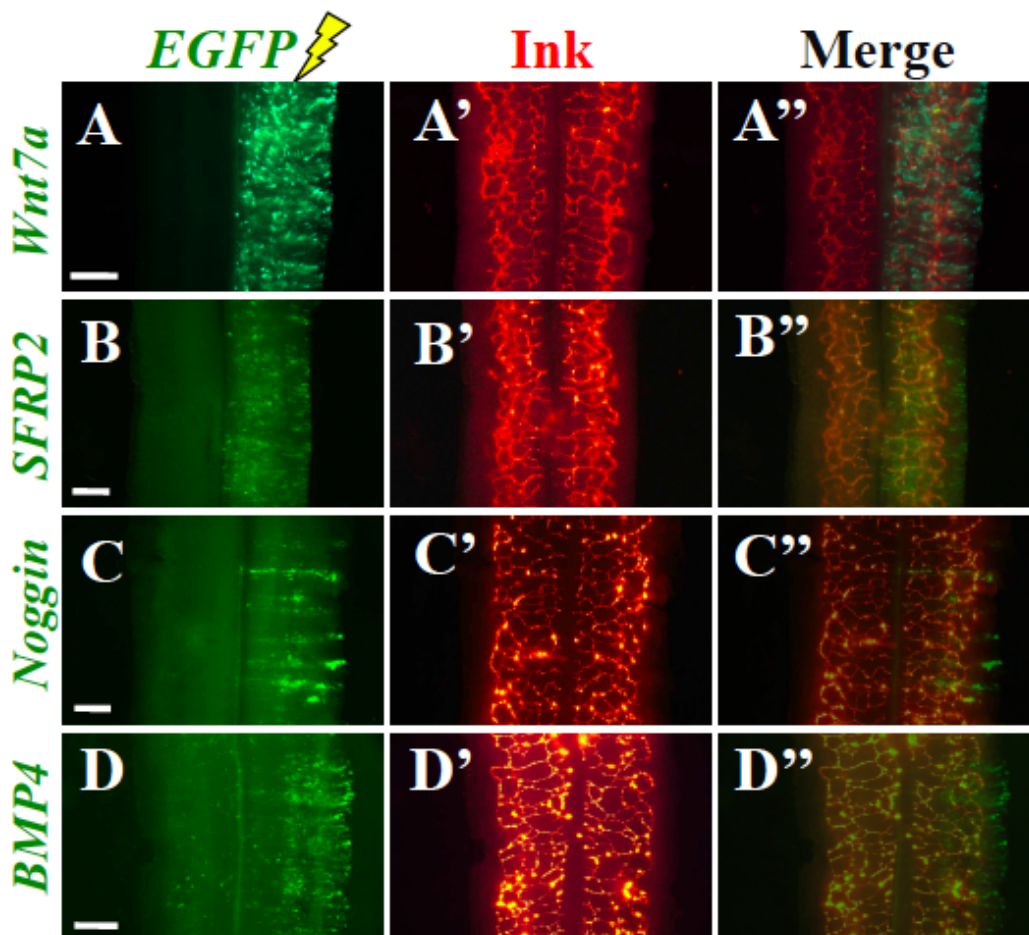


図 10. Wnt7a、SFRP2、Noggin および BMP4 の脊髄への強制発現において INVP 形成に顕著な変化はみられない

(A-A'') Wnt7a を発現させた際のオープンプック像。Wnt7a を発現させた領域（緑）において、INVP 形成（赤）に顕著な変化はみられなかった。(B-B'') SFRP2 を発現させた際のオープンプック像。SFRP2 を発現させた領域（緑）において、INVP 形成（赤）に顕著な変化はみられなかった。(C-C'') Noggin を発現させた際のオープンプック像。Noggin を発現させた領域（緑）において、INVP 形成（赤）に顕著な変化はみられなかった。(D-D'') BMP4 を発現させた際のオープンプック像。BMP4 を発現させた領域（緑）において、INVP 形成（赤）に顕著な変化はみられなかった。スケールバーは全て 200 μ m。

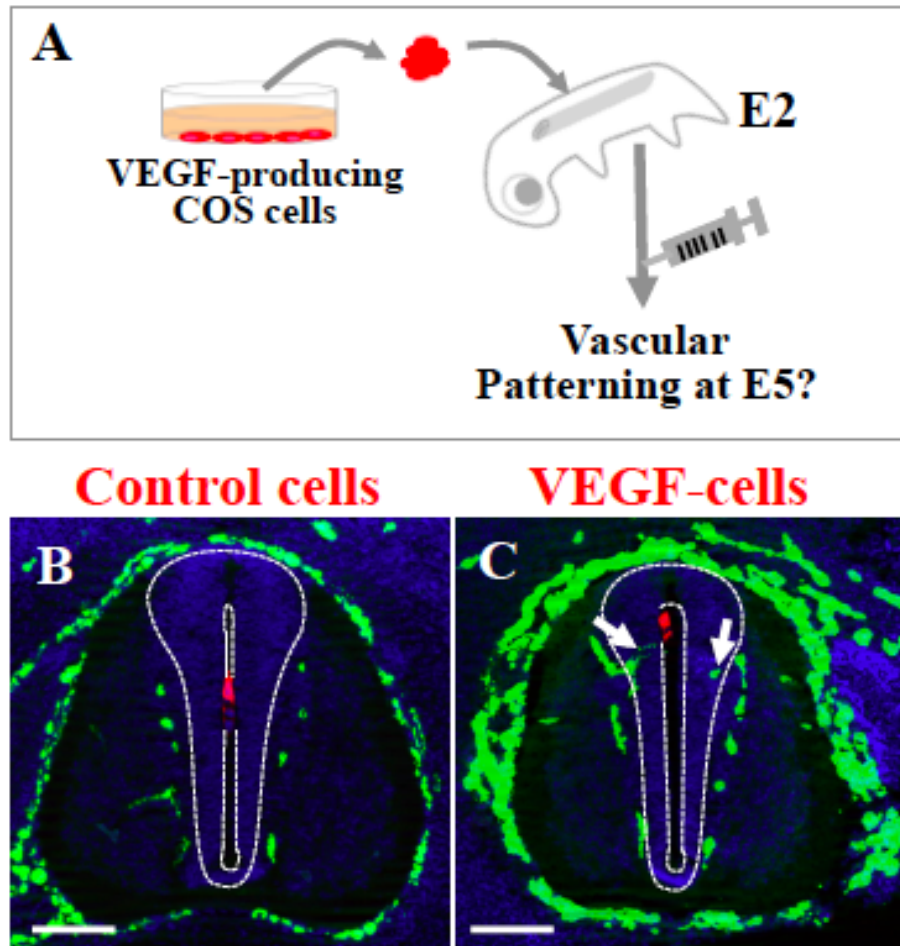


図 11. 神経前駆細胞層にみられる非血管形成は単なる物理的障壁のみでつくられているわけではない

(A) VEGF 産生 COS 細胞を脊髄内腔に移植する実験の模式図。VEGF 産生 COS 細胞を発生 2 日目胚の脊髄内腔に移植し、胚発生 5 日目まで発生を進めた後に蛍光インクインジェクションを行い、横断組織片にして解析を行った。(B) コントロールとして Tomato 産生 COS 細胞（赤）を脊髄内腔に移植した脊髄横断組織片像。神経前駆細胞層内に INVP（緑）の侵入はみられなかった。(C) VEGF 産生 COS 細胞（Tomato も共発現する：赤）を脊髄内腔に移植した脊髄横断組織片像。VEGF 産生 COS 細胞に向かって異所的に INVP が形成され、非血管形成領域である神経前駆細胞層に侵入した。このことは神経前駆細胞の非血管形成領域が単なる物理的障壁のみでつくられているわけではないことを示唆する。スケールバーは全て 100 μ m。

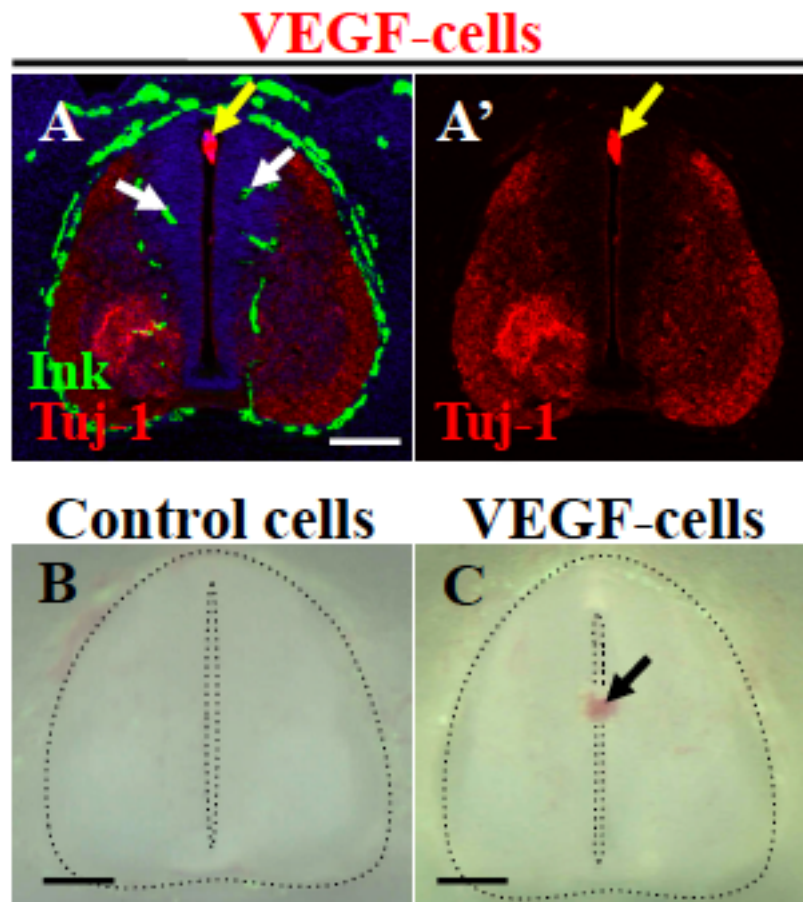


図 12. VEGF 産生 COS 細胞の脊髄内腔への移植により神経前駆細胞層に侵入した INVP は出血を引き起こす

(A-A') VEGF 産生 COS 細胞（脊髄内腔の赤、黄色矢印）を脊髄内腔に移植した脊髄を TuJ-1 抗体により免疫組織化学染色した際の横断組織片像。神経前駆細胞層に異所的に侵入した INVP（緑、白矢印）の周囲に分化神経細胞はみられなかった。(B) コントロールとして Tomato 産生 COS 細胞を脊髄内腔に移植した脊髄横断組織片像（明視野）。脊髄内腔に出血はみられなかった。(C) VEGF 産生 COS 細胞を脊髄内腔に移植した脊髄横断組織片像（明視野）。脊髄内腔に出血がみられた。神経前駆細胞層が非血管形成領域となっているのは脊髄内腔への出血を防ぐ役割を担っていることを示しているのかもしれない。スケールバーは全て 100 μ m。

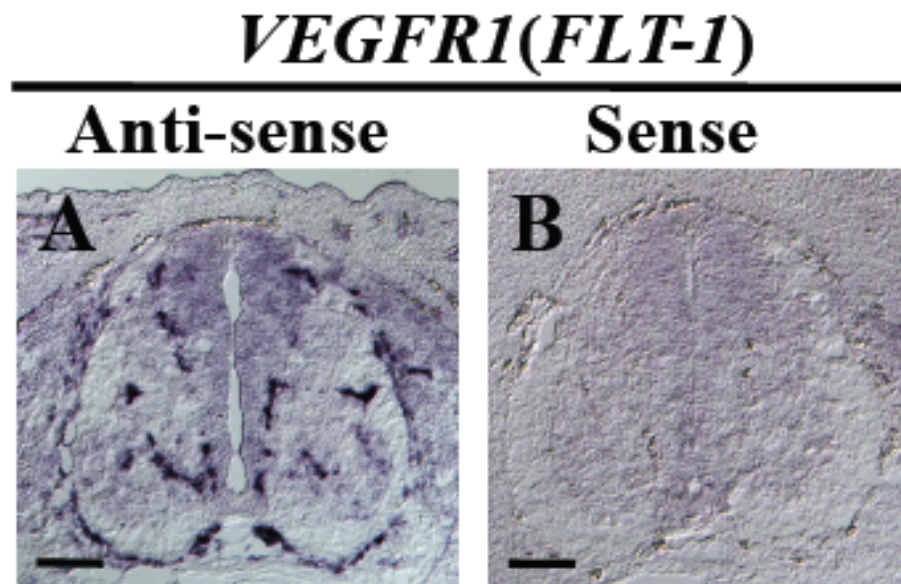


図 13. VEGFR1 mRNA は INVP に発現する

(A) 脊髄における VEGFR1(FLT-1)mRNA の発現パターン (in situ hybridization)。VEGFR1 mRNA は INVP および PNVP に発現がみられた。(B) VEGFR1 in situ hybridization のネガティブコントロールとして VEGFR1 mRNA の sense 鎖をプローブとして in situ hybridization を行った脊髄横断組織片像。脊髄およびその周囲に有意なシグナルはみられなかった。スケールバーは全て 100 μ m。

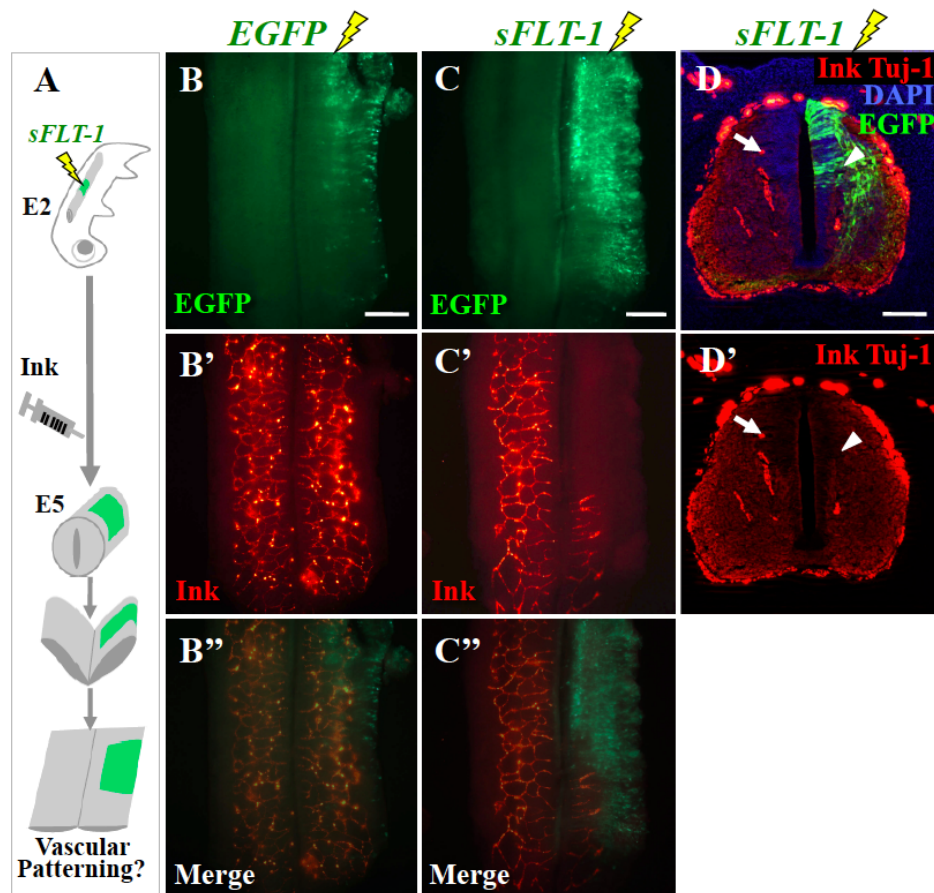


図 14. sFLT-1 の強制発現は脊髄腹側から侵入時のみならず、背側方向に伸長する INVP 形成も阻害する

(A) エレクトロポレーションにより sFLT-1 を脊髄内に強制発現させる実験の模式図。胚発生 2 日目の神経管にエレクトロポレーションを行い、INVP 形成が行われる胚発生 5 日目においてインクインジェクションを行い、オープンブック法および脊髄横断組織片による解析を行った。(B-B'') コントロールとして EGFP を発現させた脊髄のオープンブック像。EGFP 発現領域（緑）において INVP（赤）は脊髄背側の約 4 分の 1 の領域を残す所まで伸長していたが、この約 4 分の 1 の領域には INVP の侵入はみられなかった。(C-C'') sFLT-1 を発現させた脊髄のオープンブック像。sFLT-1 発現領域（緑）において INVP 形成（赤）が阻害されていた。これらの像は脊髄侵入時のみならず、背側方向伸長する INVP 形成にも必要であることを示す。(D-D') sFLT-1 を発現させた脊髄の横断組織片。sFLT-1 が発現されていない領域においては背側方向への INVP 形成が起こる（矢印）のに対して、sFLT-1 を発現させた領域においては INVP 形成が阻害された(矢頭)。また、Tuj-1 抗体による免疫組織化学染色（脊髄内分化神経層にみられる薄い赤）の結果、分化神経層が減少しているようにみえた。このことは INVP が神経分化に寄与する可能性を示す。スケールバー：

B-B''図および C-C''図は 200 μ m、D-D'図は 100 μ m。

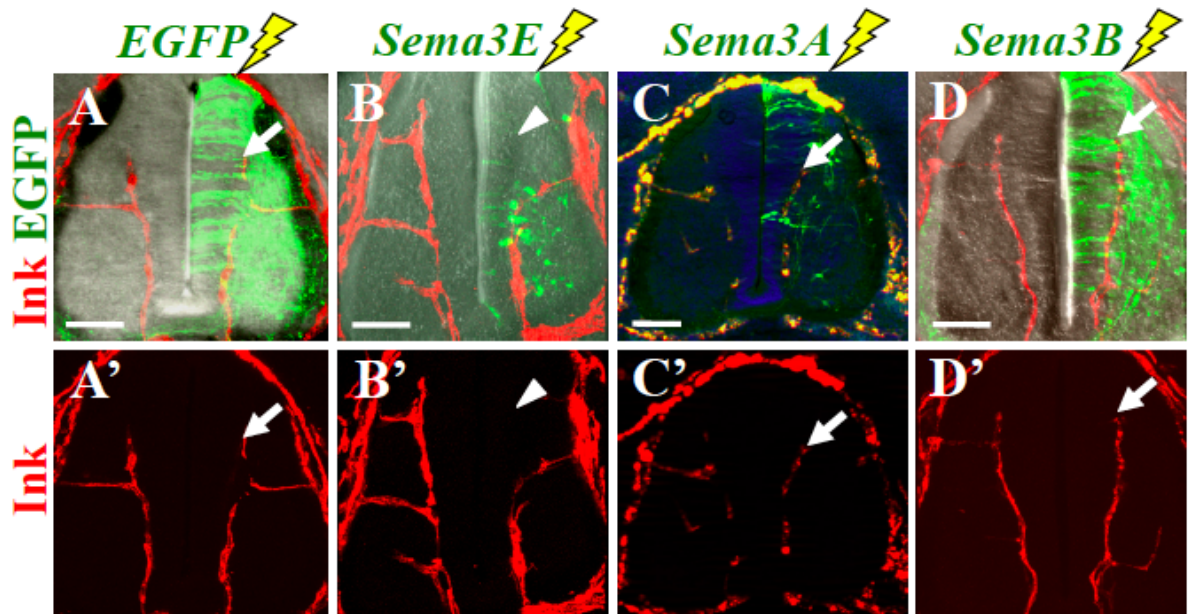


図 15. Sema3E は INVP の伸長を抑制するのに十分である

(A-A') コントロールとして EGFP を発現させた脊髓横断組織片像。EGFP 発現領域 (A 図、緑) において INVP (矢印) は正常に形成されていた。(B-B') Sema3E を発現させた脊髓横断組織片像。Sema3E を発現させた領域 (B 図、緑) より先、つまり背側方向には INVP (矢頭) の伸長が起こらなかった。このことは Sema3E が INVP の伸長を抑制するのに十分であることを示している。

(C-C') Sema3A を発現させた脊髓横断組織片像。Sema3A を発現させた領域 (C 図、緑) において INVP (矢印) は正常に形成されていた。(D-D') Sema3B を発現させた脊髓横断組織片像。Sema3B を発現させた領域 (D 図、緑) において INVP (矢印) は正常に形成されていた。スケールバーは全て 100 μ m。

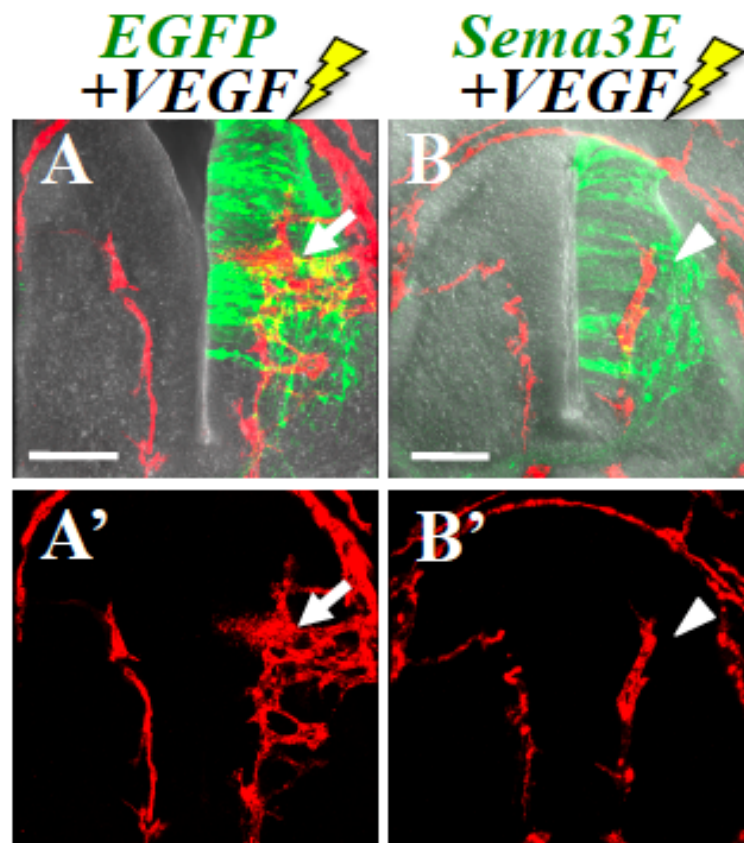


図 16. Sema3E は VEGF シグナルを介した INVP 形成を抑制するのに十分である

(A-A') VEGF と EGFP を共発現させた脊髄横断組織片像。VEGF と EGFP を共発現領域 (A 図、緑) において過剰な INVP 形成 (矢印) がみられた。(B-B') VEGF と Sema3E を共発現させた脊髄横断組織片像。VEGF と Sema3E を共発現させた領域 (B 図、緑) において、VEGF と EGFP の共発現実験においてみられた過剰な INVP 形成はみられなかった (矢頭)。このことは Sema3E が VEGF シグナルを介した INVP 形成を抑制するのに十分であることを示す。スケールバーは全て 100 μ m。

Sema3E mRNA

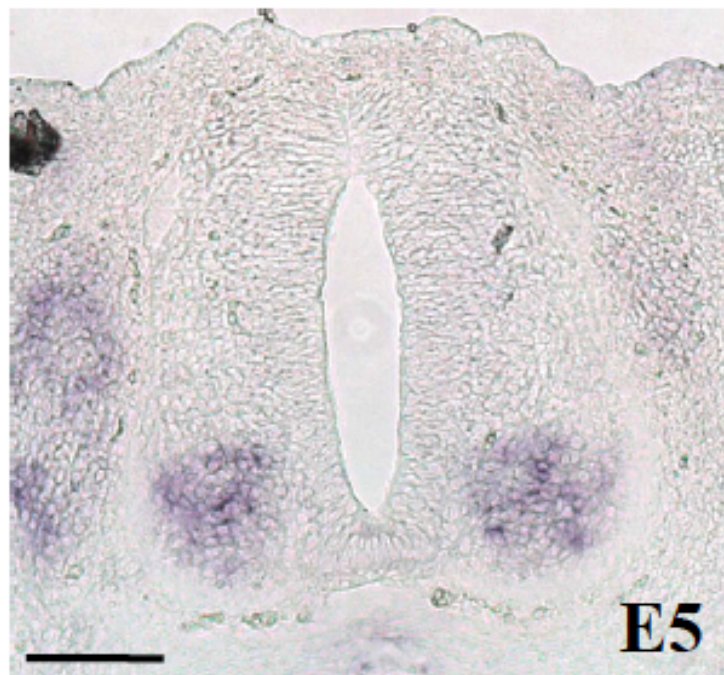


図 17. **Sema3E mRNA** は神経前駆細胞領域に発現が見られず **motor neuron** に発現する

脊髄における **Sema3E mRNA** の発現パターン (in situ hybridization)。Sema3E mRNA は神経前駆細胞領域に発現が見られず **motor neuron** に発現していた。スケールバーは 100 μ m。

Model

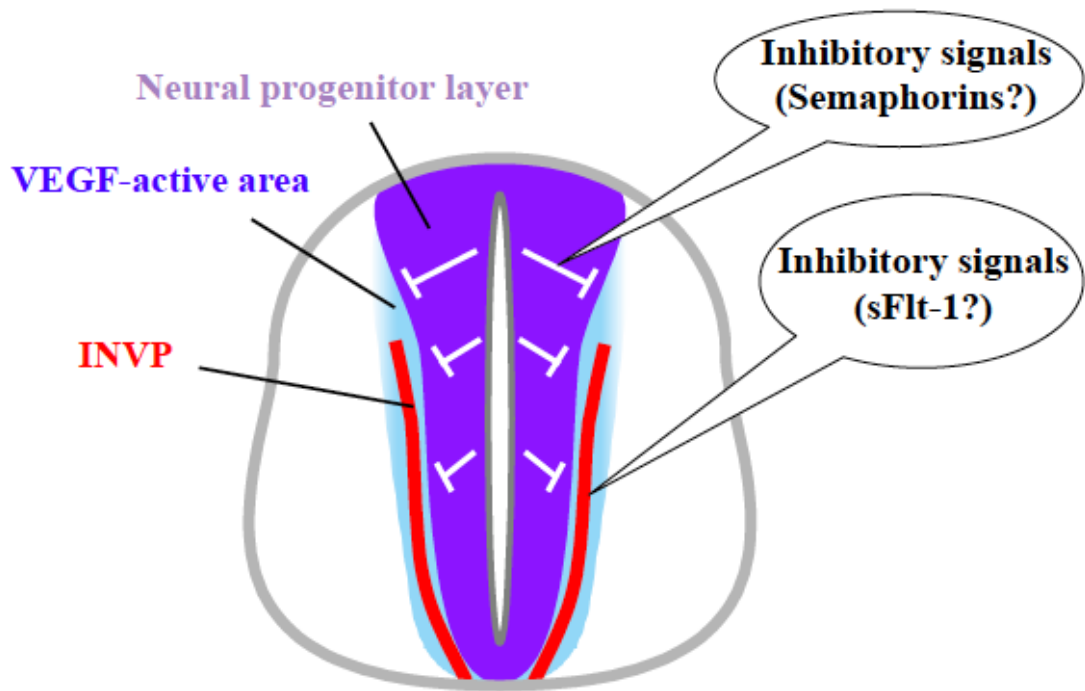


図 18. 血管誘引分子 VEGF と血管形成抑制分子 sFlt-1 あるいは細胞反発分子 Semaphorins によって想定される INVP パターニングの分子モデル

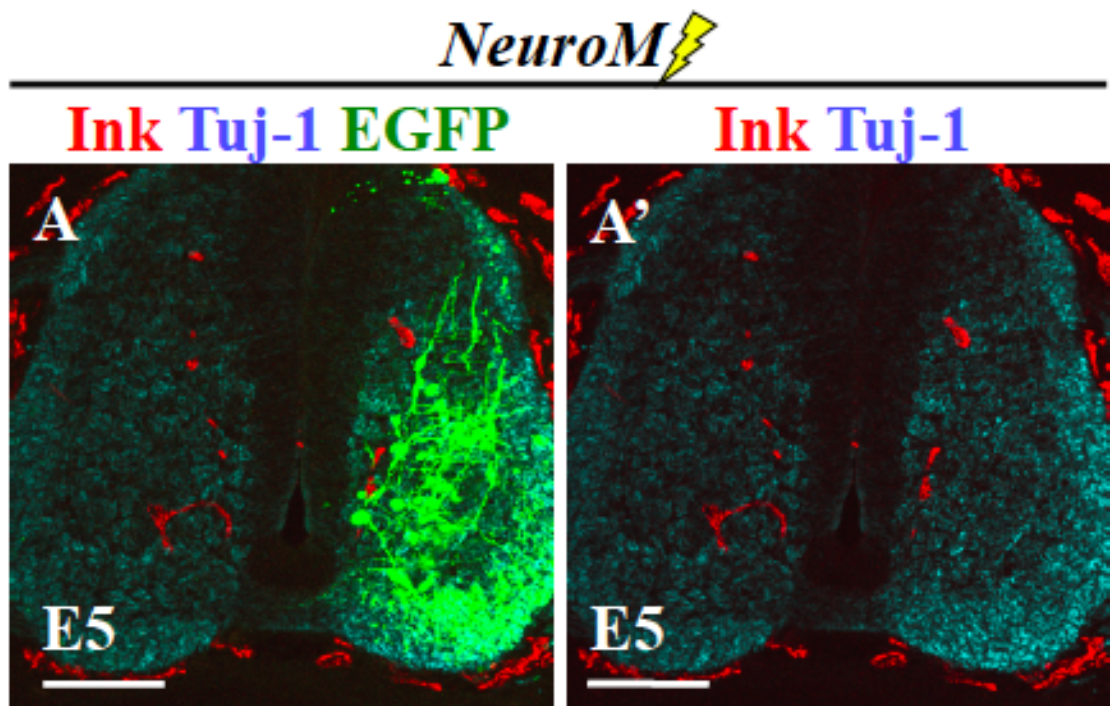


図 19. NeuroM の強制発現は神経分化を促進するが、INVP 形成に顕著な変化を与えない

(A-A') NeuroM を強制発現させた脊髄横断組織片像。Tuj-1 抗体による免疫組織化学染色を行った。NeuroM を発現させた細胞 (A 図、緑) はほとんどが分化神経層 (青) へと移行していた。このことは NeuroM が神経分化を促進していることを示す。また、脊髄腹側から伸びる INVP (赤) の形成に顕著な変化は見られなかった。スケールバーは全て 100 μ m。

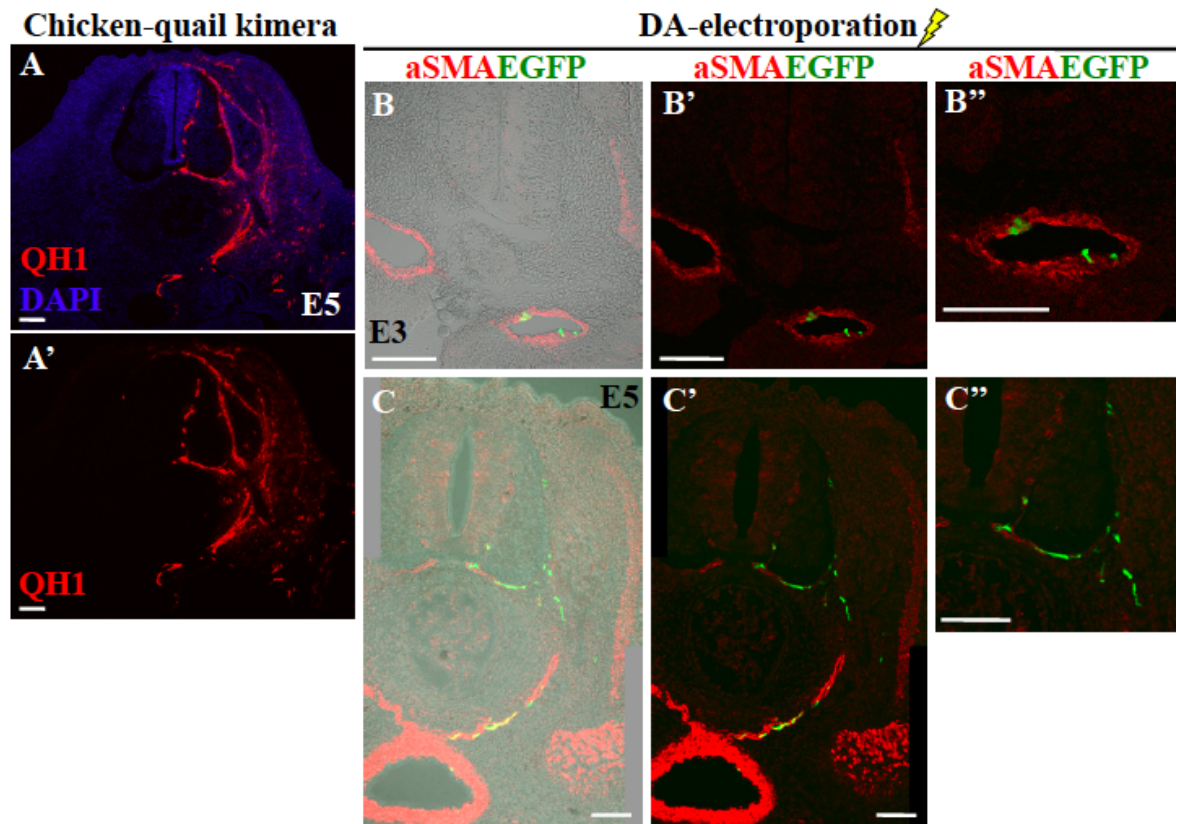


図 20. INVP の少なくとも一部は背側大動脈を介して形成されうる

(A-A') ニワトリ-ウズラ間体節中胚葉交換移植キメラの横断組織片像。胚発生 1.5 日目ニワトリ胚 (ホスト) に胚発生 1.5 日目ウズラ胚 (ドナー) の体節中胚葉交換移植を行い胚発生 5 日目まで発生を進めた後、その胚の横断組織片を QH-1 抗体を用いて免疫組織化学染色した。INVP および背側大動脈(Adams and Alitalo)に QH-1 シグナル (赤) が見られ、INVP および DA が体節中胚葉由来であることを確認した。(B-B'') 胚発生 1.75 日から 2 日目までのニワトリ胚の DA に EGFP 発現プラスミドをエレクトロポレーションし、胚発生 3 日目まで発生を進めた胚を横断組織片にし、抗 aSMA 抗体を用いて免疫組織化学染色した。EGFP シグナル (緑) は DA においてみられ、体節が存在した領域には見られなかった。(C-C'') 胚発生 1.75 日から 2 日目までのニワトリ胚の DA に EGFP 発現プラスミドをエレクトロポレーションし、胚発生 5 日目まで発生を進めた胚を横断組織片にし、抗 aSMA 抗体を用いて免疫組織化学染色した。INVP において EGFP シグナルが見られた。このことは INVP の少なくとも一部は背側大動脈を介して形成される可能性を示唆する。スケールバー: (A-A') および (C-C'') は 100 μ m、(B-B'') は 50 μ m。

Movie（全て立体構築像）

Movie. 1

抗 Sox2 抗体による免疫組織化学染色と蛍光インクインジェクション後の脊髄横断組織片の立体構築像（厚み 20 μ m）。

Movie. 2

抗 HuC/D 抗体による免疫組織化学染色と蛍光インクインジェクション後の脊髄横断組織片の立体構築像（厚み 20 μ m）。

Movie. 3

HA-probe による免疫組織化学染色と蛍光インクインジェクション後の脊髄横断組織片の立体構築像（厚み 20 μ m）。

Movie. 4

EGFP エレクトロポレーション。

抗 Sox2 抗体による免疫組織化学染色と蛍光インクインジェクション後の脊髄横断組織片の立体構築像（厚み 50 μ m）。

Movie. 5

DN-RhoA エレクトロポレーション。

抗 Sox2 抗体による免疫組織化学染色と蛍光インクインジェクション後の脊髄横断組織片の立体構築像（厚み 50 μ m）。

Movie. 6

DN-RhoA エレクトロポレーション。

HA-probe による免疫組織化学染色と蛍光インクインジェクション後の脊髄横断組織片の立体構築像（厚み 40 μ m）。

Movie. 7

VEGF エレクトロポレーション。

蛍光インクインジェクション後の脊髄横断組織片の立体構築像（厚み 70 μ m）。

Movie. 8

EGFP エレクトロポレーション。

蛍光インクインジェクション後の脊髄横断組織片の立体構築像（厚み 70 μ m）。

Movie. 9

Sema3E エレクトロポレーション。

蛍光インクインジェクション後の脊髄横断組織片の立体構築像（厚み 70 μ m）。

Movie. 10

Sema3E エレクトロポレーション（腹側に限局）。

蛍光インクインジェクション後の脊髄横断組織片の立体構築像（厚み 70 μ m）。

Movie. 11

Sema3B エレクトロポレーション。

蛍光インクインジェクション後の脊髄横断組織片の立体構築像（厚み 70 μ m）。

Movie. 12

EGFP+VEGF エレクトロポレーション。

蛍光インクインジェクション後の脊髄横断組織片の立体構築像（厚み 70 μ m）。

Movie. 13

EGFP+VEGF エレクトロポレーション。

蛍光インクインジェクション後の脊髄横断組織片の立体構築像（厚み 70 μ m）。

考察

INVP 走行ルートの規定

本研究では、トリ胚において脊髄腹側から侵入してくる INVP が神経前駆細胞層と分化神経（ニューロン）層の間の領域を通る決まった走行ルートもつことを明らかにした。また、その血管パターン形成において、脊髄の神経前駆細胞層が重要な役割を担っており、血管非形成領域を形成すること、さらに、その血管非形成領域は神経前駆細胞層の単なる物理的な障壁によるものだけではなく、何らかの分子メカニズムによって形成されうるものであることを示してきた。また、その分子メカニズムとして、血管誘引分子 VEGF と血管形成抑制分子 sFlt1 あるいは細胞反発分子 Sema3E を用いた解析から、一つの生体内分子モデルを提示するなどしてきた。ここでは本研究で得られた結果および文献から考えられる本研究の問題点や将来的な展望などについて考察する。

(1) 神経前駆細胞が血管非形成領域を生み出すことの生物学的意義

神経前駆細胞が血管非形成領域を作ることには一体どのような意味があるのか。一つの可能性は、VEGF 産生細胞移植実験（図 12）で示したように、脊髄内腔への出血を防ぐことが考えられる。脊髄内腔は脳脊髄液 (cerebrospinal fluid: CSF) で満たされており、通常、脳脊髄液の中には血液が混入することはない。脳脊髄液に血管が侵入することは、脳脊髄液の内圧に変化を与えることにつながり、様々な疾患を引き起こすと予想される。近年では胚発生期における脳脊髄液の漏出を引き起こすマウスにおいて、脳脊髄液の漏出が前脳の奇形を引き起こす報告がなされている (Nonomura et al., 2013)。そうしたことを防ぐために神経前駆細胞層に血管非形成領域が形成されているのかもしれない。また、別の可能性として、血管非形成領域が神経前駆細胞の未分化状態を維持するのに必要であることが考えられる。神経前駆細胞の未分化状態の維持には低酸素状態 (HIF-Notch シグナル) が重要であることが知られている (Gustafsson et al., 2005)。実際にトリ胚の神経前駆細胞層においても血管の侵入が見られる発生 4 日目胚の時点で低酸素状態に陥っているようである (Naňka et al., 2006)。本研究の脊髄への sFlt-1 の強制発現実験においても血管の減少が分化神経層の減少を引き起こしているようにみえた（図 14）。また、このときの減少がアポトーシスによるものではないことも確認している。これらのことは血管が神経分化、特に神経前駆細胞の未分化維持に重要な役割を果たしていることを示している。

しかしながら、VEGF 産生細胞移植実験において神経前駆細胞層内に異所血管を形成させた際、その周囲に異所的な神経分化は見られなかった（図 12）。このことは先の結果と矛盾するように思える。考えられる可能性として、異所血管の周囲で神経分化が促進されていたとしても分化した神経はすぐに神経前駆細胞層領域から分化神経領域へと移動してしまうために、異所的に分化した神経の状態を捉えることができなかった、あるいは、形成された異所血管の量が十分でなく、神経前駆細胞層の低酸素状態を解除するのに不十分であったことなどが考えられる。これらを解決する方法として、前者の場合、神経前駆細胞から分化神経に移行する際に見られる神経分化マーカー (NeuroM) などを使う、後者の場合にはより多くの異所血管形成をさせる実験系を立ち上げる必要性がありそうである。いずれにせよ、神経前駆細胞の分化状態と血管の間には密接な関係があることがいくつか報告されていることから今後の研究発展が期待される (Mackenzie and Ruhrberg, 2012)。

（2）血管誘引分子 VEGF と血管形成抑制分子 sFlt-1 あるいは細胞反発分子 Sema3E から提示したモデルは生体内で起こりうるものであるのか

本論文で提示しているのは、VEGF と反作用する分子のバランスによって INVP のパターンを決定するというもの（図 18）であるが、実際に生体内で、このようなことが起こりうるものなのか。本研究における問題点とともに考察していきたい。

まず、VEGFR1 のスプライシングバリエーション型である sFlt-1 に関する報告で、角膜が血管非形成領域であることは sFlt-1 の作用によるものであるという報告がある (Ambati et al., 2006)。この報告では角膜において VEGF が発現しているにも関わらず、同じく角膜に発現する sFlt-1 が VEGF を中和することで血管非形成領域を生み出していることを sFlt-1 のノックダウン、VEGFR1 コンディショナルノックアウトマウスによる解析、あるいは *corn1* ノックアウトマウス (Smith et al., 1996) もしくは Pax6 のヘテロノックアウトマウス (Ramaesh et al., 2003) (*corn1* と Pax6 のミュータントマウスは角膜にて血管形成が起きるマウス) と sFlt-1-Fc を用いたレスキュー実験から証明している。また、海洋性哺乳類のマナティーは角膜に唯一、血管ができる動物として知られている (Harper et al., 2005) が、マナティーは sFlt-1 を角膜で発現していない (Ambati et al., 2006)。このようなことから VEGF と sFlt-1 が反作用することで血管パターンを規定する可能性は十分に考えられる。本研究では sFlt-1 が INVP に発現しうることを示し、強制発現実験から脊髄内に侵入した後の INVP 形成を抑制するのに十分であることを示した（図 14）。sFlt-1 あるいは VEGFR1 は VEGF の INVP への作

用を調節することで適切な血管パターン形成に寄与するようである。また、sFlt-1 が神経前駆細胞層に蓄積した場合、血管非形成領域を生み出すメカニズムになりうるかもしれない。

本研究の課題の一つとして INVP に発現する *VEGFR1 mRNA* が膜貫通型 VEGFR1 の発現を見ているのか sFlt-1 の発現を見ているのか分けきれていない点がある。VEGFR1 と sFlt-1 の発現の違いについては、in situ hybridization によって発現の違いを調べることを試みたが、有意な結果は得られていない。このことはニワトリ VEGFR1 と sFlt-1 の配列の違いが約 30 アミノ酸残基と短いことが原因と考えられる(Yamaguchi et al., 2002)が、これらの違いを調べるには RT-PCR による解析を行うか抗体を用いた免疫組織化学染色あるいはウェスタンブロットによる解析が有効であるかもしれない。

次に、Semaphorin に関して、Semaphorin 3 family は基本的に VEGF に対する補助受容体でもある Neuropilin を介して細胞内にシグナルを伝達する受容体 Plexin に結合する(Staton, 2011)。また、Neuropilin は Neuropilin-1 (NRP1) と Neuropilin-2 (NRP2) が存在することが知られ、NRP1 の Sema3 結合ドメインと NRP2 を欠損させたマウスにおいて、血管形成に異常が起きないことが知られている(Vieira et al., 2007)。ただし、Semaphorin 3 family の中でも例外的に、Neuropilin に結合せず、直接的に PlexinD1 に結合できるのが Sema3E である(Gu et al., 2005)。このような違いが Semaphorin 3 family の中でも、Sema3E のみが INVP 形成を抑制するのに十分であった理由であると考えられる (図 15)。しかしながら、Sema3E が本来の神経前駆細胞層の血管非形成領域をつくっている因子である可能性は低いと思われる。その理由は、胚発生 4 日目の時点で Sema3E は神経前駆細胞層には発現していないように見えるからである (図 17)。もし、本論文中で提示した生体内分子モデルが本来の発生過程で成立する可能性がある場合、候補因子としては Sema6A などが挙げられる。Sema6A はマウスにおいて、神経前駆細胞層に発現することが知られている(Gu et al., 2005)。また、Semaphorin 3 family と違って、Semaphorin 6 family は直接的に Plexin と結合することができる(Nogi et al., 2010)。

いずれにせよ Sema3E が脊髄において INVP に作用できることを示したことは医学的にも重要なことである。脊髄内の血管パターンニングにはいまだ未知な部分があり、今後の研究発展が期待される。

(3) Sema3E の INVP 形成における本来の役割

Sema3E が神経前駆細胞層において発現していないことは前述の通りであるが、Sema3E が INVP 形成を抑制したこと (図 15) はただの人為的な操作によ

るものなのであろうか。Sema3E は motor neuron に発現していた (図 17)。脊髄における motor neuron は神経前駆細胞層のように血管が侵入しない領域として知られている (Kurz, 2009)。Sema3E の INVP 形成における本来の役割はこちらにあるのかもしれない。このことは本研究において主に論じてきた神経前駆細胞層の血管非形成領域に関する問題ではないが、INVP 形成のルート規定という観点からは非常に重要な問題である。また、Sema3E の INVP 形成における本来の役割として考えられるもう一つの可能性として、INVP が脊髄内に侵入するタイミングを決める上で重要な役割を果たしているかもしれないということが挙げられる。このことはマウスにおいて、INVP 形成前 (胚発生 8.25 日のマウス胚) の神経管の floor plate 付近の領域に Sema3E の発現が強く見られること (Meadows et al., 2011) に対して、本研究で示した血管侵入が起きている時期の Sema3E の発現は脊髄腹側の INVP 侵入点付近 (floor plate 領域) での発現が非常に弱くなっていること (図 17) から予想される。当然のことながら、マウス胚とトリ胚の Sema3E の発現パターンが必ずしも一致するとは限らないため、INVP 侵入時より早期のトリ胚における Sema3E の発現パターンを調べる必要があり今後の研究課題でもある。

(4) Wnt シグナルおよび BMP シグナルについて

過去に INVP 形成や静脈形成に関わるとされてきた Wnt シグナルや BMP シグナルは本研究において INVP の誘引や伸長に必要なあるいは十分であるという結果は得られなかった (図 10)。Wnt7a/b のダブルノックアウトマウスは確かに脊髄内の INVP の数を減少させる (Stenman et al., 2008) が、この INVP の数が減少することは血管内皮の分化に寄与する所が大きいように思われる。実際、Stenman らの報告では Wnt7a/b が末梢組織の血管を、中枢神経周囲の血管化させる (中枢神経組織周囲および内部の血管は血液脳関門 (BBB) と呼ばれる特殊な血管になっている) ことが報告されてはいるが、Wnt シグナルが直接的に INVP を誘引あるいは伸長させるような機能を担っているという報告はされていない (Stenman et al., 2008)。また、血管内皮における β -catenin のノックアウトマウスは完全に INVP 形成をしなくなるが、 β -catenin は VE-cadherin のような血管内皮に構造上必須な分子のシグナルでもあるため、全てが Wnt によるものとは言えない。本研究で得られた結果は、INVP のパターン形成において Wnt シグナルより VEGF の方がより INVP 誘引伸長に直接的な役割を果たすものであるということを示しているのかもしれない。

次に、BMP シグナルであるが、Wiley らの報告では、BMP シグナルは静脈の形成に寄与する分子である (Wiley et al., 2011)。本研究の結果では、脊髄の INVP

は動脈から伸びて来る可能性を示した（図 20）。また、解剖学的にも脊髄腹側から侵入してくる INVP は PATs と呼ばれる動脈から分岐するものであることが報告されている。このようなことから BMP シグナルが INVP の誘引や伸長に影響しなかったのは、INVP は動脈性の性質をすでに有しているからなのかもしれない。

（5）本論文で提示した分子モデル以外に考えられる分子メカニズムについて

本研究では、あくまで VEGF と反作用する分子のバランスによって INVP のパターンが決定されるという観点で研究を進めてきたが、他の可能性としてどういったものが考えられるのであろうか。一番分かりやすいものは細胞外マトリックス（ECM）によって、すでに INVP が通る道が決められている可能性がある。実際、網膜における血管新生では、アストロサイトから発現される Fibronectin が血管網をつくる上で重要であることが、報告されている (Stenzel et al., 2011)。しかしながら、トリ胚の脊髄においては Fibronectin が先に蓄積し、INVP の通り道をつくるという可能性に関しては低そうである。なぜならば、トリ胚の脊髄において、Fibronectin が蓄積するのは INVP 形成後の血管内皮の基底膜に見られるだけで、Intermediate zone 近傍に先に蓄積している様子は見られていない。また、序論でも述べたように、HSPG などの分子が寄与している可能性も十分に考えられるが、その多くは基底膜において蓄積する。また、筆者も多くの ECM を標的とすることが知られる MMP2 を脊髄内に発現させる実験を行ったりしているが今の所、有意な結果は得られていないのが現状である。今後、ECM と INVP 形成の関係を調べることも重要な課題である。

生体内環境は、非常に多くの分子が複雑に関わりあって、形態形成の場を生み出している。今後も INVP の血管パターン形成を調べることで、新たな発見が生まれることを期待する。なお、この研究は、その一助となれば幸いである。

謝辞

本研究で用いた sFlt-1 の cDNA は渋谷正史博士（東京医科歯科大学）より供与頂きました。また、RhoA および Rac1 変異体は貝渕弘三博士より供与頂きました。向山洋介博士（NIH）、関口清俊博士（大阪大学）からは本研究に関する大切なご助言およびサイエンスにかかるご指導を丁寧頂きました。また、中島欽一博士（本学・元分子神経制御、現・九州大学）ならびに別所康全博士（本学・遺伝子発現制御）には京都大学出向にあたり、本学の学籍を置かせて頂き主指導教官ならびにアドバイザー委員となって頂きましたことお礼申し上げます。同じく、本学アドバイザー委員となって頂いた川市正史博士、石田靖雅博士、稲垣直之博士にお礼申し上げます。

本学・元分子発生生物学講座の皆様ならびに京都大学理学研究科動物発生研究室の皆様には多大なるサポートを頂きました。田所竜介博士にはこの研究の発端ともなるオープnbック法のご指導ならびに研究に関するアドバイスを、斉藤大介博士（現・東北大学）、佐藤有紀博士（現・熊本大学）、渡辺忠由博士、吉野剛史博士、下北英輔博士には多くのコンストラクトの供与と研究に関するアドバイスを頂きました。また、大畑絵美博士（現・ライカマイクロシステムズ）には何も知らなかった私に実験の基礎となる部分をほとんど教えて頂きました。高瀬悠太さんには蛍光インクインジェクション法に関するご指導ならびに同じ血管研究グループとしてのディスカッションを、安江泰治さん、村井英隆さん、熱田勇士博士、川地輝明さんには多くのディスカッションをして頂きました。酒井洋子さん、堀内由美さんには事務手続きに関して大変お世話になり、内山朱美さんにはコンピュータに関連することで大変お世話になりました。改めてお礼申し上げます。

ここに書かせて頂いた方以外にも両親を含め、多くの方々に励ましや相談にのって頂きました。ありがとうございました。これからの人生に大いに活かしていきたいと思います。なお、日本学術支援機構から特別研究員（DC-2）としてサポート頂いたことお礼申し上げるとともに、これからも若手研究者の育成に尽力頂けるようお願い申し上げます。

最後に、奈良先端科学技術大学院大学において 6 年間、また京都大学において 2 年間の計 8 年間、研究と生活全般に渡りご指導とご助力、多くの貴重な機会を賜った高橋淑子先生にこの場をお借りして深く御礼申し上げます。本当にありがとうございました。

参考文献

- Adams, R.H., and Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 464-478.
- Ambati, B.K., Nozaki, M., Singh, N., Takeda, A., Jani, P.D., Suthar, T., Albuquerque, R.J., Richter, E., Sakurai, E., Newcomb, M.T., *et al.* (2006). Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature* 443, 993-997.
- Ambati, B.K., Patterson, E., Jani, P., Jenkins, C., Higgins, E., Singh, N., Suthar, T., Vira, N., Smith, K., and Caldwell, R. (2007). Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to the corneal antiangiogenic barrier. *Br J Ophthalmol* 91, 505-508.
- Bautch, V.L., and James, J.M. (2009). Neurovascular development: The beginning of a beautiful friendship. *Cell Adh Migr* 3, 199-204.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., *et al.* (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-439.
- Chauvet, S., Burk, K., and Mann, F. (2013). Navigation rules for vessels and neurons: cooperative signaling between VEGF and neural guidance cues. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, 1685-1703.
- Chen, L., Melendez, J., Campbell, K., Kuan, C.-Y., and Zheng, Y. (2009). Rac1 deficiency in the forebrain results in neural progenitor reduction and microcephaly. *Developmental Biology* 325, 162-170.
- Dehay, C., and Kennedy, H. (2007). Cell-cycle control and cortical development. *Nature reviews Neuroscience* 8, 438-450.
- Eichmann, A., Noble, F.L., Autiero, M., and Carmeliet, P. (2005). Guidance of vascular and neural network formation. *Current Opinion in Neurobiology* 15, 108-115.

Eichmann, A., and Thomas, J.L. (2012). Molecular Parallels between Neural and Vascular Development. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 3, a006551-a006551.

Eilken, H.M., and Adams, R.H. (2010). Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. Current opinion in cell biology 22, 617-625.

Ferrara, N., and Alitalo, K. (1999). Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. Nat Med 5, 1359-1364.

Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M.L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. Nature 376, 66-70.

Franco, Santos J., and Müller, U. (2013). Shaping Our Minds: Stem and Progenitor Cell Diversity in the Mammalian Neocortex. Neuron 77, 19-34.

Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., *et al.* (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. J Cell Biol 161, 1163-1177.

Geudens, I., and Gerhardt, H. (2011). Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. Development 138, 4569-4583.

Ghosh, S., Marquardt, T., Thaler, J.P., Carter, N., Andrews, S.E., Pfaff, S.L., and Hunter, T. (2008). Instructive role of aPKC subcellular localization in the assembly of adherens junctions in neural progenitors. Proceedings of the National Academy of Sciences 105, 335-340.

Gu, C., Yoshida, Y., Livet, J., Reimert, D.V., Mann, F., Merte, J., Henderson, C.E., Jessell, T.M., Kolodkin, A.L., and Ginty, D.D. (2005). Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins. Science 307, 265-268.

Gui, H., Li, S., and Matise, M.P. (2007). A cell-autonomous requirement for Cip/Kip cyclin-kinase inhibitors in regulating neuronal cell cycle exit but not differentiation in the developing spinal cord. Dev Biol 301, 14-26.

Gustafsson, M.V., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., Ruas, J.L., Poellinger, L., Lendahl, U., and Bondesson, M. (2005). Hypoxia Requires Notch Signaling to Maintain the Undifferentiated Cell State. *Developmental Cell* 9, 617-628.

Haigh, J.J., Morelli, P.I., Gerhardt, H., Haigh, K., Tsien, J., Damert, A., Miquerol, L., Muhlner, U., Klein, R., Ferrara, N., *et al.* (2003). Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling. *Developmental Biology* 262, 225-241.

Hamburger, V., and Hamilton, H.L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* 195, 231-272.

Harper, J.Y., Samuelson, D.A., and Reep, R.L. (2005). Corneal vascularization in the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) and three-dimensional reconstruction of vessels. *Veterinary ophthalmology* 8, 89-99.

Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., and Shibuya, M. (1998). Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9349-9354.

James, J.M., Gewolb, C., and Bautch, V.L. (2009). Neurovascular development uses VEGF-A signaling to regulate blood vessel ingression into the neural tube. *Development* 136, 833-841.

James, J.M., and Mukoyama, Y.S. (2011). Neuronal action on the developing blood vessel pattern. *Semin Cell Dev Biol* 22, 1019-1027.

Katayama, K.i., Melendez, J., Baumann, J.M., Leslie, J.R., Chauhan, B.K., Nemkul, N., Lang, R.A., Kuan, C.Y., Zheng, Y., and Yoshida, Y. (2011). Loss of RhoA in neural progenitor cells causes the disruption of adherens junctions and hyperproliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 7607-7612.

Kim, J., Oh, W.J., Gaiano, N., Yoshida, Y., and Gu, C. (2011). Semaphorin 3E-Plexin-D1 signaling regulates VEGF function in developmental angiogenesis via a feedback mechanism. *Genes & Development* 25, 1399-1411.

Kurz, H. (2009). Cell lineages and early patterns of embryonic CNS vascularization. *Cell Adh Migr* 3, 205-210.

Kurz, H., Gartner, T., Eggli, P.S., and Christ, B. (1996). First blood vessels in the avian neural tube are formed by a combination of dorsal angioblast immigration and ventral sprouting of endothelial cells. *Dev Biol* 173, 133-147.

Lyuksyutova, A.I. (2003). Anterior-Posterior Guidance of Commissural Axons by Wnt-Frizzled Signaling. *Science* 302, 1984-1988.

Ma, S., Kwon, H.J., Johng, H., Zang, K., and Huang, Z. (2013). Radial Glial Neural Progenitors Regulate Nascent Brain Vascular Network Stabilization Via Inhibition of Wnt Signaling. *PLoS Biology* 11, e1001469.

Mackenzie, F., and Ruhrberg, C. (2012). Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. *Development* 139, 1371-1380.

Mauti, O., Sadhu, R., Gemayel, J., Gesemann, M., and Stoeckli, E.T. (2006). Expression patterns of plexins and neuropilins are consistent with cooperative and separate functions during neural development. *BMC Developmental Biology* 6, 32.

Meadows, S.M., Fletcher, P.J., Moran, C., Xu, K., Neufeld, G., Chauvet, S., Mann, F., Krieg, P.A., and Cleaver, O. (2011). Integration of Repulsive Guidance Cues Generates Avascular Zones That Shape Mammalian Blood Vessels. *Circulation Research* 110, 34-46.

Meadows, S.M., Ratliff, L.A., Singh, M.K., Epstein, J.A., and Cleaver, O. (2013). Resolution of defective dorsal aortae patterning in Sema3E-deficient mice occurs via angiogenic remodeling. *Dev Dyn* 242, 580-590.

Meszar, Z., Felszeghy, S., Veress, G., Matesz, K., Szekely, G., and Modis, L. (2008). Hyaluronan accumulates around differentiating neurons in spinal cord of chicken embryos. *Brain Res Bull* 75, 414-418.

Misra, K., Gui, H., and Matise, M.P. (2008). Prox1 regulates a transitory state for interneuron neurogenesis in the spinal cord. *Dev Dyn* 237, 393-402.

Miyata, T., Kawaguchi, D., Kawaguchi, A., and Gotoh, Y. (2010). Mechanisms

that regulate the number of neurons during mouse neocortical development. *Current Opinion in Neurobiology* 20, 22-28.

Momose, T., Tonegawa, A., Takeuchi, J., Ogawa, H., Umesono, K., and Yasuda, K. (1999). Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Dev Growth Differ* 41, 335-344.

Moyon, D., Pardanaud, L., Yuan, L., Breant, C., and Eichmann, A. (2001). Plasticity of endothelial cells during arterial-venous differentiation in the avian embryo. *Development* 128, 3359-3370.

Mukouyama, Y.S., Shin, D., Britsch, S., Taniguchi, M., and Anderson, D.J. (2002). Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell* 109, 693-705.

Nagase, T., Nagase, M., Yoshimura, K., Fujita, T., and Koshima, I. (2005). Angiogenesis within the developing mouse neural tube is dependent on sonic hedgehog signaling: possible roles of motor neurons. *Genes to Cells* 10, 595-604.

Naňka, O., Valášek, P., Dvořáková, M., and Grim, M. (2006). Experimental hypoxia and embryonic angiogenesis. *Developmental Dynamics* 235, 723-733.

Ng, Y.S., Rohan, R., Sunday, M.E., Demello, D.E., and D'Amore, P.A. (2001). Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. *Dev Dyn* 220, 112-121.

Nimmagadda, S., Loganathan, P.G., Wilting, J., Christ, B., and Huang, R. (2004). Expression pattern of VEGFR-2 (Quek1) during quail development. *Anat Embryol (Berl)* 208, 219-224.

Nogi, T., Yasui, N., Mihara, E., Matsunaga, Y., Noda, M., Yamashita, N., Toyofuku, T., Uchiyama, S., Goshima, Y., Kumanogoh, A., *et al.* (2010). Structural basis for semaphorin signalling through the plexin receptor. *Nature* 467, 1123-1127.

Nonomura, K., Yamaguchi, Y., Hamachi, M., Koike, M., Uchiyama, Y., Nakazato, K., Mochizuki, A., Sakaue-Sawano, A., Miyawaki, A., Yoshida, H., *et al.* (2013). Local Apoptosis Modulates Early Mammalian Brain Development through the

Elimination of Morphogen-Producing Cells. *Developmental Cell* 27, 621-634.

Oh, W.-J., and Gu, C. (2013a). Establishment of Neurovascular Congruency in the Mouse Whisker System by an Independent Patterning Mechanism. *Neuron* 80, 458-469.

Oh, W.-J., and Gu, C. (2013b). The role and mechanism-of-action of Sema3E and Plexin-D1 in vascular and neural development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24, 156-162.

Ohata, E., Tadokoro, R., Sato, Y., Saito, D., and Takahashi, Y. (2009). Notch signal is sufficient to direct an endothelial conversion from non-endothelial somitic cells conveyed to the aortic region by CXCR4. *Developmental Biology* 335, 33-42.

Pardanaud, L., Altmann, C., Kitos, P., Dieterlen-Lievre, F., and Buck, C.A. (1987). Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development* 100, 339-349.

Pardanaud, L., Luton, D., Prigent, M., Bourcheix, L.M., Catala, M., and Dieterlen-Lievre, F. (1996). Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development* 122, 1363-1371.

Phng, L.K., and Gerhardt, H. (2009). Angiogenesis: A Team Effort Coordinated by Notch. *Developmental Cell* 16, 196-208.

Pouget, C., Gautier, R., Teillet, M.A., and Jaffredo, T. (2006). Somite-derived cells replace ventral aortic hemangioblasts and provide aortic smooth muscle cells of the trunk. *Development* 133, 1013-1022.

Quaegebeur, A., Lange, C., and Carmeliet, P. (2011). The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron* 71, 406-424.

Ramaesh, T., Collinson, J.M., Ramaesh, K., Kaufman, M.H., West, J.D., and Dhillon, B. (2003). Corneal abnormalities in Pax6^{+/-} small eye mice mimic human aniridia-related keratopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* 44, 1871-1878.

- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674.
- Rossello, C.A., and Torres, M. (2010). Gene transfer by electroporation into hemogenic endothelium in the avian embryo. *Dev Dyn* 239, 1748-1754.
- Rowitch, D.H., and Kriegstein, A.R. (2010). Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468, 214-222.
- Roztocil, T., Matter-Sadzinski, L., Alliod, C., Ballivet, M., and Matter, J.M. (1997). NeuroM, a neural helix-loop-helix transcription factor, defines a new transition stage in neurogenesis. *Development* 124, 3263-3272.
- Ruhrberg, C., and Bautch, V.L. (2013). Neurovascular development and links to disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, 1675-1684.
- Ruhrberg, C., Gerhardt, H., Golding, M., Watson, R., Ioannidou, S., Fujisawa, H., Betsholtz, C., and Shima, D.T. (2002). Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev* 16, 2684-2698.
- Ruiz de Almodovar, C., Fabre, Pierre J., Knevels, E., Coulon, C., Segura, I., Haddick, Patrick C.G., Aerts, L., Delattin, N., Strasser, G., Oh, W.-J., *et al.* (2011). VEGF Mediates Commissural Axon Chemoattraction through Its Receptor Flk1. *Neuron* 70, 966-978.
- Saito, D., Takase, Y., Murai, H., and Takahashi, Y. (2012). The Dorsal Aorta Initiates a Molecular Cascade That Instructs Sympatho-Adrenal Specification. *Science* 336, 1578-1581.
- Sakurai, A., Gavard, J., Annas-Linhares, Y., Basile, J.R., Amornphimoltham, P., Palmby, T.R., Yagi, H., Zhang, F., Randazzo, P.A., Li, X., *et al.* (2010). Semaphorin 3E Initiates Antiangiogenic Signaling through Plexin D1 by Regulating Arf6 and R-Ras. *Molecular and Cellular Biology* 30, 3086-3098.
- Sato, Y., Watanabe, T., Saito, D., Takahashi, T., Yoshida, S., Kohyama, J., Ohata, E., Okano, H., and Takahashi, Y. (2008). Notch Mediates the Segmental Specification of Angioblasts in Somites and Their Directed Migration toward the Dorsal Aorta in Avian Embryos. *Developmental Cell* 14, 890-901.

Sgaier, S.K., Millet, S., Villanueva, M.P., Berenshteyn, F., Song, C., and Joyner, A.L. (2005). Morphogenetic and Cellular Movements that Shape the Mouse Cerebellum. *Neuron* 45, 27-40.

Shibuya, M. (2008). Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep* 41, 278-286.

Shibuya, M. (2013). Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem* 153, 13-19.

Smith, R.S., Hawes, N.L., Kuhlmann, S.D., Heckenlively, J.R., Chang, B., Roderick, T.H., and Sundberg, J.P. (1996). Corn1: a mouse model for corneal surface disease and neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science* 37, 397-404.

Staton, C.A. (2011). Class 3 semaphorins and their receptors in physiological and pathological angiogenesis. *Biochem Soc Trans* 39, 1565-1570.

Stenman, J.M., Rajagopal, J., Carroll, T.J., Ishibashi, M., McMahon, J., and McMahon, A.P. (2008). Canonical Wnt Signaling Regulates Organ-Specific Assembly and Differentiation of CNS Vasculature. *Science* 322, 1247-1250.

Stenzel, D., Lundkvist, A., Sauvaget, D., Busse, M., Graupera, M., van der Flier, A., Wijelath, E.S., Murray, J., Sobel, M., Costell, M., *et al.* (2011). Integrin-dependent and -independent functions of astrocytic fibronectin in retinal angiogenesis. *Development* 138, 4451-4463.

Takase, Y., Tadokoro, R., and Takahashi, Y. (2013). Low cost labeling with highlighter ink efficiently visualizes developing blood vessels in avian and mouse embryos. *Development, Growth & Differentiation* 55, 792-801.

Tonegawa, A., Funayama, N., Ueno, N., and Takahashi, Y. (1997). Mesodermal subdivision along the mediolateral axis in chicken controlled by different concentrations of BMP-4. *Development* 124, 1975-1984.

Vieira, J.M., Schwarz, Q., and Ruhrberg, C. (2007). Selective requirements for NRP1 ligands during neurovascular patterning. *Development* 134, 1833-1843.

Watanabe, T., Saito, D., Tanabe, K., Suetsugu, R., Nakaya, Y., Nakagawa, S., and Takahashi, Y. (2007). Tet-on inducible system combined with in ovo electroporation dissects multiple roles of genes in somitogenesis of chicken embryos. *Developmental Biology* 305, 625-636.

Watanabe, T., Sato, Y., Saito, D., Tadokoro, R., and Takahashi, Y. (2009). EphrinB2 coordinates the formation of a morphological boundary and cell epithelialization during somite segmentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 7467-7472.

Wiley, D.M., Kim, J.D., Hao, J., Hong, C.C., Bautch, V.L., and Jin, S.W. (2011). Distinct signalling pathways regulate sprouting angiogenesis from the dorsal aorta and the axial vein. *Nat Cell Biol* 13, 686-692.

Wilting, J., Brand-Saberi, B., Huang, R., Zhi, Q., Kontges, G., Ordahl, C.P., and Christ, B. (1995). Angiogenic potential of the avian somite. *Dev Dyn* 202, 165-171.

Wolf, A.M., Lyuksyutova, A.I., Fenstermaker, A.G., Shafer, B., Lo, C.G., and Zou, Y. (2008). Phosphatidylinositol-3-Kinase-Atypical Protein Kinase C Signaling Is Required for Wnt Attraction and Anterior-Posterior Axon Guidance. *Journal of Neuroscience* 28, 3456-3467.

Xie, Z., Chen, Y., Li, Z., Bai, G., Zhu, Y., Yan, R., Tan, F., Chen, Y.G., Guillemot, F., Li, L., *et al.* (2011). Smad6 promotes neuronal differentiation in the intermediate zone of the dorsal neural tube by inhibition of the Wnt/beta-catenin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12119-12124.

Yamaguchi, S., Iwata, K., and Shibuya, M. (2002). Soluble Flt-1 (soluble VEGFR-1), a potent natural antiangiogenic molecule in mammals, is phylogenetically conserved in avians. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 554-559.

Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., and Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407, 242-248.

Yokota, Y., Saito, D., Tadokoro, R., and Takahashi, Y. (2011). Genomically

integrated transgenes are stably and conditionally expressed in neural crest cell-specific lineages. Dev Biol 353, 382-395.