

論文内容の要旨

申請者氏名 高橋 輝明

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。適切な位置における血管形成過程を知る上で、脳や脊髄といった中枢神経系組織は、病理学的あるいは解剖学的に古くから注目されてきた。中枢神経系組織における血管形成には、血管内皮成長因子である VEGF や Wnt シグナルといったいくつかの分子が重要な役割を果たすことが、ノックアウトマウスの解析やトリ胚を用いた研究から明らかになりつつある。しかしながら、これらの分子がどのようにして個々の細胞に働きかけ血管の走行ルートが決められるのかという血管パターンニングの研究に関してはいまだ不明な点も多くある。本研究では、トリ胚の中枢神経系組織、特に脊髄の内部を走行する血管 (Intraneural vascular plexus: INVP) の形成メカニズムに焦点をあてた研究を行った。

脊髄内部を走行する INVP はトリ胚では発生 4 日目以降に脊髄腹側の底板近傍から侵入し、発生が進むにつれてこの血管は脊髄の背側方向へと伸長していくことが知られている。脊髄における INVP の伸長過程を調べるために、血管組織を高感度かつ簡便に可視化できる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、組織片による観察を行った。その結果、胚発生 4 日目以降に脊髄内部に侵入した血管は亀の甲羅様の血管網を形成し、胚発生 5 日目までに血管の形成領域は脊髄の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。

脊髄腹側から侵入する INVP の走行ルートは脊髄の神経前駆細胞層に沿うようにみえる。神経前駆細胞層と血管走行ルートとの関係を調べるために、神経前駆細胞層を欠損させた領域での血管走行ルートの変化を調べた。結果、神経前駆細胞層を欠損させる因子として細胞骨格制御因子として知られる Rho family の恒常活性型 Rac1 (CA-Rac1) またはドミナントネガティブ型 RhoA を脊髄内に発現させると神経前駆細胞層の一部欠損が見られ、欠損が見られた領域では、INVP の異所形成が生じた。このことから、INVP の走行ルートの規定には神経前駆細胞の層構造が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

加えて INVP の走行ルートの規定に関わる分子メカニズム調べるために、VEGF やその阻害因子である Soluble FLT-1 (sFlt-1)、Semaphorin3E (Sema3E) を脊髄に発現させ INVP 形成への影響を調べた。結果、VEGF は INVP の誘引伸長に必要十分であり、Sema3E が INVP 形成を阻害する potential を持つことがわかった。本研究から得られた知見により、胚発生期の脊髄神経組織における血管の成り立ちの理解が進むことが期待される。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 高橋 輝明

申請者は、胚発生過程の脊髄神経組織内において血管がどのように形成されるのかに興味を持ち、脊髄神経前駆細胞層と血管パターンの関連性に着目した研究を進めた。

これまでの知見では、脊髄の血管形成に関わる分子は VEGF をはじめとして多数報告されていたものの、神経前駆細胞領域と血管形成の関係を示すものは多くなかった。申請者は Rho ファミリー分子 (Rac1 および RhoA) をエレクトロポレーションにより脊髄組織に限定的に発現させることにより、神経前駆細胞層の状態を変化させ、その際の血管パターンが変化することを示した。このことは神経前駆細胞と血管形成の間に関連性があることを示している。

また、胚発生期の脊髄の神経前駆細胞層には VEGF が発現しているが、この VEGF は脊髄内の血管を誘引伸長させるのに必要十分であることを示した。さらに、体幹部や網膜において VEGF を機能阻害することが知られる Semaphorin3E が脊髄の血管形成も阻害する機能を有していることを示した。この研究から得られた結果は、単に脊髄の血管形成過程の理解を深めるだけでなく、再生医療などの医学的な見地からも重要なものとなる点で評価できるものである。

加えて、申請者は、脊髄の血管形成を独自の視点から解析するために、血管組織を高感度かつ簡便に可視化できる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、これまで神経軸索の観察に用いられてきたオープンブック法を血管組織の観察用に応用した方法を考案し用いている。この方法は、これまで主流であった横断組織片の断片的な情報をより連続した情報として認識しやすくする利点がある。今後このような観察手法が研究分野で広く使われることが期待される

なお、これらの成果は、申請者が筆頭著者である論文 (Takahashi et al., Plos One, 2015) にて報告されている。

以上のように本論文は、申請者が独自に構築した実験系を駆使して、脊髄神経組織における血管形成について初めて示したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。