

生体内血管パターンニングにおける  
Notch およびケモカインシグナルのはたらき

大畑 絵美

奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科 分子発生生物学講座  
(主任指導教員 高橋 淑子 教授)

最終提出 2009年9月17日

所属 (主指導教員)	分子発生生物学講座 (高橋 淑子 教授)		
氏名	大畑 絵美	提出	平成21年7月17日
題目	生体内血管パターンニングにおける Notch およびケモカインシグナルのはたらき		

要旨

動物の体内には、整然とした走行パターンをもつ血管が張り巡らされている。生き物が円滑な生命活動を行うためには、血管はしかるべき場所にしかるべき大きさで作られることが重要である。このような三次元的な広がりを持つ血管パターンを生み出すためには、血管芽細胞（アンジオブラスト）の適切な移動と集積、血管内皮細胞への分化と脈管形成、それに引き続く血管伸長とリモデリング、そして血管壁細胞を伴った血管の安定化（成熟化）など、さまざまな細胞挙動が協調的に組み合わせられていかなければならない。これまでの血管形成に関する研究の多くは、培養細胞を用いた *in vitro* 実験系において、主に血管内皮細胞の分化や増殖に注目して行われてきた。さらにノックアウトマウスの解析などから、血管形成に必須の遺伝子も多数同定されてきた。しかしながら、実際の生体内において、多様な細胞挙動の集大成である血管パターンニングがどのように進行するのか、とりわけ、組織特異的な血管パターンニングの機構や、血管が三次元的に形成される際の細胞のダイナミズムに関する知見は極めて乏しい。私はこの問題に取り組むべく、ニワトリ胚とマウス胚を用いて、Notch およびケモカイン SDF1/CXCR4 を介したシグナルが引き起こす細胞挙動に注目して研究を行った。

①背側大動脈形成における血管芽細胞の挙動と Notch シグナルの役割

生体内で最も初期に作られる背側大動脈は、側板中胚葉に由来する血管原基に向かって、体節中胚葉由来の血管芽細胞が継ぎ足されていくことで形成される<sup>12</sup>。当研究室の佐藤らは、背側大動脈形成に関わる体節細胞の挙動には Notch シグナルが重要な役割を果たしており、背側大動脈原基へのダイナミックな細胞移動と血管内皮への分化を引き起こすことを示した<sup>3</sup>。私は、これらの知見をさらに発展させ、Notch 活性化細胞を背側大動脈へと誘引する分子実体は何か、また Notch シグナルは細胞移動と細胞分化の両ステップに必要なのかを理解することに取り組んだ。そこでまず、ケモカイン SDF1 とその受容体 CXCR4 を介したシグナルに注目した。ケモカインは、血球細胞を誘引する能力を持つことがよく知られているが、近年では発生過程においても、始原生殖細胞や神経細胞の移動に携わっていることがわかってきた。私は、SDF1 が背側大動脈とその周辺で強く発現すること、またエレクトロポレーション

法によって CXCR4 を強制発現された体節細胞は、SDF1 の誘引作用によって、Notch 活性化細胞と非常によく似た様式で大動脈へ向かって移動することを見出していたので、Notch 活性化細胞は SDF1/CXCR4 を介したシグナルによって大動脈へと移動するのではないかと考えた。しかし両者の間にシグナルのクロストークは見られず、Notch 依存的な細胞移動に SDF1/CXCR4 は関与していないようであった。さらに、CXCR4 強制発現細胞は大動脈に向かって移動するものの、決して血管内皮細胞には分化しないという、Notch 活性化細胞とは異なる性質をもつことを発見した。そこで次に、この CXCR4 細胞の性質を利用して、Notch シグナルの役割を「細胞移動」と「血管内皮への分化」に分離することを試みた。体節細胞に CXCR4 を強制発現させて背側大動脈周辺に移動させた後（このままでは血管内皮細胞にはならない）、Tet-on システムを用いた時期特異的遺伝子発現法<sup>45</sup>によって恒常活性化型 Notch を発現させたところ、それらの細胞は血管内皮細胞へと分化し、背側大動脈へ取り込まれることがわかった。これらの結果から、Notch シグナルは血管周辺に存在するナイーブな体節細胞を血管内皮へと転換させる能力を持ち、体節細胞が背側大動脈を形成する際の最後のステップである「血管内皮への分化」という過程において決定的な役割を果たしていることを明らかにした。これらの知見を利用すると、Notch 活性化依存的に特定の細胞を血管へ組み込むことができるため、今後の再生医療や血管治療にも役立つことが期待される。

## ②血管サブタイプの決定に関わるケモカインシグナル SDF1/CXCR4 の役割

上記研究を進めるうちに、発生過程のより後期においては、背側大動脈から派生して末梢へと伸長する肋間血管の形成に SDF1/CXCR4 が重要な役割を担っていることが見えてきた。CXCR4 は伸長中の肋間血管特異的に、SDF1 は肋間血管が伸長していく道筋にそれぞれ発現する。また CXCR4 ノックアウトマウス（京都大学・長澤丘司教授より供与、本学でコロニーを維持）では、背側大動脈は正常であるが、肋間血管の重篤な形成不全が認められた。これらのことから、SDF1/CXCR4 は肋間血管の形成に必須であり、何らかの重要な細胞挙動を司っていることが予想された。そこで、私たちが独自に開発した方法で血管内皮細胞特異的な遺伝子操作を試みたところ、背側大動脈で CXCR4 を過剰発現させると、背側大動脈は成熟血管の様相を崩し、伸長中の血管でよく見られるような「未熟な血管」様の形態を示した。逆に RNAi を用いて血管内皮細胞で CXCR4 をノックダウンすると、それらの細胞は肋間血管形成には参画しないという結果を得た。以上の結果から、SDF1/CXCR4 は血管内皮細胞に「未熟で動的」な性質を与えることによって、成熟した背側大動脈から肋間血管という血管サブタイプを区別させ、体内の血管パターンニングを促進する可能性が示唆された。

参考文献；(1) Pardanaud et al., Development, 1996 (2) Pouget et al., Development, 2006 (3) Sato et al., Dev. Cell, 2008 (4) Watanabe et al., Dev. Biol., 2008 (5) Sato et al., Dev. Biol., 2008

## 序論

### 初期胚体内で見られる血管形成

動物の体内には、整然とした走行パターンをもつ血管が張り巡らされている。血管はあらゆる臓器と連結し、酸素や栄養素の運搬などを行う生体に必要不可欠な器官である。このため、生物が円滑な生命活動を維持するためには、血管形成はさまざまな器官形成と連動し、しかるべき場所にしかるべき大ききさで作られなければならない。生体内で三次元的に広がる血管ネットワークは、図 1 に示すようなさまざまなステップによって作られていく。まず血管芽細胞（アンジオブラスト：angioblast）が体内の適切な場所に移動し、血管内皮細胞へと分化して原始血管叢を形成する。この過程を脈管形成（vasculogenesis）という（Risau and Flamme, 1995）。その後、血管の発芽（sprouting）・分岐（branching）・剪定（pruning）・嵌入（intussusception）といった血管リモデリングが起こり、次第に精巧な血管パターンが形づくられていく。この過程を血管新生（angiogenesis）という（Adams and Alitalo, 2007; Yancopoulos et al., 2000）。形成された血管は、動・静脈の性質を獲得したり、周囲を平滑筋細胞やペリサイトといった血管支持細胞に取り囲まれて安定化し、最終的に成熟血管となる（Jain, 2003）。このように、生体内の血管パターンは、細胞移動や細胞分化などを伴ったさまざまな細胞挙動の集大成として形成される。

### 血管形成と Notch シグナル

血管形成に関わる研究は盛んに行われており、これまでに主に培養細胞を用いた *in vitro* 実験系や、マウスやゼブラフィッシュなどのトランスジェニック動物を用いた解析から、血管形成に必須の遺伝子は多数同定されてきた。し

かしながら、それらの遺伝子が生体内のどの細胞（組織）において、どのような細胞挙動を制御しているのかについては、今後さらに多くの研究が必要である。

血管形成において、最も注目されているシグナルのひとつに、Notch シグナルがある。Notch シグナルは血管形成のみならず、発生過程の多くの局面において、主導的な役割を果たすシグナルとしてよく知られている。膜貫通構造を持つ Notch は、同じく膜貫通構造をもつ Delta-like (ショウジョウバエの Delta ホモログ) や Jagged (ショウジョウバエの Serrate ホモログ) をリガンドとする。リガンドからの刺激を受けると、ADAM や  $\gamma$ -secretase といったプロテアーゼによって Notch の細胞内ドメインが切断されて核内に移行し、CSL (CBF1, Su(H), LAG1) complex と結合し、さまざまな遺伝子の転写を開始させる。Notch 関連因子のノックアウトマウスでは血管形成に異常がみられることから、Notch シグナルは血管形成に必須であることが知られていた (Phng and Gerhardt, 2009)。特に動脈・静脈の分化に重要な役割を果たしており、ゼブラフィッシュを用いた研究から、脊索から分泌される sonic hedgehog が VEGF の発現を誘導し、VEGF が血管芽細胞での Notch 発現を促進すること、さらに Notch は転写抑制因子 Gridlock を介して、血管芽細胞での静脈化因子 (EphB4) の発現を抑制し、動脈化 (EphrinB2 発現) を促進させることなどが報告された (Lawson et al., 2001; Lawson et al., 2002; Wang et al., 1998; Zhong et al., 2001)。また別の役割としては、マウスの網膜血管網やサカナの体節間血管を用いた近年の解析から、Notch シグナルは血管新生で見られる Tip 細胞 (伸長血管の先端にある血管内皮細胞) と stalk 細胞 (Tip 細胞の後に続く血管内皮細胞) の差を生み出し、血管内皮細胞で Notch シグナルが抑制されることが Tip 細胞の形成とその後の血管伸長に必須であることが明らかとなってきた (Benedito et al., 2009; Hellstrom et al., 2007; Leslie et al., 2007; Phng et al., 2009; Siekmann and Lawson, 2007)。以上のような、動・静脈形成や血管新生におけ

る Notch シグナルの役割については理解が進んできたが、これらと比較して、脈管形成における役割はまだよく知られていなかった。

当研究室の佐藤有紀博士らは、発生過程において、背側大動脈の脈管形成に関わる血管芽細胞の挙動に Notch シグナルが寄与することを見出した (Sato et al., 2008)。これに関しては、次項で詳細に述べる。

### 背側大動脈形成における血管芽細胞の挙動と Notch シグナル

背側大動脈 (dorsal aorta) は、発生過程の最も初期に胚体内に形成される血管である (図 2A)。発生過程の進行に伴い、背側大動脈を基盤として、体節間血管 (intersomitic vessel) などのより細かい血管が形成されていく。ニワトリ-ウズラ異種間移植を用いた細胞系譜の研究から、背側大動脈は隣接する体節中胚葉の細胞から構成されることが報告されている (Ambler et al., 2001; Pardanaud et al., 1996)。背側大動脈は、臓側中胚葉 (splanchnopleural mesoderm: 側板中胚葉の一部) の細胞に由来する血管原基へ向かって、体節細胞が継ぎ足されていくことで形成される (図 2B)。その後、臓側中胚葉由来の血管内皮は血球細胞に分化し、血流に乗って流れ去ってしまうため、背側大動脈の血管内皮はすべて、体節由来の細胞で置き換わることとなる (Pouget et al., 2006)。また、体節間血管の血管内皮細胞も体節中胚葉に由来することがわかっている (図 2C) (Pardanaud et al., 1996)。

体節中胚葉は、未分節中胚葉 (presomitic mesoderm, 以下 PSM と略す) が頭側から周期的に分節することによって作られる体節 (somite) をユニットとする、繰り返し構造をもつ組織である。体節の細胞は、上記の血管内皮細胞だけでなく、将来の骨格筋となる筋節 (myotome)、真皮となる皮節 (dermatome)、(両者の共通の前駆体が皮筋節 (dermomyotome))、そして中軸骨格となる硬節 (sclerotome) へと分化する。このように、体節中胚葉はさまざまな組織の前

駆細胞を生み出すと同時に、体節間血管や脊椎骨・肋骨など繰り返し構造をもつ器官のプレパターンを提供する重要な組織である。

では、背側大動脈形成に携わる血管芽細胞は、体節細胞の中からどのようにして選出されるのだろうか？ また体節由来の血管芽細胞は、どのようにして背側大動脈の形成場所に集積するのだろうか？ これらの疑問に対し、佐藤らは、各体節の後半領域に由来する細胞が背側大動脈へ向かって積極的に移動すること、そして大動脈周辺に到達した細胞は血管内皮細胞となって背側大動脈に取り込まれることを報告した。さらに、これらの細胞挙動が Notch シグナルによって担われていることも明らかにした (図 2D) (Sato et al., 2008)。恒常活性型 Notch (Notch $\Delta E$ ) (Schroeter et al., 1998) を遺伝子導入し、体節細胞で Notch シグナルを活性化させると、Notch 活性化細胞はまず体節の後半領域に限局し、次にその後半領域内を通過して腹側に位置する背側大動脈へと移動し、その後背側大動脈の血管内皮細胞に分化した。逆に、ドミナントネガティブ型 RBPj を遺伝子導入し、体節細胞における内在性の Notch シグナルを阻害すると、それらの細胞は体節後半領域への局在と背側大動脈への移動を起こさず、結果として背側大動脈形成には寄与しなかった (Sato et al., 2008)。佐藤らの研究は、Notch シグナルが脈管形成に関わる体節細胞をダイナミックに移動させ血管内皮へ分化させることを解明した点で新規であった。

そして、これらの知見をさらに発展させ、新たにいくつかの疑問が持ち上がった。一つ目としては、Notch シグナルを活性化された体節細胞を背側大動脈へと誘引する分子実体は何かである。二つ目としては、体節由来の血管形成において、Notch シグナルの役割は「細胞移動」と「血管内皮細胞への分化」という両方のステップに必要なのかである。そして三つ目としては、細胞移動の経路は、後の血管内皮への分化にどれほど影響するのかである。これらの疑問に取り組んだ内容を、本論文の前半部分に記す。

## 細胞移動とケモカイン SDF1/CXCR4 シグナル

上記の Notch シグナルが制御する細胞挙動について明らかにするために、私はケモカイン SDF1 とその唯一のレセプターである CXCR4 (Nagasawa et al., 1996) を介した細胞移動を実験的に利用して研究を進めた。CXCR4 は 7 回膜貫通構造をもつ 3 量体 G タンパク質連結型のレセプターである。リガンド SDF1 からの刺激を受けると、G タンパク質を用いたシグナル伝達によって、PI3K-Akt を介した細胞の生存、Erk1/2 を介した遺伝子発現、FAK や Rac (Rho ファミリー-GTPase の一つ) の活性化による細胞骨格の再編成や細胞移動などを引き起こすことが知られている (Kucia et al., 2004; Patrussi and Baldari, 2008)。また G タンパク質を介したシグナル伝達とは別に、CXCR4 の細胞内ドメインには JAK-STAT シグナルを活性化させる領域もある (Roland et al., 2003)。

SDF1/CXCR4 シグナルが引き起こす細胞移動に注目すると、SDF1 の濃度勾配に従って白血球細胞を遊走させる能力については多数の知見が蓄積されている (Horuk, 2001)。そして近年では、発生過程においても、始原生殖細胞 (Raz, 2003) や小脳顆粒細胞 (Zou et al., 1998)、また側線 (魚の感覚神経の一種) などの神経系の細胞 (Gilmour et al., 2004) の移動現象に関わることが報告されている。また成体内でのガンの転移にも関与している (Vandercappellen et al., 2008)。このように、白血球細胞のみならずさまざまな細胞種において、SDF1/CXCR4 は細胞移動を惹起させることが明らかとなってきた。

当研究室の利根川あかね博士らは、シグナルシーケンストラップ法を用いて、体節中胚葉で働くことが期待されるシグナル分子のスクリーニングを行い、得られた分子の中に CXCR4 が含まれていた (一次スクリーニングで 92 遺伝子、さらにその中から発現パターンスクリーニングで 19 遺伝子に絞った中の一つ) (Tonegawa et al., 2003)。当初私は、その遺伝子発現パターンから、CXCR4 と体節の分節化との関連を検証したが、分節化には関与していないようであった。そこで、より詳細に遺伝子発現パターンや CXCR4 強制発現細胞の挙動を解析し



たところ、上記の佐藤らが報告した血管形成に関わる Notch 活性化細胞の移動現象との共通点が見えてきた。そこで、SDF1/CXCR4 を介したケモカインシグナルは、Notch シグナルと協調的に働いて体節細胞の移動を制御し、体節細胞が寄与する血管形成を促進するのではないかと予想した。

本論文ではまず、SDF1 および CXCR4 の mRNA 発現パターンと、CXCR4 を強制発現された体節細胞の挙動を詳細に解析した後、体節細胞における Notch シグナルと SDF1/CXCR4 シグナルとの関連を検証した。次に、CXCR4 発現細胞が引き起こす細胞移動という特性を利用し、時期特異的遺伝子発現法 (Tet-on system) (Watanabe et al., 2007) とトランスポゾンを用いた長期遺伝子発現法 (To12-トランスポゾン法) (Sato et al., 2007) を活用して、体節由来の血管形成における Notch シグナルの役割を「細胞移動」と「血管内皮細胞への分化」に分離することを試みた。この結果、Notch シグナルは体節細胞による血管形成過程のもっとも最終的なステップ、つまり血管周辺に到達したナイーブな体節細胞を血管内皮細胞へ分化させるステップにおいて決定的な役割を担っていることを明らかにした (Ohata et al., in press)。以上の結果は、本論文の「第一部・ケモカイン SDF1/CXCR4 から探る体節由来の初期血管形成と Notch シグナルの役割」としてまとめた。

一方で、CXCR4 は上述のように体節細胞で発現するのみならず、初期胚体内の血管内皮細胞でも発現していることを見出している。そこで、CXCR4 の血管内皮細胞での役割に注目した研究内容を、「第二部・血管サブタイプを規定するケモカイン SDF1/CXCR4 の役割」として述べる。

## 血管形成とケモカイン SDF1/CXCR4 シグナル

これまでの膨大な知見から、CXCR4 はヒト由来の臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC 細胞: human umbilical vein endothelial cell) や大動脈血管内皮細胞 (HAEC 細胞: human aorta endothelial cell) など、種々の血管内皮細胞に発現することがわかっている (Salcedo and Oppenheim, 2003; Salcedo et al., 1999)。また、CXCR4 ノックアウトマウスは、ケモカインファミリー分子群のノックアウトマウスの中で唯一血管形成に異常を示し、背側大動脈や主静脈などの大血管や卵黄嚢を走行する血管には影響がないものの、胃腸管を取り巻く血管の形成不全により、胎生 18.5 日目に致死となることが報告されている (Tachibana et al., 1998)。この胃腸管血管の形成には、CXCR4 の血管内皮細胞自体での働きが必要であることが、血管内皮細胞特異的に CXCR4 をノックダウンさせたトランスジェニックマウス (Tie2-CRE/CXCR4<sup>flox/-</sup>マウス) の解析から明らかとなった (Ara et al., 2005)。興味深いことに、ノックアウトマウスの胃腸管血管は、胎生 11.5 日までに作られる血管叢の時点では異常が見られないが、その後の血管リモデリングが起こらず、結果として正常な血管パターンが形成されない (Ara et al., 2005)。これらの知見から、血管内皮細胞で発現する CXCR4 は、脈管形成過程には影響しないが、血管リモデリングの過程で何らかの働きを担っていることが予想された。これまでの知見から、マトリゲルなどを用いた *in vitro* での三次元培養系では、HUVEC 細胞や HAEC 細胞は、SDF1/CXCR4 を介して細胞移動を起こし、さらに血管様の管構造を作ることがよく知られている (Salvucci et al., 2002)。しかしながら、実際の発生過程の生体内血管パターンニングにおいて、SDF1/CXCR4 が血管内皮細胞のどのような挙動を制御しているのかについては、未知である。

私は本研究を通して、CXCR4 ノックアウトマウスでは、背側大動脈から伸長し、肋骨と肋骨の間を規則正しく走行する肋間血管 (intercostal vessel) に

重篤な形成不全が認められることを新規に発見した。興味深い事に、肋間血管が接続する背側大動脈には異常は見られなかったことから、CXCR4 は肋間血管という血管サブタイプ特異的に必須であることを見出した。そこで、CXCR4 の mRNA 発現パターンを調べてみると、CXCR4 は形成中の肋間血管の内皮細胞には発現しているが、連結する背側大動脈の内皮細胞には発現していなかった。このように、一見は連続した管であるにも関わらず、背側大動脈と肋間血管という血管サブタイプの違いによって、CXCR4 は異なる発現パターンを示していたのである。

それでは、CXCR4 の発現によって規定される血管内皮細胞の性質とは何なのだろうか？ 図 3 に示すように、発生過程で見られる血管の状態には、一般的に大きく分けて二種類あるとされる。一つ目は、血管伸長やリモデリング、細胞増殖などを盛んに行う「未熟で活発な (active)」状態である。これとは逆に、血管伸長を停止させて安定化する「成熟した静的な (quiescent)」状態がある。静的血管では、血管内皮細胞の接着は強固になり、血管の周囲に平滑筋細胞やペリサイトといった血管支持細胞を集積させる現象が見られる (Jain, 2003)。本研究の解析から、CXCR4 は肋間血管の血管内皮細胞を、血管伸長に対して促進的に働く「動的」な状態にさせることによって、肋間血管の形成を促している可能性が見えてきた。CXCR4 がどのような分子と相互作用するのかについては、考察で論じる。

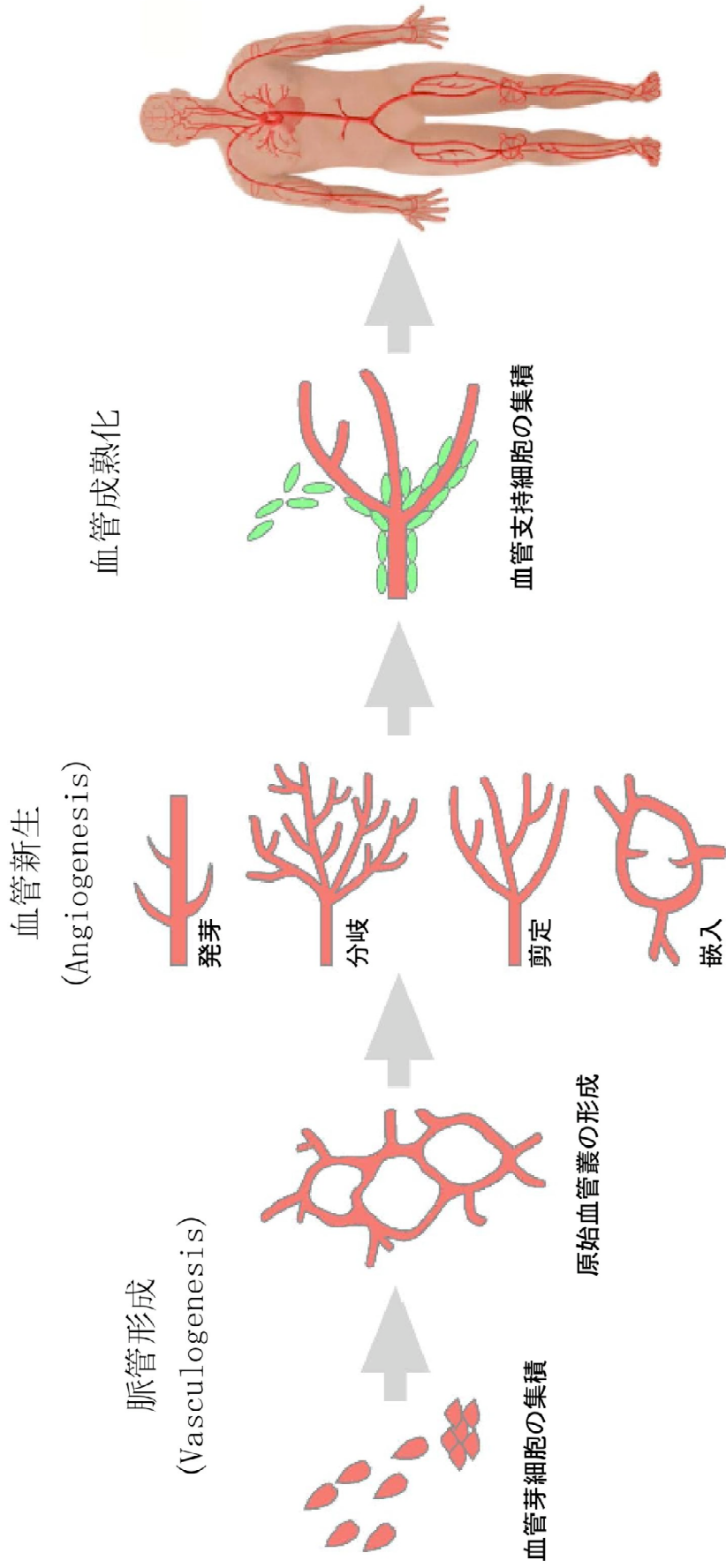


図1. 発生過程でみられる血管形成

脈管形成の過程では、血管が形成される場所に血管芽細胞が集積して原始血管叢が形成される。次に血管新生の過程では、発芽・分岐・剪定・嵌入といった血管リモデリングが起こり、次第に整った血管パターンが作られる。さらに、血管は周囲に血管支持細胞（緑色の細胞）を集積させることによって物理的に安定化し、成熟血管となる。

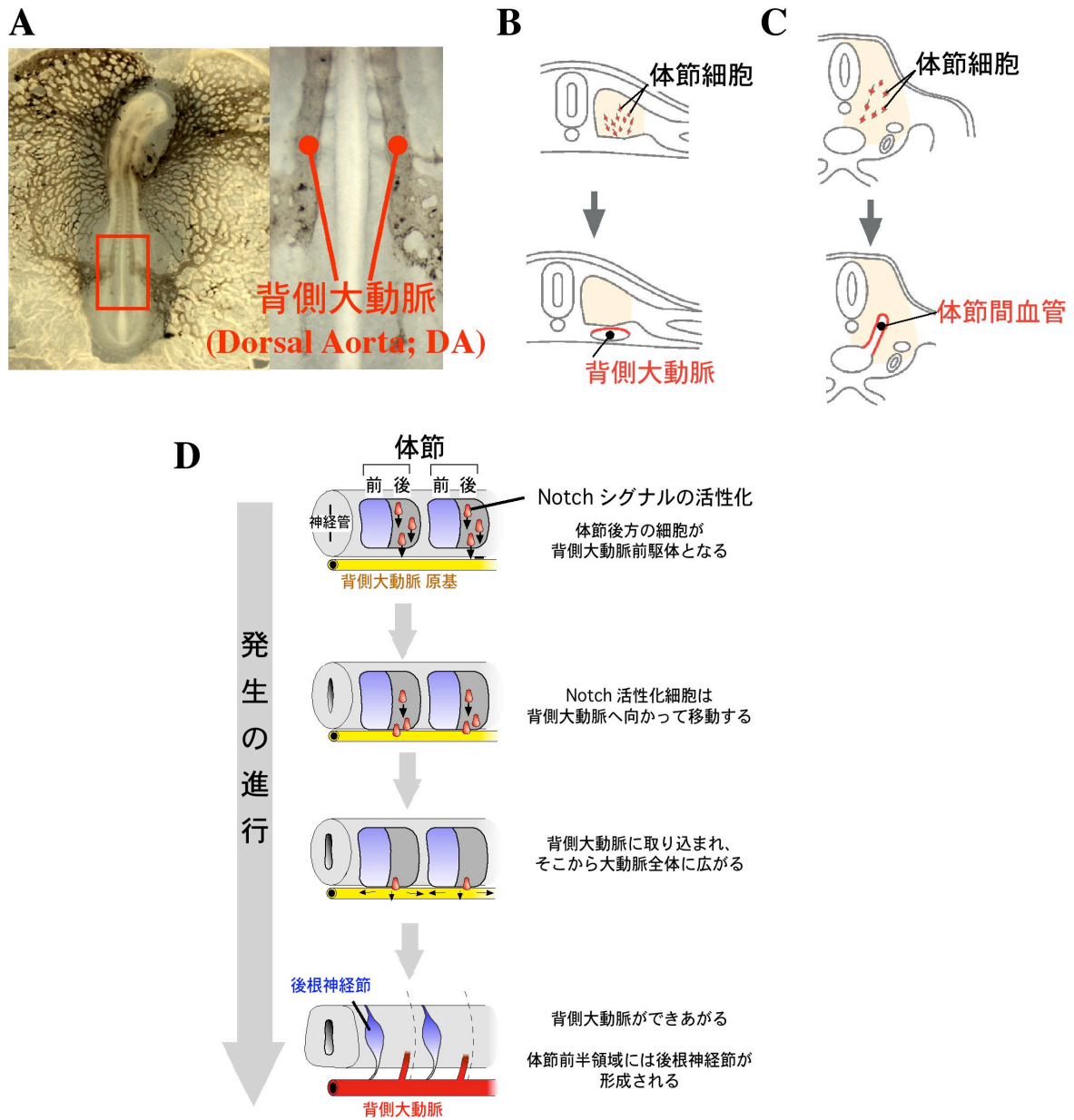


図2. 体節細胞は背側大動脈を含む体幹部の血管を生み出す

(A) ステージ 13 (約 19 体節) のニワトリ胚において、心臓から黒インクを注入し、血管を可視化した。胚体外の血管網の他、体幹部において体節の腹側を走る背側大動脈や、そこから胚体外へ通じる卵黄動脈などが見られる。(B, C) 体節由来の血管形成の模式図。体節の細胞は、まず背側大動脈の背側半分 of 血管内皮細胞となり、その後腹側半分を含む背側大動脈全ての血管内皮細胞となる (B)。さらに、背側大動脈と連結して伸長する体節間血管の形成にも、体節細胞が寄与することがわかっている (C)。(Pardanaud et al., 1996 より改変) (D) Notch 活性は、体節細胞を背側大動脈へと移動させ、さらに背側大動脈の血管内皮細胞に分化させることが明らかになった。Notch 依存的なこのような細胞移動は、体節の後半領域でのみ起こる。(Sato et al., 2008 より改変)

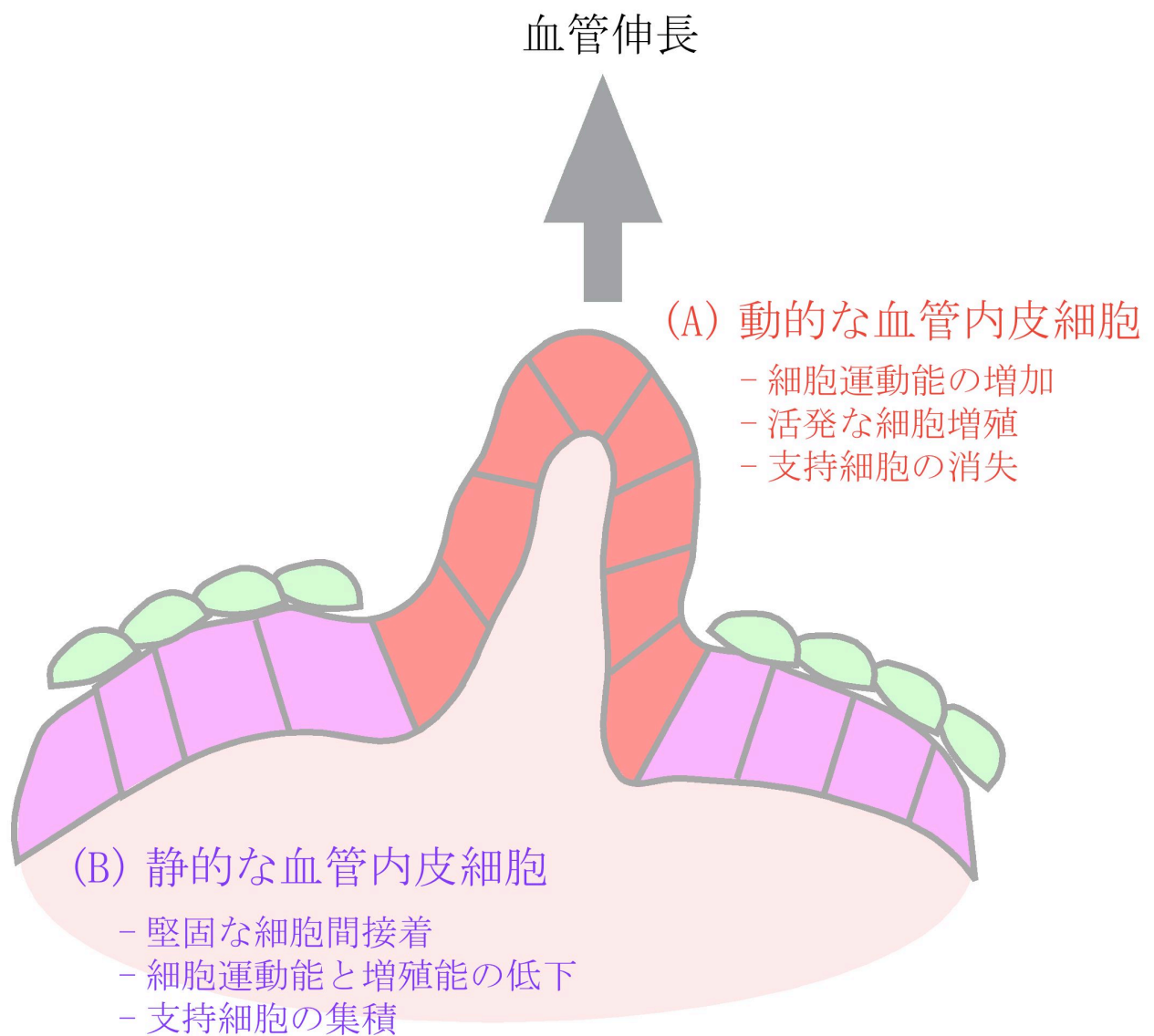


図 3. 血管伸長に対する血管内皮細胞の 2 つの状態

(A) 伸長に対して促進的な状態、すなわち動的 (active) な状態の血管内皮細胞 (図中の赤色細胞) は、一般的に細胞移動能や増殖能が高い。さらに、血管支持細胞 (緑色細胞) を周辺から消失させ、血管伸長やリモデリングの起こりやすい状態になっている。(B) 逆に伸長を停止した静的 (quiescent) な状態の血管内皮細胞 (マゼンダ色細胞) は、一般的に隣接する内皮細胞間の接着が強固になり、細胞移動能や増殖能が低下する。また、周囲に血管支持細胞を集積させることで、物理的に安定した構造をとる。

## 材料と方法

### (1) ニワトリ胚とウズラ胚

ニワトリ有精卵は城山鶏園、ウズラ有精卵は東海有機より購入した。それぞれの有精卵を 38.5°C、湿度 100%の条件下でインキュベートし、各実験に適した発生段階の胚を得た。本論文中に記す発生ステージは、Hamburger-Hamilton の発生段階表 (Hamburger and Hamilton, 1992) に従った。

### (2) CXCR4 ノックアウトマウス

C57BL/6 バックグラウンドの CXCR4<sup>-/-</sup>マウスは、京都大学・再生研の長澤丘司教授より供与いただき (Tachibana et al., 1998)、本学動物実験施設にて飼育を行った (動物実験専門部会・承認番号 18)。ジェノタイプは、ノックアウトマウス作製時にゲノム中の CXCR4 の二番目のエキソン領域に挿入されたネオマイシン耐性遺伝子を指標とし、マウス耳片または羊膜を ES lysis buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin, 0.45% Tween20, 0.45% NP-40) に溶解させてゲノムテンプレートを作製し、以下のプライマーを用いて PCR 反応を行った。

Forward primer; agacagacgtgagaaaaacaaggtt

WR primer; tgatgaagtagatggtgggcaggaa

R primer; gttcgaattcgccaatgacaagacg

PCR 反応には rTaq (TOYOBO) を用い、各プライマーを 4 pmol (F と WR または F と R プライマーの組み合わせ)、20% Betain (Sigma)、2  $\mu$ l ゲノムテンプレートを加えた。

PCR プログラム; (94°C, 5 min)  $\rightarrow$  [(94°C, 30 sec)  $\rightarrow$  (63°C, 30 sec)  $\rightarrow$  (72°C, 30 sec)] x35 cycles  $\rightarrow$  (72°C, 7 min)  $\rightarrow$  (4°C)

### (3) ニワトリ胚血管可視化のためのインクのインジェクション

ニワトリ 2 日目胚は眼科ハサミを用いてタマゴから切り出し、PBS 内で卵黄をよく洗い落とした後、PBS を満たしたシャーレに移す。胚は腹側を上に向け、心臓にガラスキャピラリーを刺し、インク溶液をインジェクションする。黒インク溶液を用いる場合は、黒インク (Holbein) を HANKs' buffer (140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.6 mM グルコース, 0.34 mM NaHPO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7) で 6 倍希釈して使用した。蛍光インクを用いる場合には、HANKs' buffer で 2 倍希釈して使用した。

### (4) 発現ベクター

DsRedExpress (Clontech) は pCAGGS (Niwa et al., 1991) の SmaI-EcoRV サイト (当研究室の渡邊忠由博士が作製)、pTRE (Clontech) の HindIII サイト (当研究室の高瀬悠太さんが作製) にそれぞれ挿入した。ニワトリ CXCR4 (GenBank #AF294794) (ORF 1.2 kbp) (Tonegawa et al., 2003) の ORF は、pCAGGS の EcoRI-XbaI サイト、pTRE-EGFP (Clontech) (Watanabe et al., 2007) の MluI サイト、pTRE-DsRedExpress の EcoRV サイト、pT2K-BI-TRE-EGFP (Sato et al., 2007) の EcoRV サイト、pT2K-CMS-EGFP (当研究室の齋藤大介助教が作製) の MluI-EcoRV サイトにそれぞれ挿入した。pTRE-NotchΔE-6xmyc-EGFP (NotchΔE-6xmyc は Dr. R. Kopan から提供 (Schroeter et al., 1998) と pTP1-Venus (慶応大学・岡野栄之教授より提供 (Kohyama et al., 2005) は、佐藤らの論文に従った (Sato et al., 2008) )。NotchΔE-6xmyc は pTRE-DsRedExpress の EcoRV サイトに挿入した。pTRE-DN-RhoA, pTRE-N-WASP-CRIB, pTRE-DN-Rac1 は当研究室の渡邊忠由博士によってサブクローニングされた (Watanabe et al., 2007)。

以下の 6 種のクローニングに関しては、個別に記す。

#### 4-1. トリ SDF1



トリ SDF1 は、GenBank #AY.451855 を参照した (ORF 2.4 kbp)。ニワトリ 2 日目胚の体幹部から精製した cDNA をテンプレートとし、以下のプライマーセットを使って、KOD (TOYOBO) を用いて PCR 反応を行い、pCAGGS の EcoRV サイト、pT2K-BI-TRE-EGFP の MluI-EcoRV サイトに挿入した。

Forward primer; gcgcACGCGTatggacctccgcgccttgge

Reverse primer; gcgcGATATCttacttgtttaaagctttctcc

#### 4-2. トリ Angiopoietin1

トリ Angiopoietin1 は、GenBank #XM\_418382 を参照した (ORF 1.5 kbp)。ニワトリ 4 日目胚の体幹部から精製した cDNA をテンプレートとし、以下のプライマーセットを使って、KOD を用いて PCR 反応を行い、pBluescript (以下 pBS) と pT2K-BI-TRE-EGFP にそれぞれ MluI, EcoRV で挿入した。

Forward primer; acagACGCGTatgtcagttttcctttcctt

Reverse primer; ctgcGATATCttaaagccaaggccgaa

#### 4-3. トリ Tie2 (partial)

Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) を用いて、ヒト Tie2 (GenBank #L06139, ORF 3.4 kbp) の配列をニワトリゲノムと比較し、プライマーを設計した。ExTaq (TAKARA) を用いて PCR 反応を行い、PCRII-TOPO (Invitrogen) に挿入した。

Forward primer; ccagatacataggaggaaacctctt

Reverse primer; tcttgaaatttgatgtcattccatt

#### 4-4. トリ PDGFa

ニワトリ PDGFa は GenBank #NM\_204306 を参照した (ORF 585bp)。ニワトリ 5 日目胚の体幹部から精製した cDNA をテンプレートとし、以下のプライマーセ

ットを使って、KOD を用いて PCR 反応を行い、pT2K-BI-TRE-EGFP の MluI-EcoRV サイトに挿入した。

Forward primer; acacACGCGTatgaggacctgggcttgcgTTTTGctgatagg

Reverse primer; ggagGATATCttaatcagttttcttctctc

#### 4-4. トリ PDGFb

ニワトリ PDGFb は GenBank #NM\_204270 を参照した (ORF 756bp)。ニワトリ 5 日目胚の体幹部から精製した cDNA をテンプレートとし、以下のプライマーセットを使って、KOD を用いて PCR 反応を行い、pT2K-BI-TRE-EGFP の MluI-EcoRV サイトに挿入した。

Forward primer; atatACGCGTatgtgccccgagccggcaag

Reverse primer; cgacGATATCctatgctatgaggatttctt

#### 4-5. トリ PDGF receptor $\beta$ (PDGFR $\beta$ )

ニワトリ PDGFR $\beta$  は GenBank #XM\_001233829 を参照した (ORF 3.2kbp)。ニワトリ 5 日目胚の体幹部から精製した cDNA をテンプレートとし、以下のプライマーセットを使って、KOD を用いて PCR 反応を行い、NheI-HpaI (ベクター側は NheI-EcoRV) を用いて、pT2K-BI-TRE-EGFP に挿入した。

Forward primer; agagGCTAGCatgctctgtccctctctgaa

Reverse primer; gtgaGTTAACctacagaaagctctcctcca

### **(5) shRNA を用いた RNAi コンストラクトの作製**

#### 5-1. ターゲット配列の決定

ニワトリ CXCR4 に対する RNAi のターゲット配列は、iGENE の「shRNA/siRNA デザインサービス」を利用して決定した。

## CXCR4

ポジション (ORF内の位置)	ターゲット配列 (センス鎖)	活性予測値順位
	936 UGCCAAGUUCAAAACAUCAGCACAA	1
	721 CGCAAAGCCUUGAAGACAACAGUUA	2
	935 GUGCCAAGUUCAAAACAUCAGCACAA	3
	208 GGCUACCAGAAGAAGCAAAGAAGCA	4
	986 GAUCAAGCCUCAAGAUUCUUUCAA	5

このうち、活性予想値順位 1 位の配列は A が 4 つ並ぶ配列があるため、polIII 系で転写が行われる pSilencer 1.0-U6 ベクター (後述) を使用する際には転写が停止してしまう恐れがあったので候補からはずし、予想順位 2 位の配列 (721) を用いることにした。コンストラクションには、以下の 19 mer のオリゴヌクレオチドを用いた。

CXCR4-shRNA #1 (ORF の 721-739 bp に相当); 5'-CGCAAAGCCTTGAAGACAA-3'

CXCR4-shRNA #2 (ORF の 466-484 bp に相当); 5'-CTGTTGGCTGAGAAGATTG-3'

Random-shRNA; 5'- GCAATGACGCAGGTGACCA-3'

### 5-2. shRNA 発現プラスミドの構築

ベクターは、pSilencer 1.0-U6 (Ambion)、または DOX 添加後に発現誘導できる pSingle-tTS (Clontech) にそれぞれ EGFP を挿入したもの (当研究室の齋藤大介助教が作製、以後 pSilencer 1.0-U6-EGFP、pSingle-tTS-EGFP と記す) を用いた。予想配列の 19 mer に、推奨されているループ配列と poly A 配列を付加し、さらにライゲーションのために末端に制限酵素サイトを付加した以下のオリゴ (CXCR4 #1 の場合を記す。その他も同様) を使用した。

pSilencer 用 Sense 配列;

CGCAAAGCCTTGAAGACAAAttcaagagaTTGTCTTCAAGGCTTTGCGtttttt

pSilencer 用 Antisense 配列;

AATTaaaaaaCGCAAAGCCTTGAAGACAAAtctcttgaaTTGTCTTCAAGGCTTTGCGggcc

pSingle 用 Sense 配列;

tcgaggCGCAAAGCCTTGAAGACAAttcaagagaTTGTCTTCAAGGCTTTGCGcttttttACGCGTa

pSingle 用 Antisense 配列;

agcttACGCGTaaaaaagCGCAAAGCCTTGAAGACAAtctcttgaaTTGTCTTCAAGGCTTTGCGcc

このオリゴのペア 1 ng 分ずつに High buffer (500 mM Tris-HCl [pH 7.5], 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Dithiothreitol, 1 M NaCl)を加えて計 100 μl とし、gradient PCR 法 (99 分 59 秒かけて 99°C から 4°C まで下げていく) により、アニーリングを行った。その後、エタノール沈殿で精製し、20 μl TE (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0])に溶解させた。この精製オリゴを、pSingle 1.0-U6 (Ambion)の ApaI-EcoRI サイト、pSingle-tTS-shRNA-EGFP (Clontech)の XhoI-HindIII サイトに挿入した。

#### (6) *in situ* hybridization 用 RNA プローブ作製

RNA プローブ作製に必要な cDNA 断片を含むプラスミドを次表に示す制限酵素で処理し、鎖状にした。または、cDNA 断片内の制限酵素サイトが未知の場合は、T3/T7 RNA polymerase 認識配列を含むプライマーを用いて PCR で増幅し、増幅産物をテンプレートとした。これらを鋳型とし、Digoxigenin (DIG) ラベルされた dNTP (Roche)、または DNP ラベルされた dNTP (Perkin Elmer)存在下で RNA polymerase を 37°C で 2 時間反応させた。反応系は以下の通りである。

#### T3/T7 polymerase を用いた反応系 (1 サンプル/20μl)

- 10x DIG-labeled dNTP mix (Roche)

または 10x DNP-labeled dNTP mix (Perkin Elmer) 2.0μl

- 5x transcription buffer including DTT (STRATAGENE) 4.0μl

- RNase Inhibitor (TAKARA) 0.5μl

- H<sub>2</sub>O 10.5μl

- cDNA テンプレート (1.0 μg/μl) 2.0μl

- T3/T7 RNA polymerase (STRATAGENE) 1.0 $\mu$ l

Sp6 polymerase を用いた反応系 (1 サンプル/20 $\mu$ l)

- 10x DIG-labeled dNTP mix (Roche) 2.0 $\mu$ l

- 5x Sp6 transcription buffer (Invitrogen) 4.0 $\mu$ l

- 10mM DTT (Invitrogen) 2.0 $\mu$ l

- RNase Inhibitor (TAKARA) 0.5 $\mu$ l

- H<sub>2</sub>O 7.5 $\mu$ l

- cDNA テンプレート (0.2 $\mu$ g/ $\mu$ l) 2.0 $\mu$ l

- Sp6 RNA polymerase (Invitrogen) 2.0 $\mu$ l

生成産物を G-50 column (Amersham)に通し、エタノール沈殿で精製した後、100  $\mu$ l の hybridization buffer (50% formamide, 4xSSC (SSC; 0.6 M NaCl, 0.6 M tri-sodium citrate dehydrate, pH4.5) , 5 mM EDTA, 0.5% SDS, 50 mg/ml yeast tRNA, 50 mg/ml heparin, 0.2% Tween20, 0.5% CHAPS) に希釈し、-30 $^{\circ}$ Cで保存した。各プローブの情報を以下にまとめた。

RNAプローブ名	プローブの塩基数	cDNA断片を含むプラスミド	制限酵素サイトと RNA polymerase (Antisenseプローブ)	作成者/提供者
トリCXCR4 ORF	1.2kbp	pBS SK(+)	EcoRI/T3	当研究室 利根川あかね博士
トリCXCR4 3'-UTR	0.9kbp	pCRII-Topo	BamHI/T7	当研究室 利根川あかね博士
トリSDF1	2.4kbp	pCRII-Topo	BamHI/T7	当研究室 利根川あかね博士
マウスCXCR4	1.1kbp	pBS SK(+)	NotI/T3	京大・再生研 長澤丘司教授
マウスSDF1-#1	1kbp	pCRII-Topo	XhoI/T3	京大・再生研 長澤丘司教授
マウスSDF1-#2	1kbp	pCRII-Topo	HincII/T7	京大・再生研 長澤丘司教授
トリCXCR7	1.1kbp	pBS SK(+)	MluI/T3	当研究室 齋藤大介助教
Angiopoietin1	1.5kbp	pBS SK(+)	PCR増幅/T3	大畑絵美
Tie2	1.9kbp	pCRII-Topo	PCR増幅/Sp6	大畑絵美
VEGF	0.6kbp	pBS SK(+)	EcoRI/T7	当研究室 利根川あかね博士
Quek1 (VEGF receptor 2)	0.5kbp	pBS SK(+)	EcoRI/T7	当研究室 利根川あかね博士
TGFβ2	0.6kbp	pBS SK(+)	MluI/T3	当研究室 齋藤大介助教
TGFβ3	0.6kbp	pBS SK(+)	MluI/T3	当研究室 齋藤大介助教
PDGFα	0.7kbp	pBS SK(+)	EcoRI/T7	大畑絵美
PDGF receptor α	0.8kbp	pBS SK(+)	EcoRV/T7	当研究室 齋藤大介助教
PDGFβ	0.7kbp	pBS SK(+)	EcoRI/T7	大畑絵美
PDGF receptor β	0.6kbp	pBS SK(+)	KpnI/T3	大畑絵美
CTGF	1.0kbp	pBS SK(+)	MluI/T3	当研究室 齋藤大介助教
VE-cadherin	0.9kbp	pBS SK(+)	PCR増幅/T7	当研究室 佐藤有紀博士

### (7) Whole-mount および切片を用いた *in situ* hybridization

Whole-mount *in situ* hybridization は Henrique のプロトコールを基本とし、以下の手順で行った (Henrique et al., 1995)。ステージ 10~20 の胚 (約 10 体節 ~ 3 日目胚) は、4% paraformaldehyde (PFA) /MEM/phosphate-buffered saline (PBS) (MEM; 0.1 M MOPS, 1.8 mM EGTA, 1 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O [pH7.4], PBS; 2.73 M NaCl, 53.7 mM KCl, 166 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) を用いて 4°C で一晩固定した。固定後、PBT (PBS + 0.1% Tween20) で洗浄した。RNA プローブの浸透性をあげるために、20 μg/ml の Proteinase K (Roche) で 15 分間処理し、4% PFA/0.1% glutaraldehyde (TAAB) /PBT で 20 分間再固定した。PBT で洗浄してから hybridization buffer (ULTRAhyb™, Ambion) を用いて 68°C で 1 時間 pre-hybridization を行った。DIG ラベルされた RNA プローブを添加し、68°C で一晩 hybridization を行った。余分なプローブを除くために 68°C に温めた hybrid-wash buffer (50% formamide, 5x SSC, 5 mM EDTA, 2% Tween20, 0.5% CHAPS)

を用いて、30分ずつ2回洗浄した。MABT (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, 1% Tween20 [pH7.4]) に置換した後、blocking buffer I (2% Blocking Reagent (BBR, Roche), MABT)、blocking buffer II (2% BBR, 20% FBS, MABT) を用いて、それぞれ室温で1時間ずつブロッキングした。アルカリフォスファターゼ標識の抗DIG抗体(alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibody Fab fragment, ヒツジ由来, Roche) を blocking buffer II で 2000 倍希釈し、4°Cで一晩反応させた。余分な抗体を除くために MABT を用いて1時間ずつ3回洗浄した後、NTMT (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl [pH9.5], 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween20) に置換し、0.45 mg/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。発色後、PBT で洗浄し、4% PFA/PBT を用いて 4°Cで 20 分間固定し、PBT で 4°Cにて保存した。

パラフィン切片を用いた in situ hybridization は、4% paraformaldehyde (PFA) / PBS を用いて 4°Cで一晩固定したサンプルを用いた。エタノールとキシレンを用いてサンプルを脱水した後、パラフィンに置換し包埋した。ミクロトームを用いて 10-14  $\mu\text{m}$  の切片を作製し、APS コートスライドガラス (MATSUNAMI) に貼り付けた。キシレンで脱パラフィンを行い、エタノール希釈系列を経て水和させた切片は、PBT で洗浄後、1  $\mu\text{g/ml}$  の Proteinase K (Roche) で 37°C、7 分間処理し、4% PFA/ 0.1% glutaraldehyde/ PBT で 20 分間再固定した。PBT で洗浄後、pre-hybridization buffer (50% formaldehyde, 6x SSC [pH5.0], 0.5% SDS, 100  $\mu\text{g/ml}$  Heparin) で 5 分間処理し、DIG ラベルされた RNA プローブを含む ULTRAhyb™ を切片上で反応させ、65°Cで一晩 hybridization を行った。余分なプローブを除くために、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, 25 mM 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)を経て、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。余分な抗体をのぞくために、TBST で洗浄後、NTMT に置換し、whole-mount *in situ* hybridization と同様の方法で発色させた。発色後、後固定を行い、エタノールで脱水後、キシレンに置換し、ENTELLANneu (Merck) を用いて切片を封入した。シグナルは、AxioskopII (Carl Zeiss) を用いて画像取り込みを行った。

#### (8) 切片を用いた蛍光 *in situ* hybridization と GFP 免疫染色法

基本的なプロトコールは、上記の切片を用いた *in situ* hybridization と同様であるが、いくつか変更点がある。4% PFA/PBS で 4°Cで一晩固定したサンプルは、PBS で洗浄後、30% スクロース/PBS に置換し、O. C. T. Compound (Tissue-Tek) を用いて包埋した。クライオスタットを用いて 10 $\mu$ m の切片を作製し、APS コートスライドガラスに貼り付けた。50°Cで一晩切片をよく乾かした後、PBS で洗浄して O. C. T. Compound を除いた。*in situ* hybridization 後に GFP 免疫染色を行うため、Proteinase K 処理は行わなかった。RNA プロブは TSA plus Cy3 system (Perkin Elmer) を用いて検出するため、サンプル内の内在性 HRP を失活させるために、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/メタノールで 30 分間室温にて処理した。Hybridization には、DNP ラベルされた RNA プロブを用いた。TBST の代わりに TNT buffer (1 M Tris-HCl [pH7.5], 5 M NaCl, 20% Tween20) を使用し、Blocking buffer (1% BBR, TNT) を反応させた。RNA プロブの検出には、1000 倍希釈した HRP 結合型の抗 DNP 抗体 (Perkin Elmer) を用いた。TSA plus Cy3 system で発色させた後、TNT で洗浄し、1000 倍希釈したラビット由来の抗 GFP 抗体 (Clontech) を反応させ、500 倍希釈した Alexa 488 抗ラビット抗体 (Molecular probes) で検出した。TNT で洗浄後、FluorSave reagent (Calbiochem) で切片を封入した。蛍光シグナルは、Apotome system を搭載した AxioPlanII



(Carl Zeiss)を用いて画像取り込みを行った。

### (9) 体節中胚葉を標的とした *in ovo* electroporation

方法は、Ohata et al., に従った (Ohata and Takahashi, 2009)。ステージ 8-9 (約 4-7 体節) の胚を用いて遺伝子導入を行った。卵の殻に穴をあけ注射器を用いて卵白を 2 ml 抜いた後、眼科用ハサミで殻に小窓を開けた。胚を可視化するために、Hank's 液 (140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.6 mM glucose, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH7.0) で 6 倍希釈した黒インク (HOLBEIN) を、ガラスキャピラリー (DRUMMOND SCIENTIFIC のマイクロヘマトクリット用のものを加工) を用いて胚と卵黄の間に注入した。タングステン針でビテリン膜を破り、ヘンゼン結節の位置を確認した。導入する遺伝子溶液 (2% Fast Green/PBS を色素として添加) を、ヘンゼン結節よりも後方の原始線条上とその周辺の原始外胚葉 (エピブラスト) に滴下した。プラス電極に白金線を、マイナス電極にタングステン針を用いた。プラス電極は胚の下方にくるように卵黄の中に挿入し、DNA 溶液を滴下した領域の細胞にマイナス電極で 5V、25 msec の電気パルス を 4 回加えた。電極をはずし、卵殻に開けた小窓をテープ (Scotch™) でシールして 38.5°C で再びインキュベートし、必要なステージになるまで発生を進めた。

Doxycycline 投与依存的な遺伝子発現は、Watanabe et al. と Sato et al. に従った (Sato et al., 2007; Watanabe et al., 2007)。500 μl の doxycycline (0.1 mg/ml) を卵黄の中にインジェクションした。

### (10) DF-1 細胞の継代とトランスフェクション

ニワトリ繊維芽細胞に由来する DF-1 細胞 (ATCC) (Himly et al., 1998) は、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM、日水製薬) に 1.5 g/l sodium bicarbonate、4.5 g/l glucose、10% fetal bovine serum (FBS)、50 IU/ml

Penicillin、50 mg/ml Streptomycin を加えた培養液を用いて 39°C、5% CO<sub>2</sub>、湿度 100%の条件下で培養した。継代は、細胞が培養皿面積の 90%程度に増えた段階で行った。培養皿に接着した細胞をはがすため、1.25% trypsin (GIBCO) /1mM EDTA を 37°Cで 5 分間作用させた。培養液を加えて trypsin の反応を停止させピペッティングした後、細胞を回収し、室温、1100rpm で 5 分間遠心して trypsin を含む上清を除去した。そこへ新たに培養液を加えて細胞を懸濁し、必要量を新しい培養皿に播種し、CO<sub>2</sub>インキュベーターに戻して培養を続けた。

トランスフェクションには、Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用い、プロトコールは説明書に従った。

## (11) Northern blotting

### 11-1. RNA の精製

Lipofectamine 2000 を用いて、pCMS-CXCR4-myc-RFP (50ng 分)と pSilencer 1.0-U6-CXCR4-shRNA-#1-EGFP または CXCR4-shRNA-#2 または pSilencer 1.0-U6-random-shRNA-EGFP(それぞれ 4 μg 分)をそれぞれ DF-1 細胞にトランスフェクションし、30 時間後に細胞を 1.25% trypsin/1mM EDTA で培養皿からはがして回収した。RNA の精製には、QIAshredder Mini Spin Column と RNeasy Mini Spin Column (共に QIAGEN)を用い、プロトコールは説明書に従った。最終的に、30 μl H<sub>2</sub>O で溶出し、1.5 μg/μl に調製した後、-80°Cで保存した。

### 11-2. Northern blotting 用 RNA プローブ作製

CXCR4 検出のための RNA プローブは、前述の CXCR4 ORF プローブと CXCR4 3'-UTR プローブを用いた ((6) *in situ* hybridization 用 RNA プローブ作製を参照)。

ニワトリ β-actin をクローニングし、実験コントロール用のプローブとした。ニワトリ 2 日目胚の体幹部から精製した cDNA を用いて、以下のプライマーセット (プライマーデザインは、当研究室の嘉新五希さん) で PCR をかけ、

pCRII-TOPO へ挿入した。

5'-primer; CTGTGCCCATCTATGAAGGC

3'-primer; CAGACAGCACTGTGTTGGCA

ニワトリ  $\beta$ -actin の Antisense プローブは、Sp6 polymerase を用いて作製した。

作製した RNA プローブは G-50 column に通し、100  $\mu$ l TEN (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 20 mM EDTA [pH 8.0], 100 mM NaCl) で溶出し、濃度を測定した。プローブは-80°Cに保存した。

### 11-3. Northern blotting

RNA サンプルの電気泳動には、1% ホルムアルデヒドゲル (1% agarose L03 (TAKARA), 4% formaldehyde, 1.2x MOPS (24 mM MOPS, 6 mM NaOAc, 1.2 mM EDTA, pH 7.5)を用いた。各 RNA サンプル 2  $\mu$ g 分に対して、8.5  $\mu$ l Loading buffer (5.6  $\mu$ l formamide, 1.1  $\mu$ l 10x MOPS, 1.8  $\mu$ l formaldehyde)を加えて 65°Cで 5 分間の熱処理を行った後、氷上に置いた。1.0  $\mu$ g 分の EtBr と 10x Loading dye (0.1 mg/ml Bromophenol blue, 50%グリセロール) を加えて、50V で電気泳動を行った。泳動バッファーには、1x MOPS を用いた。マーカーとして、RNA ladder (0.5-10kbp 用, Invitrogen)を 1 $\mu$ g 分泳動した。泳動終了後、ゲルに UV を照射して ribosomal RNA の泳動パターンを指標に RNA が分解していないことを確認した後、ニトロセルロースメンブレン (Biodyne A, 1.2 $\mu$ m pore size, Pall corporation、以下メンブレン)に泳動した RNA をブロッティングした。ブロッティング槽 (ATTO corporation)には 20x SSC を満たし、下から順に濾紙 (chromatography paper 3MM (Whatman, #3030-917)を 2 枚、泳動ゲル (ゲル板側を上に向ける)、メンブレン、濾紙を 3 枚、ペーパータオル適量を空気が入らないように重ね、最後に上から重しをして一晩置いた。次に、UV stratalinker 1800 (STRATAGENE)を用いて UV クロスリンク (1200x100  $\mu$ J, 50

秒)を行い、プロッティングした RNA をメンブレンに結合させた。5% 酢酸溶液にメンブレンを浸し、Loading dye の色素を除去した後、0.5M NaOAc/0.04% メチレンブルーを反応させ、H<sub>2</sub>O で洗浄し、RNA の泳動パターンを可視化した。CXCR4 プローブと $\beta$ -actin プローブ用にメンブレンをナイフで切り分け、それぞれをハイブリバッグに入れた。68°Cで 30 分間 Pre-hybridization (ULTRTAhyb) を行ってから、68°Cで一晩、RNA プローブ 10 ng 分を含む ULTRTAhyb を反応させた。余分なプローブを除去するために、室温にて 2x SSC/0.1% SDS で 10 分 2 回、1x SSC/0.1% SDS で 10 分 1 回洗浄した。次に 60°Cにて、0.2x SSC/0.1% SDS で 10 分、0.1x SSC/0.1% SDS で 10 分洗浄した後、MAB (0.1 M マレイン酸, 0.15 M NaCl, pH 7.5)に置換した。Blocking buffer (1% blocking reagent, MAB) を用いて、室温で 30 分間ブロッキングし、再びメンブレンをハイブリバッグに移して、10,000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識の抗 DIG 抗体を室温で 30 分間反応させた。余分な抗体を除くために、Wash buffer (0.3% Tween20, MAB)で室温 15 分、2 回洗浄し、Tris buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5)に置換した。DIG 抗体の検出には、アルカリフォスファターゼの基質となる CSPD (Disodium 3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan]-4-yl)phenyl phosphate) (Tropix)を用いて、1% CSPD/Tris buffer を 5 分間反応させた。メンブレンをハイブリバッグに移し、Hyperfilm ECL (Amersham, #RPN3103K)に感光させるか、LAS-3000 mini (FUJIFILM) でバンドの写真を撮った。データの解析には、Multi Gauge (FUJIFILM)を用いた。

## (12) 免疫染色法

サンプルは 4% PFA を用いて、4°Cで一晩固定した。10  $\mu$ m の凍結切片を作製し、ブロッキングには 2%スキムミルク/PBS を用いた。各一次抗体は、以下の希釈倍率で使用し、4°Cで一晩抗体を反応させた；抗 GFP 抗体（ウサギ由来、

Clontech, 1/1000), 抗 smooth muscle actin 抗体 (マウス IgG2a 由来、Sigma, 1A4, 1/400), QH-1 抗体 (マウス IgG 由来、DSHB, 1/2), 抗 Myc 抗体 (マウス IgG 由来、Santa Cruz, 9E10, 1/500), PECAM-1 抗体 (ラット由来、BD Pharmingen, MEC 13.3, 1/100)。PBS で洗浄後、それぞれの免疫動物に適した二次抗体 (Alexa 568 または 647, Molecular probes) を 500 倍希釈で使用し、室温で 1 時間反応させた。抗マウス CXCR4 抗体 (ウサギ由来、Santa Cruz, sc-9046, 1/300) は、二次抗体に DAKO EnVision (抗ウサギ) を用いて、TSA plus Cy3 systems で検出した。抗 cleaved Notch 1 抗体 (ウサギ由来、Cell Signaling, #2421, 1/500) を用いた免疫染色は、佐藤らのプロトコールに従った (Sato et al., 2008)。蛍光標識された切片は、Apoptome (Carl Zeiss) を搭載した蛍光顕微鏡 Axioplan2 (Carl Zeiss)、または AxioImager (Carl Zeiss) で観察し、CCD カメラ AxioCam (Carl Zeiss) を用いて画像を取得した。

### (13) 背側大動脈移植

*in ovo* エレクトロポレーション法によって体節中胚葉に pTRE-CXCR4-EGFP と pCAGGS-rtTA2s-M2 を導入した胚を受容胚 (ホスト) とし、エレクトロポレーション後 16 時間で DOX を添加し、CXCR4 の発現を誘導した。2.5 日目胚の背側大動脈は、1.25% Pancreatin (GIBCO-BRL)/PBS で処理し、タングステンニードルを用いて組織から取り出した。DOX 添加後 24 時間たった受容胚の体節にタングステンニードルで小さなスリットを作り、供与胚 (ドナー) から取り出した背側大動脈を移植した。卵殻の小窓をシールして、38.5°C で 24 時間インキュベートし、4 日目胚でサンプルを固定した。

### (14) 組織スライス培養とタイムラプス観察

組織スライス培養は、Gros らのプロトコールを基本とし (Gros et al., 2009)、いくつかの改良を加えた。基本培地 (DMEM/Ham's F12 (Wako), 25 mM sodium

bicarbonate, 15 mM HEPES, 50 IU/ml Penicillin (Banyu), 50 mg/ml Streptomycin (Meiji)、培養用培地 (2% B-27 supplement (Invitrogen), 基本培地)、サンプル包埋用ゲル (1% low-melting-point agarose (Invitrogen), DMEM/Ham's F12, 1 mM sodium pyruvate, 5 mM glutamine, 5 mg/ml Fungizone) をそれぞれ調製した。室温、基本培地中で、研いだナイフ (microsurgical blade (FEATHER)) を使ってニワトリ 2.5 日目胚の体幹部から 2 体節を含むスライス (200-250  $\mu$ m) を作製した。スライスサンプルは、35 mm ガラスボトムディッシュ (MATSUNAMI) 上で、サンプル包埋用ゲルを用いて包埋した。10 分後、ゲルが固まった後、ゲルの上から培養用培地を注いだ。LSM5 Pascal confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss) を用いて、タイムラプス観察を行った。画像の解析は、LSM Image Browser software (Carl Zeiss) を使用した。

#### (15) SDF1 産生 DF-1 細胞塊の体節への移植

SDF1 を生産する DF-1 細胞を塊状にする方法は、利根川らのプロトコールを基本とし、以下の手順で行った (Tonegawa et al., 1997)。Lipofectamine 2000 を用いて、pCAGGS-DsRedExpress と共に pCAGGS-cSDF1、またはコントロールとして pCAGGS を DF-1 細胞へトランスフェクションした。移植実験の前日に、これらの細胞を 1% アガロースゲルを敷いたプレート上に播種し、24 時間静置させることで細胞を塊状にした。エレクトロポレーション法によって体節中胚葉に pCAGGS-rtTA2S-M2 と pTRE-CXCR4-EGFP、または pTRE-Notch $\Delta$ E-EGFP を発現させた胚を受容胚とし、ステージ 11-12 (約 13-16 体節) で移植を行った。受容胚の PSM にタンゲステン針で小さな穴を作り、そこに SDF1 を分泌する細胞塊を移植した。卵殻の小窓をシールして、38.5°C で 24 時間インキュベートし、3 日目胚で回収した。

#### (16) マウス胚の骨染色

マウス 17.5 日目胚は、PBS を満たしたシャーレ内でピンセットを用いて表皮をはぎ、肋骨を傷つけないように内臓を取り除いた。まず軟骨を染めるために、サンプルをバイアルに移し、0.15% Alcian Blue (Wako)/80% エタノール/20% 酢酸で室温にて一晩染色した。余分な色素の脱色とサンプルの脱水固定を行うために、100% エタノールに置換した。エタノールは毎日取り替え、1 週間脱水を続けた。1% KOH を用いて一晩透明化処理を行う。次に硬骨を染色するために、0.1% Alizarine Red S (WAKO)/1% KOH で 2 時間染色した。染色を止め、サンプルの透明化を行うために、20% グリセロール/1% KOH に置換し、次第にグリセロールの濃度を上げていき、最終的に 90% グリセロールに置換した。

#### (17) アポトーシス検出 (TUNEL 染色)

in situ Apoptosis Detection Kit (TAKARA) を用いた。脱パラフィンを行った切片は、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/メタノールを用いて、室温で 30 分間処理し、内在性の HRP 活性を失活させた。プロトコールは、キットの説明書に従った。反応液を PBS で除いた後、HRP 標識された抗 FITC 抗体を 37°C で 30 分間反応させた。PBS で洗浄後、0.09 mg/ml DAB/0.004% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS を用いて、室温、遮光で 10 分間発色させた。流水で 10 分間洗浄した後、Mayer's Hematoxylin (Wako) を用いて室温で 3 分間反応させ、核を染色した。再び流水で 10 分間洗浄した後、エタノールとキシレンで脱水し、Entellan New で封入した。

#### (18) 胚体内血管への遺伝子導入

血管へ注入する DNA 溶液は、トランスフェクション試薬の Lipofectamine 2000 を用いて調製した。pCAGGS-tTA (2.5 μg 分) と pTRE-EGFP, pTRE-CXCR4-EGFP (各 2.5 μg 分) をそれぞれ、抗生物質と血清を加えていない OPTI-MEM 19 μl に溶解させる。同様に RNAi の場合は、pCAGGS-p35 (2.5 μg 分) と pSilencer 1.0-U6-random-shRNA-EGFP, pSilencer 1.0-U6-CXCR4-shRNA #1-EGFP, および

pSilencer 1.0-U6-CXCR4-shRNA #2-EGFP (各 2.5  $\mu$ g 分)を調製した。各 DNA 溶液に対して、1  $\mu$ l Lipofectamine 2000/19  $\mu$ l OPTI-MEM を加え、20 分間静置させる。その後、0.3  $\mu$ l フェノールレッド/PBS を加えて、DNA 溶液を着色した。これらの DNA 溶液は、ニワトリ 2 日目胚の心臓から、ガラスキャピラリーを用いて血管内に注入した。24 時間後 (3 日目胚)、再び心臓からガラスキャピラリーを用いて蛍光インクを注入して血管を可視化し、サンプルを回収して固定した。



# 結果

## 第一部

### ケモカイン SDF1/CXCR4 から探る

### 体節由来の初期血管形成と Notch シグナルの役割

#### 初期胚の体幹部で見られる CXCR4 と SDF1 の mRNA 発現パターン

##### (1) Whole-mount でみる遺伝子発現パターン

からだづくりの基本となる大まかなパターンが形成されるステージ 10-20 のニワトリ初期胚（約 10 体節から 3 日目胚に相当）において、CXCR4 および SDF1 の mRNA 発現パターンを *in situ* hybridization 法を用いて詳細に調べた。まず、ステージ 13（2 日目胚、約 19 体節）、およびステージ 20（3 日目胚）のニワトリ初期胚において見られる特徴的なパターンを記す。ステージ 13 の *CXCR4* mRNA は、PSM の後方領域（図 4A；括弧）と次の予定分節境界、また分節後の各体節の後端部で発現が見られた（図 4A；矢印）。体節中胚葉以外の組織では、神経管、中腎管、側板中胚葉に発現していた。また、胚体外につくられる卵黄動脈の網目に沿ったシグナルも見られた。一方、*SDF1* mRNA は同時期の胚において、胚後方を覆う表皮外胚葉と各体節の後端部に強い発現を示した（図 4B；矢印）。表皮外胚葉の発現領域は、胚後方の側板中胚葉と PSM 全域におよび、体節中胚葉では分節直後の体節から 3-4 体節分頭側の位置まで、また側板中胚葉ではそれよりも多少前側まで広がっていた。*SDF1* mRNA は、神経管および神経管を覆う表皮外胚葉には発現していなかった。ステージ 20 の胚（3 日目胚）で発現パターンを調べると、*CXCR4* mRNA と *SDF1* mRNA はそれぞれ各体節の後端部に発現が認められた（図 4E, 4F；矢印、写真は胚を側方から見たもの）。

次に、胎生 8.5-9.5 日目のマウス胚（ニワトリの 2-3 日目胚に相当）の体節中

胚葉とその周辺組織における *CXCR4* および *SDF1* の mRNA 発現パターンを、同様に *in situ* hybridization 法によって調べた。*CXCR4* mRNA は、8.5 日目胚において、PSM の後方領域 (図 4C; 括弧) と次の予定分節境界付近 (図 4C; 矢印)、また神経管に発現していた。9.5 日目胚では、各体節の後端部に発現が見られた (図 4G, 4H; 矢印)。*SDF1* mRNA は、8.5 日目胚では PSM 後方領域の表皮外胚葉に強い発現を示し (図 4D)、9.5 日目胚では PSM 後方領域と各体節の後端部に発現していた (図 4I; 矢印)。これらの結果から、マウス胚での発現パターンはニワトリ胚で見られたものと類似しており、*CXCR4* および *SDF1* の機能は種間で保存されている可能性が高い。

次に、*CXCR4* および *SDF1* の遺伝子発現パターンが発生段階によってどのように変化するのかを調べた。ステージ 10 (約 10 体節) において、*CXCR4* mRNA は次の予定分節境界と各体節の後端部、また神経管、中腎管、中間中胚葉で発現が見られた (図 5A)。ステージ 13、15 と発生が進行しても、*CXCR4* mRNA はこの発現パターンを保持していた。全てのステージに共通して、体節後端部に特徴的なシグナルが見られた (図 5B, 5C; 矢頭は図 5A-C にかけて同一体節レベルを示す)。一方、*SDF1* mRNA は発生の進行と共に、表皮外胚葉での発現が胚後方へと後退していくことが観察された (図 5D-F; 赤矢頭は同一体節レベル、白矢頭は *SDF1* の表皮外胚葉での発現境界を示す)。また *CXCR4* mRNA と同様に、体節後端部で強いシグナルが見られた。

## (2) 切片でみる遺伝子発現パターン

次に、それぞれの発現部位を詳細に調べるために、切片を用いて *in situ* hybridization を行った。まずニワトリ 2 日目胚の PSM 領域においては、*SDF1* mRNA は PSM を覆う表皮外胚葉で強い発現を示し (図 6A; 矢印, 6I)、*CXCR4* mRNA は PSM 全体に発現が見られた (図 6E, 6I)。分節後すぐの体節においては、*SDF1* mRNA の表皮外胚葉での発現は消失し、代わりに形成中の背側大動脈に近接する体節

の腹側領域で発現をし始めた (図 6B; 矢印, 6J)。体節以外では、臓側中胚葉にもシグナルが認められた。この時期、*CXCR4 mRNA* は、体節の背側領域に発現していた (図 6F; 矢印, 6J)。体節以外の組織では、神経管、中腎管、また内胚葉の一部に発現が認められた。これらの *SDF1* および *CXCR4* の遺伝子発現パターンは、胎生 9.5 日のマウス胚でも維持されていた (図 6L, 6M) (図 6L, 6M は理研 CDB の河西利治さんより提供)。発生が進み、体節が皮筋節と硬節に分化した段階では、*SDF1 mRNA* は体節の腹側に位置する背側大動脈とその周辺で強い発現が見られ、背側へ向かって濃度勾配を作っているように見えた (図 6C, 6D, 6K)。発生後期 (5 日目胚) では、*SDF1 mRNA* は組織中に広く発現するが、特に形成中の体節間血管周辺で強いシグナルが認められた (図 10E; 矢印)。一方 *CXCR4 mRNA* は、3 日目胚以降では発現が非常に弱くなるが、皮筋節や硬節の細胞中にシグナルが認められた (図 6G; 矢印, 6H; 矢印, 6K)。

血管内皮細胞に注目した遺伝子発現解析については、後述の第二部「血管サブタイプを規定するケモカイン *SDF1/CXCR4* の役割」で詳細に述べる (図 14)。

### **CXCR4 を強制発現された体節細胞の挙動**

*SDF1/CXCR4* を介したシグナルは、様々な細胞種において細胞移動を惹起させることが知られているが、体節中胚葉での役割は何なのだろうか？ そこで、*in ovo* エレクトロポレーション法を用いて体節細胞に *CXCR4* を強制発現させ、共導入した GFP または DsRedExpress の蛍光を指標としてこれらの細胞挙動を追跡した。体節細胞への遺伝子導入は、ステージ 8 (1 日目胚、約 3-6 体節) の予定体節中胚葉領域をターゲットに行い、それぞれの実験に適した段階まで発生を進め解析に用いた (Ohata and Takahashi, 2009)。本稿では、まず PSM を含む初期体節中胚葉内での *CXCR4* 強制発現細胞の挙動を述べた後 (図 7)、より発生段階の進んだ体節内における細胞挙動を述べ (図 8)、以降は後者に注目し

た解析を進めた。

#### (1) PSM を含む初期体節内での CXCR4 強制発現細胞の挙動

まず、pCAGGS ベクター（恒常発現用）に組み込んだ発現プラスミドを用いて遺伝子導入を行った。コントロールとして pCAGGS-EGFP ベクターを発現させた場合、遺伝子導入細胞はエレクトロポレーション後 24 時間で、PSM 内に一様に散在していた（図 7A；縦断切片，n=5，7C；横断切片，n=25，7F）。エレクトロポレーション法における組織への遺伝子導入効率は、50-70%のモザイク状である（Nakaya et al., 2004; Sato et al., 2002）。一方で、pCAGGS-EGFP ベクターと pCAGGS-CXCR4 ベクターとを共発現させた場合、CXCR4 発現細胞は体節中胚葉の背側領域に集積した（図 7B；縦断切片，n=5，7D；横断切片，矢印，n=23，7G）。発生初期では *SDF1 mRNA* は体節中胚葉と PSM を覆う表皮外胚葉に強く発現していたことから（図 6A）、表皮から分泌される SDF1 の誘因作用によって、CXCR4 発現細胞は体節背側に集積したと考えられた（SDF1 の誘因作用に関しては図 11D, 11F で検証する）。次に、PSM 細胞において CXCR4 の機能を阻害させるために、CXCR4 に対する RNAi を二種類作成した（pSingle CXCR4-shRNA-#1-EGFP および shRNA-#2）。RNAi の効果は、ニワトリ繊維芽細胞由来の DF-1 培養細胞を用いて、作成した shRNA コンストラクトを pCAGGS-CXCR4 と共にトランスフェクションし、*CXCR4 mRNA* または CXCR4 タンパク質（HA-tag を指標とする）の存在を northern blotting（図 7J；n=3）および western blotting（図 7K；n=3，当研究室の齋藤大介助教より提供）で検証した。これらの shRNA コンストラクトをエレクトロポレーションによって体節細胞で発現させると、導入細胞の大部分が細胞死を起こして消失してしまったため、アポトーシスを阻害する pCAGGS-p35 と共に導入することにした。すると CXCR4 ノックダウン細胞は、CXCR4 強制発現細胞の挙動とは逆に、体節の腹側領域に集積した（図 7E；矢印，n=25，7H）。以上のような遺伝子導入細胞の PSM 内での背腹領域で異なる局在パター

ンは、定量的データにも表れている (図 7I)。これらの結果から、SDF1/CXCR4 を介したシグナルが初期体節中胚葉の細胞と表皮外胚葉との間に何らかの新規の相互作用を生み出している可能性が示唆された。

## (2) 分節後の体節内での CXCR4 強制発現細胞の挙動

pCAGGS-CXCR4 と pCAGGS-EGFP を共発現させた胚を、エレクトロポレーション後 60 時間 (2.5 日目胚) で観察すると、CXCR4 強制発現細胞は大部分が体節の背側に集積したままであったが、いくつかの細胞は体節腹側に位置する背側大動脈に向かって体節内で列を作るように並んでおり (図 8A; 矢印、n=20)、その後背側大動脈の周辺に局在した (Data not shown, 図 12C を参照)。背側大動脈に向かう CXCR4 発現細胞をより詳細にかつ効率よく解析したかったため、発生初期で背側に集積する現象を回避させることを考え、時期特異的に CXCR4 を発現させる Tet-on system を用いることにした。Tet-on system とは、Tetracycline のアナログである Doxycycline (以下 Dox と略す) の投与依存的に目的遺伝子の発現を開始することのできる発現システムであり、当研究室の渡邊忠由博士によってニワトリ胚で用いる最適条件が整えられた (Watanabe et al., 2007)。初期体節内の CXCR4 発現細胞と SDF1 陽性の表皮外胚葉との相互作用を避けるために、従来通りにステージ 8 の予定体節細胞にエレクトロポレーションによって遺伝子導入を行った後、16 時間たってから卵黄内に Dox をインジェクションし、CXCR4 の発現を誘導した (図 8B)。エレクトロポレーションに用いたプラスミドは、pTRE-CXCR4-EGFP (TRE: tet-responsible element、bidirectional プロモーターを持ち CXCR4 と同時に EGFP の発現も誘導する)、pCAGGS-rtTA2s-M2 (rtTA2s-M2: Dox 存在下で TRE 配列に結合する転写活性化因子)、pCAGGS-DsRedExpress の 3 種である。コントロールとして pTRE-CXCR4-EGFP の代わりに pTRE-EGFP を他の 2 種のプラスミドと共に発現させ Dox を添加した場合 (つまり CXCR4 は導入されない)、EGFP を発現する細胞は体節内に一様に

存在していた (図 8C; n=17, 8F; n=13, 8M)。同様に、pTRE-CXCR4-EGFP と他の 2 種のプラスミドを導入したが Dox を添加しなかった胚においても (つまり CXCR4 と EGFP の発現は誘導されない)、遺伝子導入細胞はランダムな局在パターンを示した (図 8D; n=15, 8G; n=15)。これらに対して、Dox 依存的に CXCR4 の発現を誘導した場合には、大部分の CXCR4 発現細胞は、2.5 日目胚では背側大動脈に向かって移動する様相を示し (図 8E; n=20, 8M)、その後 3.5 日目胚では大動脈周辺に集積した (図 8H; 矢印、n=15, 8M)。定量的な解析からも、CXCR4 強制発現細胞はコントロールと比較して、体節の中央部を通過して背側大動脈を目指し (図 8I)、大動脈の周囲 100  $\mu\text{m}$  の領域内に積極的に集積することが示された (図 8J)。このような細胞挙動は、佐藤らが報告した背側大動脈形成に携わる Notch シグナル依存的な体節細胞の挙動に酷似していた (Sato et al., 2008)。

それでは、CXCR4 発現細胞は、Notch 活性化細胞と同様に、背側大動脈によって誘引されているのだろうか？ この疑問を検証するために、CXCR4 を強制発現させた体節内に異所的に背側大動脈を移植し、CXCR4 発現細胞の挙動を解析した。その結果、CXCR4 発現細胞は異所的な大動脈周辺にも観察された (図 8K, 8L; 移植された大動脈をアスタリスクで示す、n=3)。背側大動脈は非常に強く *SDF1 mRNA* を発現していたことから (図 6C, 6D)、CXCR4 発現細胞は背側大動脈から分泌される SDF1 によって誘引されている可能性が高い。この可能性を検証するために、同様に CXCR4 を強制発現させた体節内に SDF1 をトランスフェクションした DF-1 細胞塊を移植したところ、SDF1 分泌細胞塊の周辺に CXCR4 強制発現細胞が集積することが観察された (図 11D, 11F; n=10)。以上の結果から、CXCR4 を発現する体節細胞は背側大動脈から分泌される SDF1 の誘因作用によって、背側大動脈へ移動することが示された。

SDF1/CXCR4 を介したケモカインシグナルの下流で、体節細胞の細胞移動を制御しているものは何だろうか？ これまでに、白血球細胞に由来する Jurkat

細胞などを用いた *in vitro* の知見から、SDF1/CXCR4 は Rho ファミリーGTPase の一つである Rac1 を活性化させることで、細胞骨格を変化させ、細胞移動を促すことが報告されている (Williams et al., 2008b)。本研究でも、ドミナントネガティブ型の Rac1 を CXCR4 と共に体節細胞にエレクトロポレーションすると、上述の CXCR4 発現細胞の特徴、つまり発生初期に背側に集積し、その後背側大動脈に向かって移動するという細胞挙動が阻害されることがわかった (図 9D; n=7)。これらの細胞は、発生初期から体節の腹側領域に蓄積しており、CXCR4 に対する RNAi を用いて CXCR4 をノックダウンさせた細胞挙動と非常に似ていた (図 7E)。一方で、コントロールとして CXCR4 と共に pTRE-EGFP (図 9A; n=5)、またはドミナントネガティブ型 RhoA (pTRE-DN-RhoA-EGFP) (図 9B; n=7)、または Cdc42 を阻害する pTRE-N-WASP-CRIB-EGFP を共発現させた場合 (図 9C; n=7) では、CXCR4 発現細胞の挙動は影響されなかった。以上の結果から、SDF1/CXCR4 が制御する体節細胞の移動は、少なくとも Rac1 を介していることが示唆された。

さらに、体節内を移動中の CXCR4 陽性細胞の形態をより詳細に観察するために、*in vitro* での組織スライス培養を用いたタイムラプス観察を行った。コントロールとして pTRE-EGFP を発現する体節細胞は、図 9E に示すように、丸い形をしており、糸状仮足 (filopodia) もほとんど伸ばしていなかった (図 9E; n=4, 9H) (movie 1)。これに対して、CXCR4 発現細胞はコントロール細胞とは大きく異なり、非常に長い糸状仮足を多数伸ばしており、いくつかの糸状仮足はさらに枝分かれしたりしていた (図 9F; n=4、2 つの別々の細胞 (#1 と #2) を示す、9H) (movie 2)。このような細胞形態は、活発に移動している細胞でよく見られる特徴的なものである。

**CXCR4 を強制発現された体節細胞は決して血管内皮細胞にはならない**

上述の体節内での CXCR4 発現細胞の移動現象は、背側大動脈形成に参画する Notch 活性化細胞の挙動に非常によく似ていた (Sato et al., 2008)。そこで、背側大動脈の血管内皮細胞に分化する Notch 活性化細胞は、その下流で SDF1/CXCR4 シグナルを活性化させることによって背側大動脈へと移動しているのではないかという可能性が考えられた。この可能性を検証するために、CXCR4 を強制発現された体節細胞が背側大動脈周辺に集積した後、Notch 活性化細胞 (Notch  $\Delta E$  を強制発現された細胞) と同様に、大動脈の血管内皮細胞に分化するのかを調べた (図 10A; n=12, 10C)。血管内皮細胞特異的な接着因子である *VE-cadherin mRNA*、またはウズラ胚の血管内皮細胞特異的な抗体である QH-1 (ウズラ胚を用いた実験系の場合) のシグナルを指標としたところ、pTRE-CXCR4-EGFP を導入した細胞からはこれらの血管内皮細胞マーカーは検出されず、背側大動脈のごく近接した位置に存在してはいるものの、大動脈の血管内皮細胞になっているものはなかった (図 10B; n=12, 10C)。

CXCR4 発現細胞が血管内皮細胞に分化していないのは、発生の遅延が原因であることも考えられたので、より発生の後期まで CXCR4 発現細胞を追跡することにした。この目的のためには、従来のエレクトロポレーション法による一過的な遺伝子導入では、3.5 日目胚以降は導入プラスミドの発現が衰弱してしまうため、より長期間、安定的に遺伝子発現をし続けることのできる方法に変更する必要があった。そこで、当研究室で最近開発された、トランスポゾンを用いた長期遺伝子発現法 (To12-トランスポゾン法) を用いた (Sato et al., 2007)。この方法は、pT2K ベクター内のトランスポゾン認識配列 (To12 配列) に挟まれた目的遺伝子がトランスポゾンの働きによってベクターから切り出され、ゲノム中に組み込まれることによって、長期間の安定的な発現を可能にしたシステムである (図 10D)。そこで、3.5 日目以降の胚で CXCR4 発現細胞の挙動を調べるために、エレクトロポレーションによって以下の 4 種のプラスミドをステージ 8 の予定体節細胞に導入した。pCAGGS-T2TP (T2TP: To12 トランスポゾン)、



pT2K-CAGGS-rtTA2s-M2 (rtTA2s-M2: Dox 存在下で TRE 配列に結合する転写活性化因子)、pT2K-BI-TRE-CXCR4-EGFP (BI-TRE: tet-responsible element、bidirectional プロモーターを持ち CXCR4 と同時に EGFP の発現も誘導する)、そして pCAGGS-DsRedExpress である (図 10D)。

これら 4 種のプラスミドを導入し、エレクトロポレーション後 16 時間で Dox を添加して CXCR4 の発現を誘導し、その後 3.5 日間インキュベートして 5 日目胚で観察したところ、EGFP 陽性の CXCR4 強制発現細胞は、背側大動脈周辺から集積場所を変化させ、大動脈から伸長する体節間血管の周囲を取り巻いていた (図 10F, 10G; n=15)。このような CXCR4 発現細胞の局在パターンは、この時期に *SDF1 mRNA* が体節間血管で強く発現することと一致する (図 10E)。このとき、CXCR4 発現細胞の一部は体節間血管を取り巻く血管支持細胞 (smooth muscle actin マーカー陽性の平滑筋細胞) になっていることが認められたが、血管内皮細胞になっているものは観察されなかった (図 10G)。さらに発生を進めた 7 日目胚でも同様に、CXCR4 陽性の血管内皮細胞は検出されなかった (図 10H; n=7, 10I; n=7)。以上の結果から、CXCR4 を発現する体節細胞は、Notch 活性化細胞と同様に背側大動脈へ向かって移動するものの、Notch 活性化細胞の大部分が血管内皮細胞へ分化するのとは異なり、CXCR4 強制発現細胞は血管内皮細胞には分化しないということが明らかとなった。

#### Notch と CXCR4 の両シグナル間には積極的なクロストークはみられない

では、背側大動脈へ向かって移動する体節細胞内では、Notch シグナルと SDF1/CXCR4 シグナル間でのクロストークはないのだろうか？ そこでまず、Notch シグナルを活性化された体節細胞 (pTRE-Notch  $\Delta$  E-EGFP、pCAGGS-rtTA2s-M2 をエレクトロポレーションし、16 時間後に Dox を添加) で CXCR4 の発現が誘導されるかどうかを、*in situ hybridization* 法を用いて検証した。

しかし、体節内を移動中の Notch 活性化細胞からは、*CXCR4 mRNA* は検出されなかった (図 11A; 矢印、*CXCR4 mRNA* の赤色シグナルと EGFP 陽性の Notch 活性化細胞とは重ならない、n=5)。これとは逆に、*CXCR4* 強制発現細胞において Notch シグナルが活性化されているかを、Notch 活性レポーターである pTP1-Venus コンストラクトを pTRE-*CXCR4*-DsRedExpress と共導入して検証した。このレポーターは RBPj 結合サイトの下流に *venus* をつないだコンストラクトであり、RBPj を介した Notch シグナルを可視化することができる (Kohyama et al., 2005; Sato et al., 2008)。ポジティブコントロールとして、pTRE-Notch  $\Delta E$ -DsRedExpress と共に pTP1-Venus をエレクトロポレーションすると、Notch  $\Delta E$  強制発現細胞で *venus* のシグナルが観察された (図 11B; 矢印、DsRedExpress 陽性の Notch 活性化細胞と *venus* のシグナルが重なっている、n=5)。ところが、pTRE-*CXCR4*-DsRedExpress と共に pTP1-Venus を導入しても、*CXCR4* 強制発現細胞で *venus* のシグナルは検出されなかったことから、*CXCR4* シグナルの下流で RBPj を介する Notch シグナルが活性化されるわけではないことがわかった (図 11C、n=5)。

組織スライス培養を用いたタイムラプス観察を行って、Notch  $\Delta E$  を強制発現させた体節細胞を詳細に観察すると、コントロールと比べて多数の糸状仮足を伸ばしていたものの、*CXCR4* 発現細胞と比べて糸状仮足の長さは短く、分岐数も少なかった (図 9G; n=4, 9H) (movie 3)。さらに、Notch  $\Delta E$  発現細胞は、体節内に移植した SDF1 分泌細胞塊からの誘因作用にまったく影響を受けなかった (図 11E, 11G; n=7)。

これらの実験結果に加えて、背側大動脈への体節細胞の移動では Notch シグナルと SDF1/*CXCR4* シグナルは独立して働いていることを検証するために、Notch 活性化細胞において *CXCR4* に対する shRNA を作用させ、細胞移動への影響を調べた。まず、pTRE-*CXCR4*-DsRedExpress、pCAGGS-rtTA2s-M2、pSingle-tTS-*CXCR4*-shRNA-#1-EGFP (Dox 依存的に shRNA を発現させるプラスミド) を体節細

胞にエレクトロポレーションし、16 時間後に Dox を添加して CXCR4 と CXCR4-shRNA-#1 の発現を誘導したところ、24 時間後の 2.5 日目胚において、CXCR4 を介した移動現象は阻害されていた (図 11H; n=5, 11I; n=7)。一方で pTRE-Notch  $\Delta E$ -DsRedExpress と共に pSingle-tTS-CXCR4-shRNA-#1-EGFP を導入しても、Notch  $\Delta E$  を単独で導入した場合と変わらず、背側大動脈に向かう細胞移動が起きていた (図 11j; n=10, 11K; n=10)。CXCR4-shRNA-#2 を用いたときも、上記と同様の結果であった (Data not shown)。これらの結果から、CXCR4 を介したシグナルは Notch シグナルによって制御される細胞移動には関与しないことが示された。

以上の結果から、CXCR4 および活性型 Notch の強制発現によって見られた体節細胞の背側大動脈への移動は、それぞれ異なったメカニズムによって引き起こされており、両者のシグナル間にクロストークはないと結論づけた。

### **CXCR4 によって背側大動脈周辺に運ばれた体節細胞は、Notch 活性を付与されると血管内皮細胞へと転換する**

背側大動脈形成に携わる体節細胞は、Notch シグナルの活性化によって大動脈へとダイナミックに移動し、その後大動脈の血管内皮へと分化することが佐藤らによって報告された (Sato et al., 2008)。しかしながら、Notch シグナルによる「細胞移動」と「細胞分化」がどのようにリンクしているのかは、まだ明らかになっていない。そこで、体節細胞から血管内皮細胞への転換に、Notch シグナルによる細胞移動が必須であるか検証した。これまでの本研究の結果 (上記) から、SDF1/CXCR4 を介したケモカインシグナルは Notch シグナルとは独立して働き、体節細胞を背側大動脈周辺へと積極的に集積させる能力を持つこと、しかしそれらの細胞は血管内皮細胞には決して分化しないことを明らかにしてきた。CXCR4 発現細胞のこのような性質を活用して、Notch 活性化細胞の挙動

を「細胞移動」と「血管内皮への分化」という 2 ステップに分離することを試みた。つまり、CXCR4 の働きによって体節細胞を背側大動脈まで運んだ後、それらの細胞で Tet-on system を用いて時期特異的に Notch シグナルを活性化させ、血管内皮細胞に分化するかを評価する実験系を組み立てた (図 12)。

この実験を始めるにあたり、Dox を添加してから pTRE-Notch  $\Delta$ E-DsRedExpress の発現が誘導されるまでにどれくらいの時間がかかるのかを知る必要があった。そこで、体節細胞に 3 種のプラスミド、pTRE-Notch  $\Delta$ E-6xmyc-DsRedExpress、pCAGGS-rtTA2s-M2、pCAGGS-EGFP をエレクトロポレーションによって導入し、Dox 添加後の DsRedExpress と Notch  $\Delta$ E (myc-tag を指標とする) の発現を時間を追って観察した (図 12A)。Dox 添加前では pCAGGS-EGFP しか観察されないが、Dox 添加後 3 時間で DsRedExpress と myc の両方の発現が見られ、添加後 24 時間では両方とも十分に発現していることがわかった (図 12A; 矢印)。

この結果をふまえて、次の実験を行った。体節細胞に 3 種のプラスミド、pCMS-CXCR4-EGFP (pCMS ベクターは CMV プロモーターと SV40 プロモーターを持ち、それぞれ CXCR4 と EGFP が発現される)、pTRE-Notch  $\Delta$ E-DsRedExpress、pCAGGS-rtTA2s-M2 をエレクトロポレーションで導入し、48 時間後 (3 日目胚) に Dox を添加して Notch  $\Delta$ E の発現を誘導、さらに 24 時間後 (4 日目胚) で胚を固定し解析した (図 12B; 模式図)。つまり CXCR4 単独の働きによって体節細胞を背側大動脈周辺に集積させた後、Notch 活性を付与するという実験系である。コントロールとして、pTRE-Notch  $\Delta$ E-DsRedExpress の代わりに pTRE-DsRedExpress を用いると、4 日目胚において、遺伝子導入細胞はこれまで見てきた CXCR4 強制発現細胞の挙動と同様に、背側大動脈の周囲を取り巻く局在を示し、血管内皮細胞に分化しているものは見られなかった (図 12C, 12F; n=12, 12I)。ところがこれに対して、CXCR4 発現細胞で pTRE-Notch  $\Delta$ E-DsRedExpress の発現を誘導すると、これらの細胞は非常に効率よく背側大動脈の内皮細胞へと転換した (図 12D, 12G; n=12, 12I)。これらの結果から、Notch シグナルは、

CXCR4 によって背側大動脈付近へと運ばれたナイーブな間充織細胞を血管内皮細胞へと分化させる能力を持つことが示された。そして、このような血管形成に関わる体節細胞の移動過程には Notch は必要なく、血管付近に存在する細胞において Notch シグナルが活性化されることが、血管内皮細胞への分化を促す最も決定的なポイントであることが示唆された。

佐藤らは、Notch シグナルによって制御される体節由来の血管芽細胞の移動は、体節の後半領域に限局されることを報告した(Sato et al., 2008)。しかし、体節後半領域の細胞のみが血管形成に関わるのかについては、まだ明らかになっていなかった。本研究では、CXCR4 によって背側大動脈へ運ばれた体節前半領域に由来する細胞でも、Notch 活性の付与によって血管内皮細胞に転換することができることを示した(図 12E, 12H; n=12、体節前半領域は後根神経節(d)を指標とした)。つまり、体節後半領域に限った細胞移動は、必ずしも体節由来の血管形成には必要ないことが示唆された。

#### より後期で見られる体節間血管においても、Notch シグナルはナイーブな体節細胞を血管内皮細胞へ転換させる能力を持つ

血管周辺のナイーブな間充織細胞を血管内皮細胞へと転換させる Notch シグナルの能力は、発生のより後期過程にもあてはまるのかを検証するために、To12-トランスポゾン法を用いた長期遺伝子発現システムを利用して、前項(図 12)と同様の実験を行った。エレクトロポレーション法によって、体節細胞に以下の4種のプラスミド、pT2K-CMS-CXCR4-EGFP、pT2K-CAGGS-rtTA2s-M2、pT2K-BI-TRE-Notch  $\Delta$ E-EGFP、pCAGGS-T2TP を導入した(図 13A; 模式図)。CXCR4 の働きによって体節細胞を体節間血管の周辺に集積させてから(図 10F を参照)、4.5 日目胚で Dox を添加して Notch  $\Delta$ E の発現を誘導し、さらに 24 時間後(5.5 日目胚)で胚を固定し解析した(図 13A)。前項と同様に、Notch  $\Delta$ E が誘導さ

れないと、CXCR4 強制発現細胞は体節間血管の周辺を取り巻いているだけであ  
ったが (図 13B, 13D; n=12, 13F、図 10F, 10G を参照)、Notch $\Delta E$  の発現が付  
与されると、これらの細胞は血管内皮として体節間血管に取り込まれた (図 13C,  
13E; n= 12, 13F)。これらの結果から、Notch シグナルは背側大動脈に限らず  
体節間血管においても、血管周辺に存在する体節由来のナイーブな細胞を血管  
内皮細胞へと転換させる能力を持つことが示された。

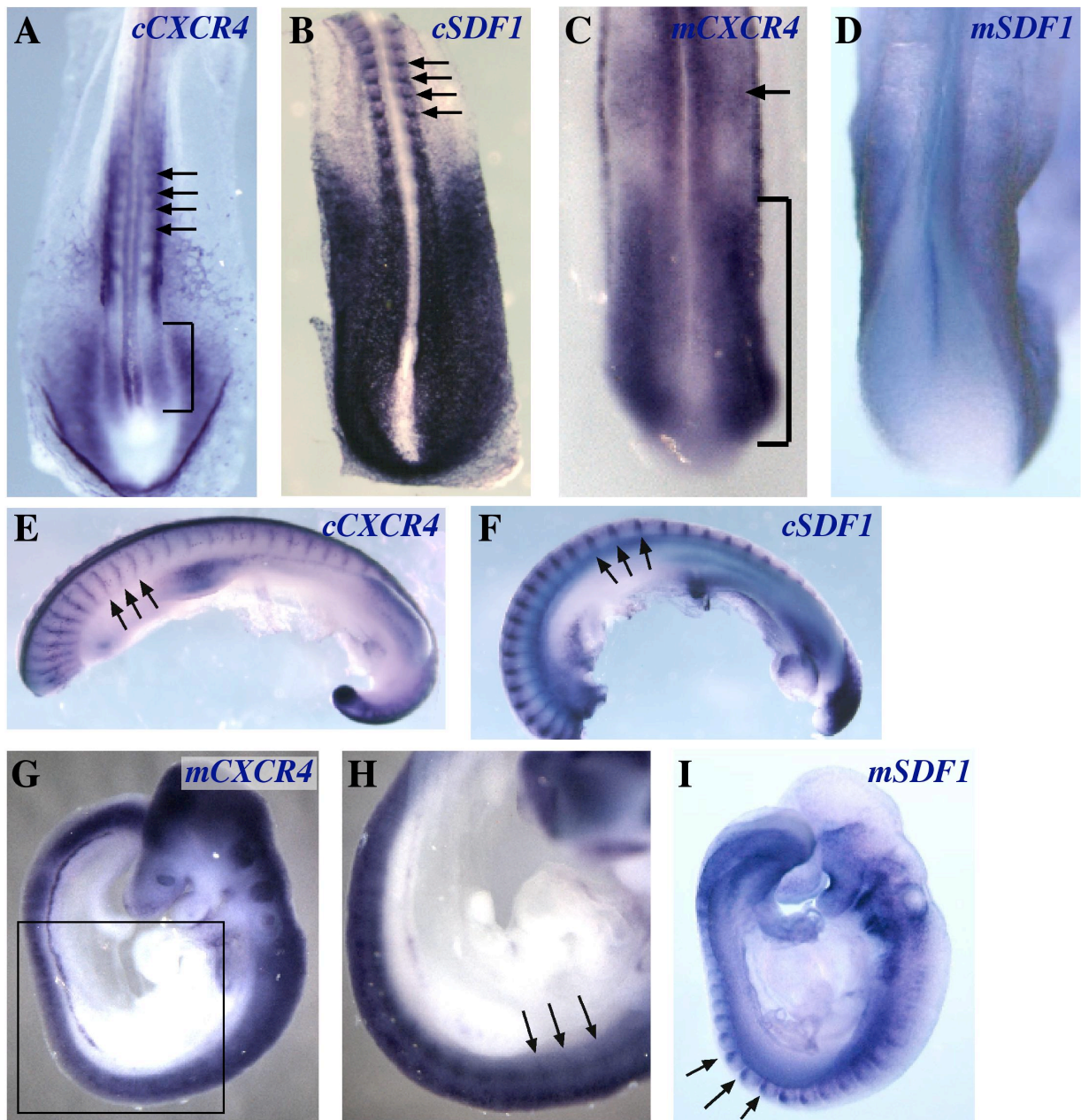


図4. ニワトリおよびマウス初期胚における CXCR4 と SDF1 の mRNA 発現パターン

(A, B) ステージ 13 (約 19 体節) のニワトリ胚における CXCR4 (A) と SDF1 (B) の mRNA 発現パターン。体節後端部にそれぞれ発現が見られる (矢印)。(C, D) 胎生 8.5 日目のマウス胚における CXCR4 (C) と SDF1 (D) の発現パターン。(E, F) ステージ 20 のニワトリ胚 (3 日目胚) では、CXCR4 と SDF1 はそれぞれ体節の後端部で発現する (矢印)。(G, H) 胎生 9.5 日目のマウス胚では、CXCR4 は体節後端部に弱く発現する (H; 矢印)。(H) は (G) の拡大図。(I) 胎生 9.5 日目のマウス胚での SDF1 は、体節後端部で明瞭な発現を示す (矢印)。

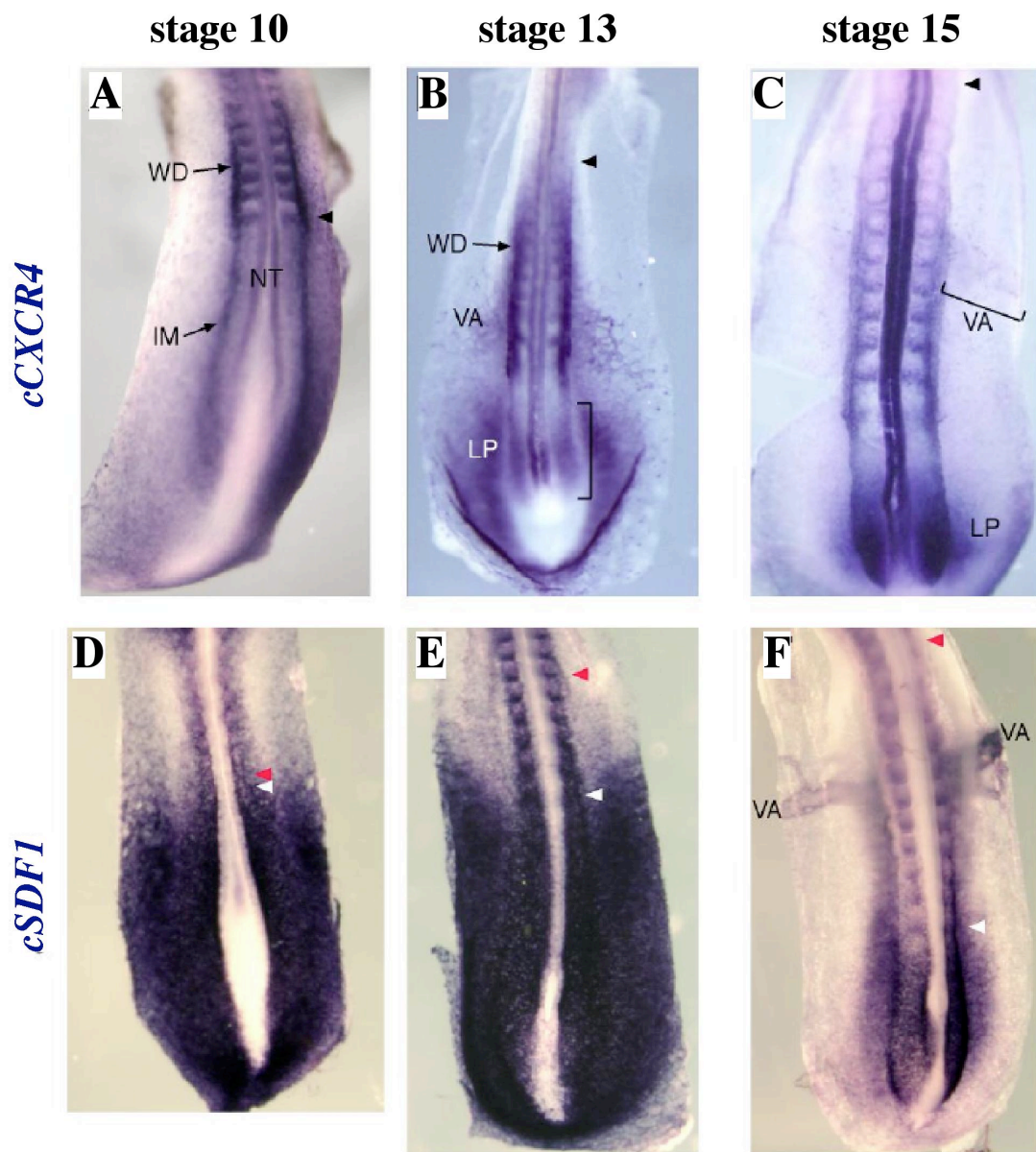


図 5. 体節形成期における遺伝子発現パターンの変化

ステージ 10-15 にかけて見られる CXCR4 (A-C) と SDF1 (D-F) の mRNA 発現パターン (背側から見たもの)。(A) ステージ 10 (約 10 体節): 発生の初期段階から、次の予定分節境界 (矢頭)、体節の後端部、神経管 (NT)、中腎管 (WD)、中間中胚葉 (IM) に発現が見られた。矢頭は A-C にかけて同一体節レベルを示す。(B) ステージ 13 (約 19 体節): A で見られた発現に加え、PSM 後方領域 (角型括弧)、側板中胚葉 (LP)、胚体外の血管網 (VA) にシグナルが見られた。(C) ステージ 15 (約 25 体節): B と比べて側板中胚葉の発現領域が狭くなっていた。胚体外の血管 (卵黄動脈, VA) にも弱いシグナルが認められた。ステージ 10-15 にかけて、CXCR4 の発現パターンはほぼ一致していた。(D) ステージ 10: 神経管の領域を除き、胚後方の表皮外胚葉に発現が見られた。赤矢頭は D-F にかけて同一体節レベルを示す。(E) ステージ 13: 分節化が進行するにつれて、SDF1 の発現境界は後退していた (白矢頭)。(F) ステージ 15: 表皮外胚葉での発現はステージ 13 での位置からさらに後退した (白矢頭)。各体節の後端部、卵黄動脈に発現が見られた。



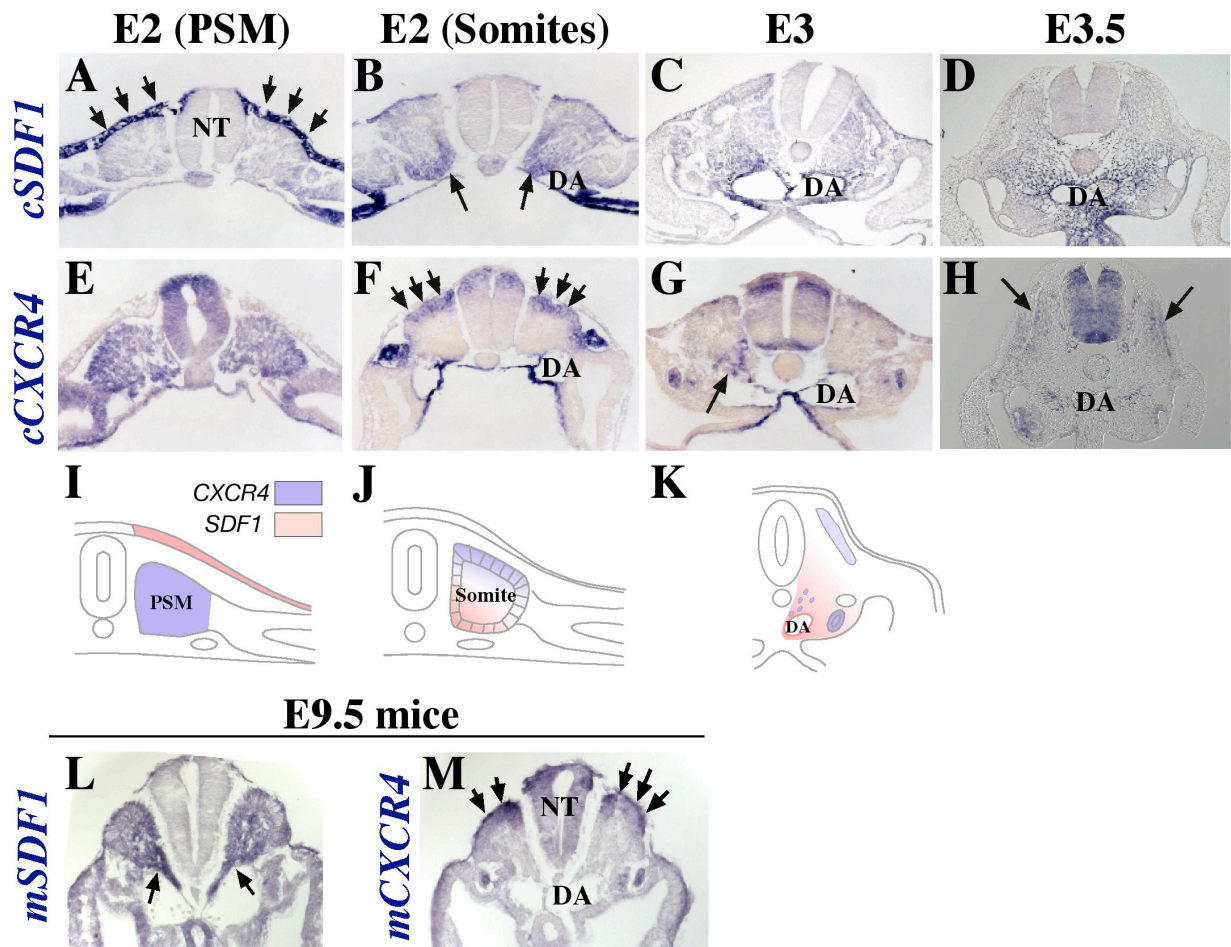


図 6. 切片で見る CXCR4 と SDF1 の遺伝子発現領域

(A-K) ニワトリ SDF1 (A-D)、および CXCR4 (E-H) の mRNA 発現パターン。SDF1 (赤) と CXCR4 (青) の mRNA 発現パターンの模式図を (I-K) に示す。(L-M) マウス 9.5 日目胚 (ニワトリ 2 日目胚に相当) の体節における SDF1 および CXCR4 の mRNA 発現パターン。詳細は本文に記す。PSM, 未分節体節中胚葉 (presomitic mesoderm); NT, 神経管 (neural tube); DA, 背側大動脈 (dorsal aorta); somite, 体節

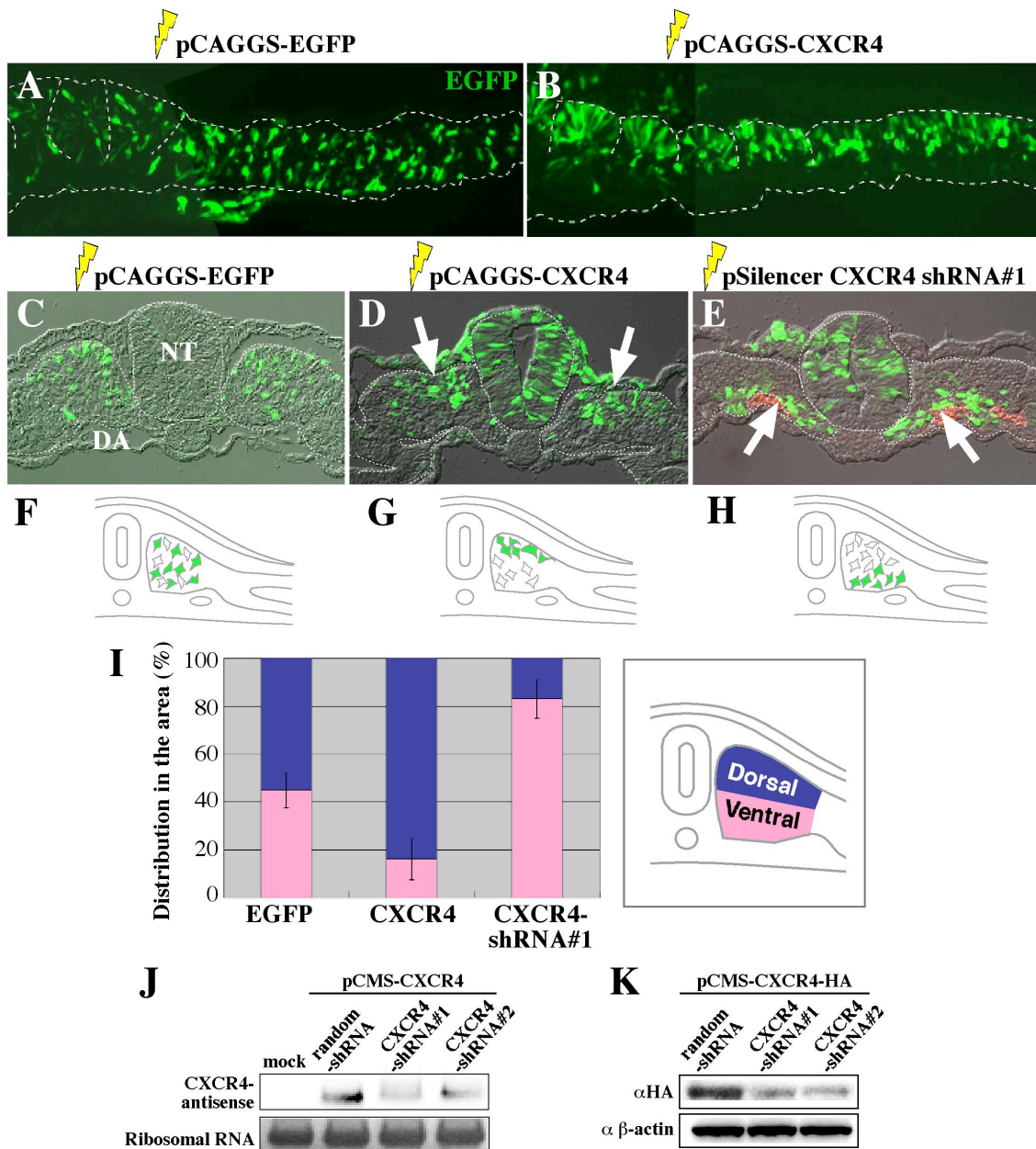
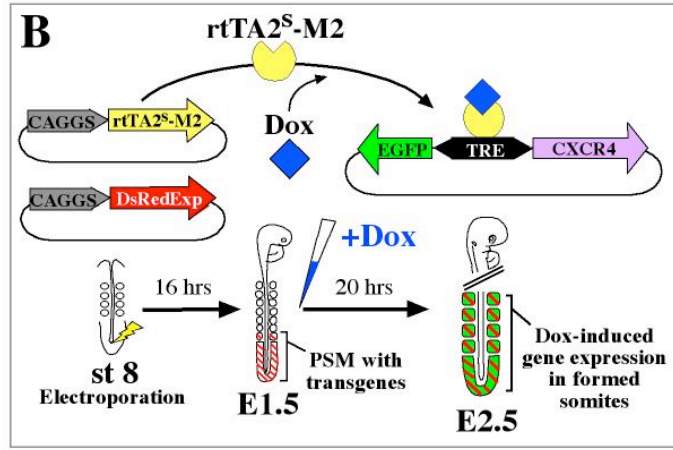
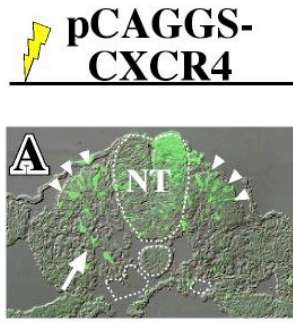


図 7. SDF1/CXCR4 シグナルは PSM 細胞を背側に集積させる

(A-H) PSM 細胞に CXCR4 を強制発現させると、それらの細胞は PSM の背側領域に集積した (B; 縦断切片, D; 横断切片, 矢印)。コントロールでは、このような特異的な局在パターンは見られない (A; 縦断切片, C; 横断切片)。一方、CXCR4 を RNAi でノックダウンすると、それらの細胞は PSM の腹側に集積した (E; 矢印)。(F-H) は (C-E) の結果を模式図で示す。(I) PSM の背側 (Dorsal) と腹側 (Ventral) 領域にそれぞれ局在していた遺伝子導入細胞数の割合。統計には、各条件の 5 個体からそれぞれ 3 切片を選出し用いた。(J, K) Northern blotting (J)、および Western blotting (K) によって、RNAi の効果を検定した。NT, 神経管 (neural tube); DA, 背側大動脈 (dorsal aorta)



☒ 8

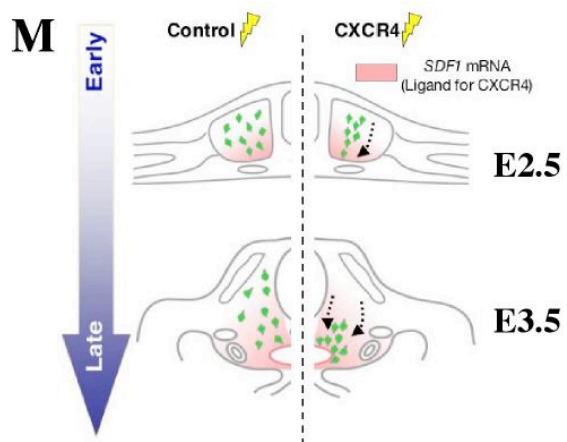
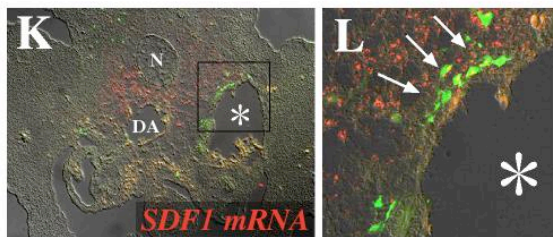
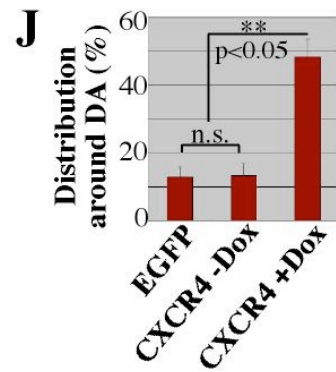
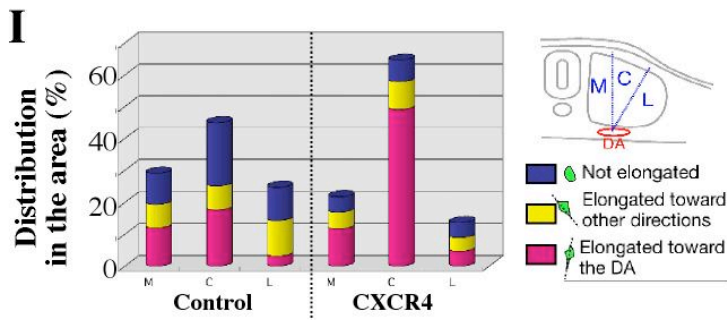
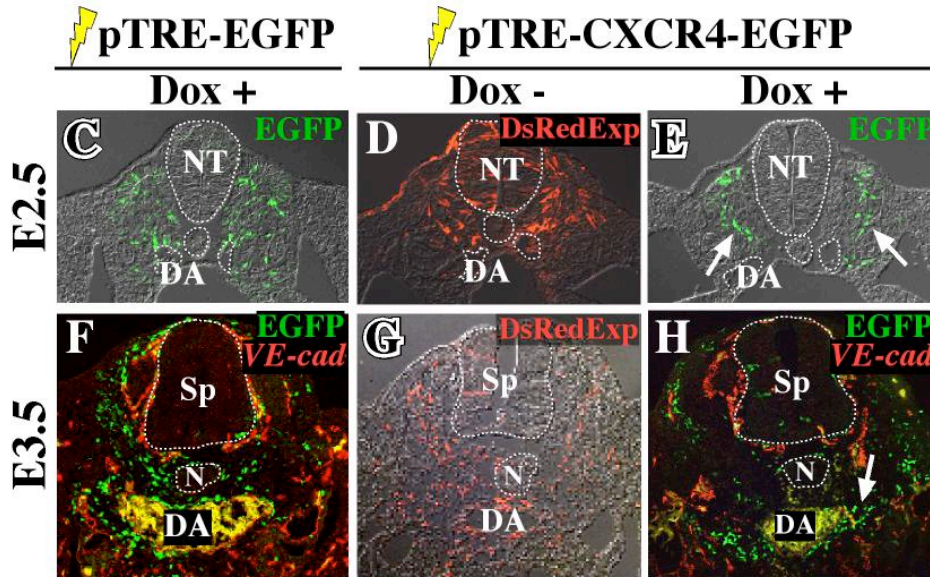


図 8. 体節における CXCR4 強制発現細胞の挙動

(A) エレクトロポレーション法を用いて pCAGGS-CXCR4 を強制発現させると、大部分は体節背側領域に集積したままだが (矢頭)、いくつかの細胞は背側大動脈へ向かって移動した (矢印)。(B) Doxycycline (Dox) 投与依存的な遺伝子発現法 (Tet-on system) の模式図。CXCR4/SDF1 の PSM での作用を回避するために、エレクトロポレーション後 16 時間で Dox を添加し、CXCR4 の発現を誘導した。(C-H) Tet-on によって時期特異的に CXCR4 を発現させると、それらの細胞は背側大動脈に向かって移動し (E; 矢印)、背側大動脈周辺に集積した (H; 矢印)。コントロールでは、遺伝子導入細胞は体節内にランダムに分布した (C, F; EGFP のみ発現) (D, G; Dox の投与をしていない)。F, H では VE-cadherin の遺伝子発現を赤で示す。(I) 2.5 日目胚で見られる遺伝子導入細胞の局在を、体節の 3 領域 (Medial, Central, Lateral) に分類した。さらには、個々の細胞の形を 3 タイプ (丸い、背側大動脈へ向かって紡錘型をとる、背側大動脈以外の方向へ向かって紡錘型をとる) に分類した。CXCR4 強制発現細胞は、体節の中央部に存在し、背側大動脈方向に伸びている傾向が強い。統計には、各条件の 5 個体からそれぞれ 3 切片を選出し用いた。(J) 3.5 日目胚で、背側大動脈の周囲 100  $\mu\text{m}$  以内の領域に存在する遺伝子導入細胞数の割合。CXCR4 強制発現細胞は、背側大動脈周辺に積極的に集積した。統計には、各条件の 4 個体からそれぞれ 3 切片を選出し用いた。(K, L) CXCR4 強制発現細胞は、異所的に移植した背側大動脈 (\*) の周辺にも集積することから、背側大動脈が誘引因子を生産している可能性が強く示唆された。(L) は (K) の拡大図。(M) CXCR4 を強制発現された体節細胞 (緑) の挙動を模式図にまとめた。NT, 神経管 (neural tube); DA, 背側大動脈 (dorsal aorta); Sp, 脊髄 (spinal cord); N, 脊索 (notochord)

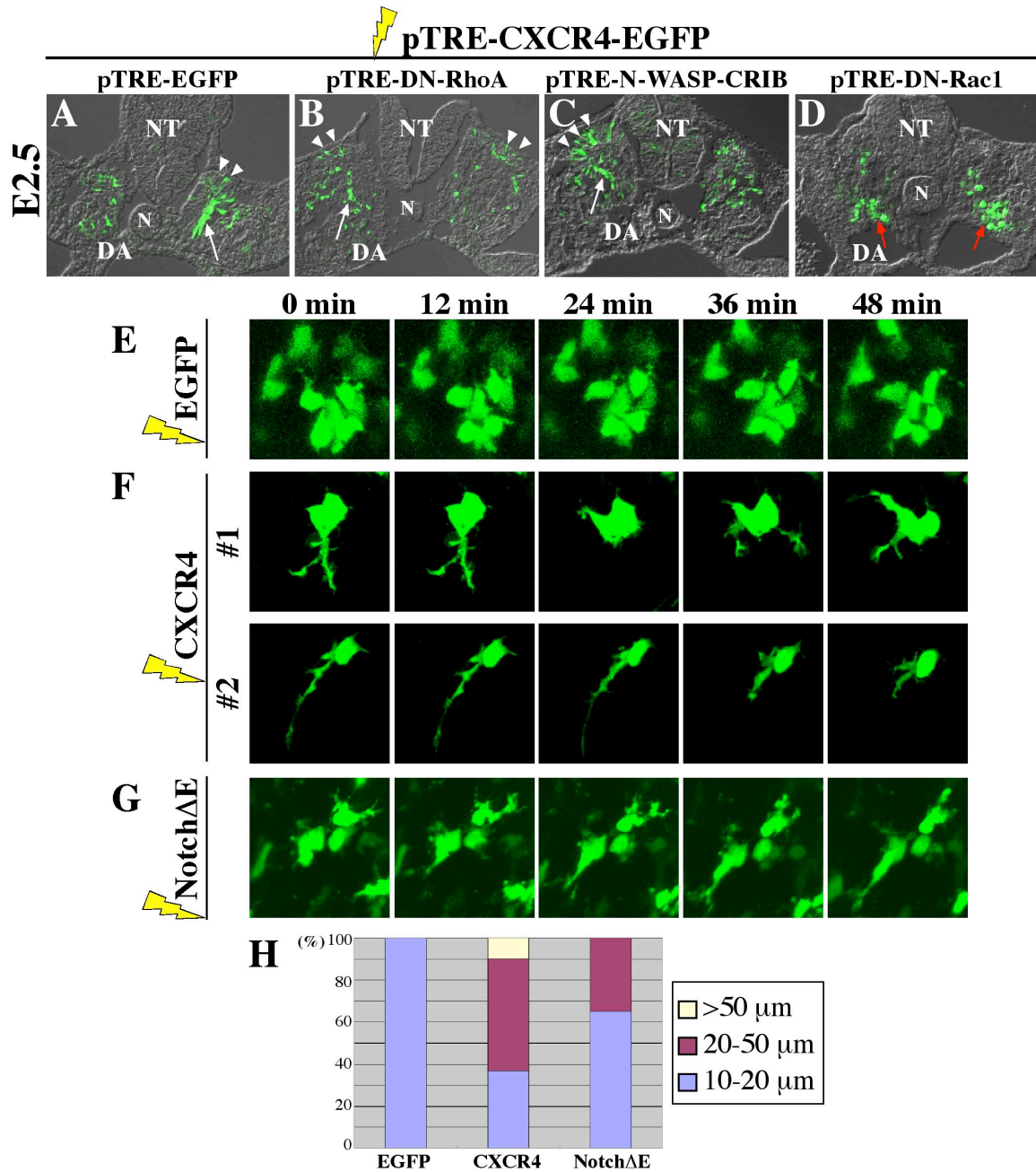


図9. CXCR4によって引き起こされる体節細胞の移動

(A-D) CXCR4 が制御する体節細胞の移動は、ドミナントネガティブ型 Rac1 を共発現させると阻害され、発生の非常に初期から体節腹側領域に集積した (D, 赤矢印) (図 6E と比較)。コントロール (A)、ドミナントネガティブ型 RhoA (B)、および N-WASP-CRIB (C) を共発現させても CXCR4 強制発現細胞の挙動に変化は見られず、CXCR4 を単独で発現させたときと同様に、背側大動脈への移動 (白矢印) と一部の細胞の体節背側領域への集積 (白矢頭) が見られた。(E-H) 組織スライス培養を用いた体節細胞のタイムラプス観察。撮影したムービーを 12 分ごとに抜粋し連ねた。(E) pTRE-EGFP 発現細胞 (Movie 1)。(F) pTRE-CXCR4-EGFP を発現させた 2 つの細胞 (#1 と #2) (Movie 2)。(G) pTRE-NotchΔE-EGFP 発現細胞 (Movie 3)。(H) それぞれの遺伝子導入細胞を糸状仮足の長さで分類した。各々 8 細胞から合計 40 本の糸状仮足を調べた。

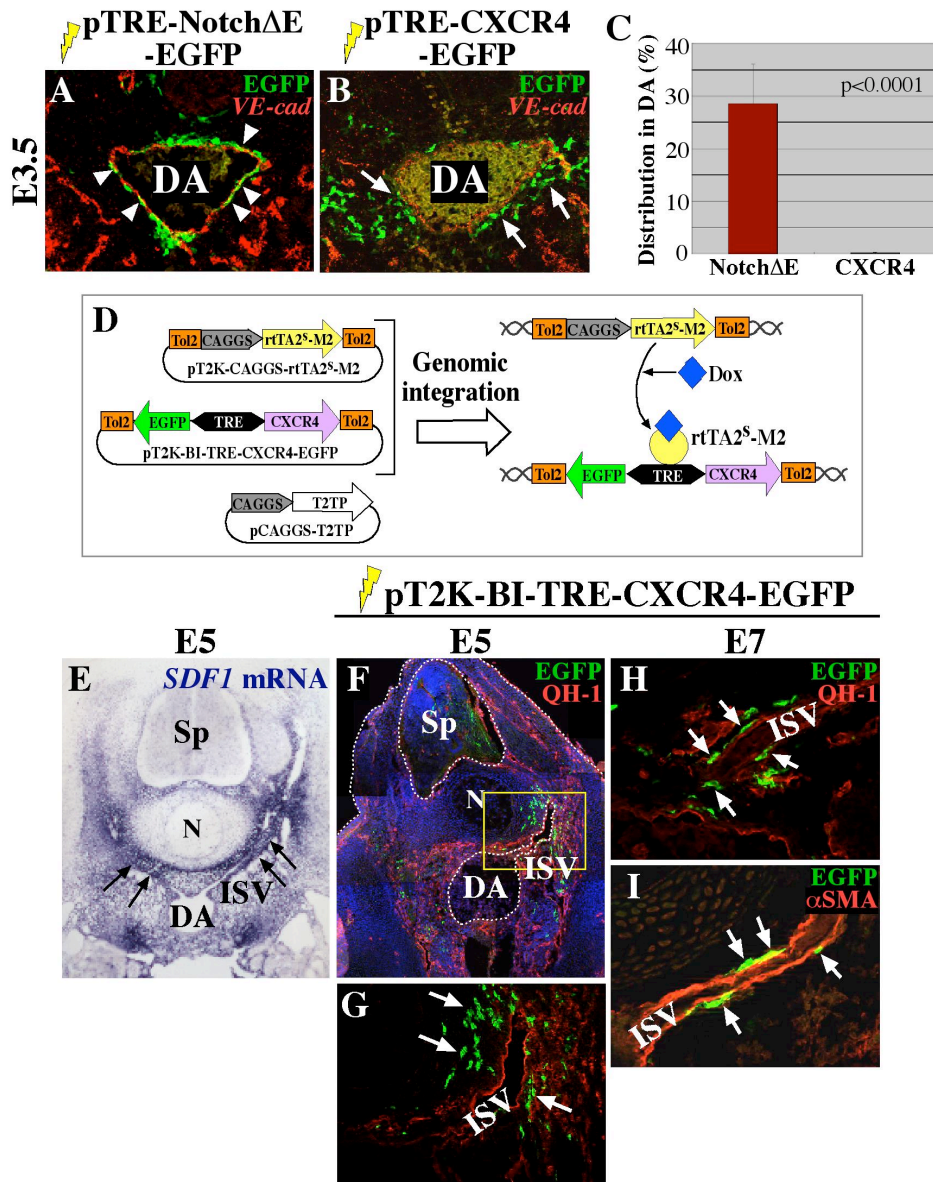


図 10. CXCR4 を強制発現された体節細胞は血管内皮には分化しない

(A, B) Notch 活性化細胞は、背側大動脈の血管内皮細胞に分化するが (A; 矢頭)、CXCR4 強制発現細胞は大動脈の周辺に集積したままであった (B; 矢印)。VE-cadherin 遺伝子発現を赤で示す。(C) 遺伝子導入された体節細胞が血管内皮になっている割合。数値は、VE-cadherin マーカーと重なる EGFP 陽性細胞数を、総エレクトロポレーション細胞数で割った。統計には、各条件の 4 個体からそれぞれ 3 切片を選出し用いた。(D) トランスポゾンを用いた安定的な遺伝子導入法 (To12- トランスポゾン法) の概要を示す。(E) 5 日目胚の *SDF1* 遺伝子は、体節間血管の周辺に強く発現する (矢印)。(F-I) 5 日目胚では、CXCR4 強制発現細胞は体節間血管の周辺に集積し、一部は体節間血管を取り巻く平滑筋細胞になっていたが、5 日目胚 (F, G) でも 7 日目胚 (H, I) でも血管内皮細胞になっているものはなかった。赤いシグナルで示すのは、ウズラの血管内皮細胞マーカー QH-1 (F, G, H)、または smooth muscle actin マーカー (I)。DA, 背側大動脈 (dorsal aorta); Sp, 脊髄 (spinal cord); N, 脊索 (notochord); ISV, 体節間血管 (intersomitic vessel)

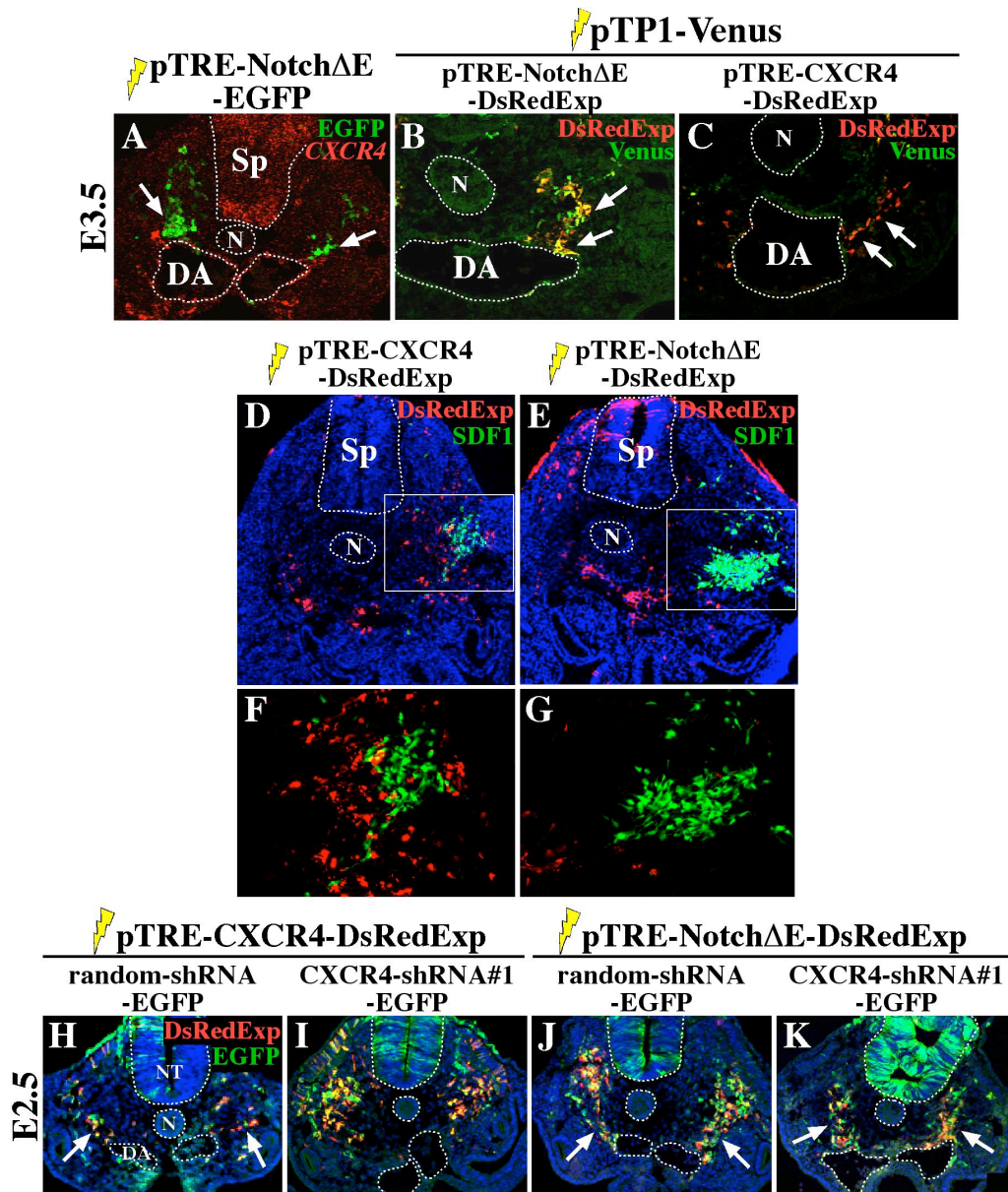


図 11. 移動中の体節細胞では、Notch と CXCR4 の間に積極的なシグナルクロストークは検出されない

(A) CXCR4 mRNA (赤) は、pTRE-Notch $\Delta$ E-EGFP 強制発現細胞 (緑; 矢印) からは検出されなかった。(B, C) Notch 活性レポーターである TP1-Venus (緑) は、pTRE-Notch $\Delta$ E-DsRedExpress 発現細胞では検出されるが (B; 矢印)、pTRE-CXCR4-DsRedExpress 発現細胞では見られなかった (C; 矢印)。(D-G) SDF1 を分泌する DF-1 細胞塊 (緑) を体節に移植した。CXCR4 強制発現細胞 (赤) は細胞塊周辺に集積するのに対し (D, F)、Notch 活性化細胞 (赤) は何の影響も受けていなかった (E, G)。(H-I) 体節細胞に CXCR4 と共にランダム shRNA (H)、または CXCR4-shRNA-#1 (I) を共導入した。CXCR4-shRNA-#1 は、CXCR4 が制御する移動現象を阻害した。(J, K) Notch 活性が制御する体節細胞の背側大動脈への移動は、ランダム shRNA (J; 矢印)、または CXCR4-shRNA-#1 (K; 矢印) のいずれの影響も受けなかった。DA, 背側大動脈 (dorsal aorta); Sp, 脊髄 (spinal cord); N, 脊索 (notochord); NT, 神経管 (neural tube)

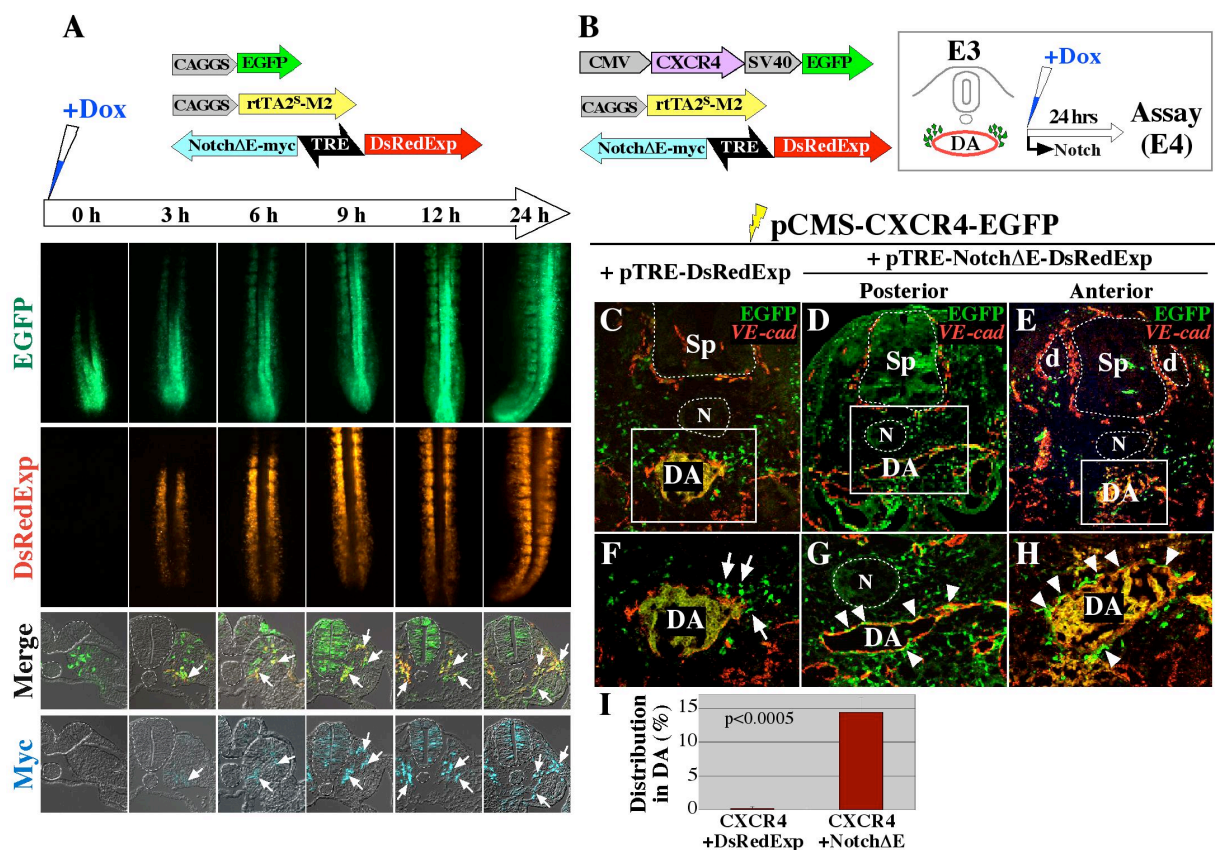


図 12. CXCR4 によって背側大動脈に集積した体節細胞は、Notch 活性を得ると血管内皮細胞に分化する

(A) Dox 添加後、どれくらいの時間で Notch の発現が開始するのかわかるために、模式図に示す 3 種類のプラスミドを体節にエレクトロポレーションした。Tet-on system によって制御される DsRedExpress および NotchΔE は、Dox 添加後 3 時間で発現が見られるようになり、24 時間後では十分な発現が得られた。Notch の発現は Myc-tag の発現で確認した。(B) 発現プラスミドのセットと実験手順を模式図で示す。まず CXCR4 のみの働きによって背側大動脈周辺に細胞を集積させ、3 日目胚の時点で Dox を添加し、それらの細胞で Notch を活性化させる。24 時間後 (4 日目胚)、それらの細胞が血管内皮細胞に分化しているかを VE-cadherin をマーカーとして評価する。(C-H) 4 日目胚の横断切片を示す。Notch 活性がないと、CXCR4 強制発現細胞 (緑) は血管内皮細胞にはならず、大動脈周辺に残存したままだった (C, F; 矢印; 図 6H, 図 8B と同様)。Notch 活性を与えると、大部分の CXCR4 陽性細胞は血管内皮細胞となった (D, G; 矢頭)。この写真は、体節後半領域を撮ったものである。後根神経節 (dorsal root ganglia; d) を指標とする体節前半領域に存在する CXCR4 陽性細胞でも、Notch 活性の付与によって、血管内皮細胞に分化した (E, H)。(F-H) はそれぞれ (C-E) の拡大図である。VE-cadherin 遺伝子発現を赤で示す。(I) 遺伝子導入細胞が背側大動脈の血管内皮細胞になっていた割合。EGFP 陽性かつ VE-cadherin マーカー陽性の細胞数を、総エレクトロポレーション細胞数で割った。統計には、各条件の 3 個体から 4 切片を選出して用いた。DA, 背側大動脈 (dorsal aorta); Sp, 脊髄 (spinal cord); N, 脊索 (notochord); d, 後根神経節 (dorsal root ganglia)



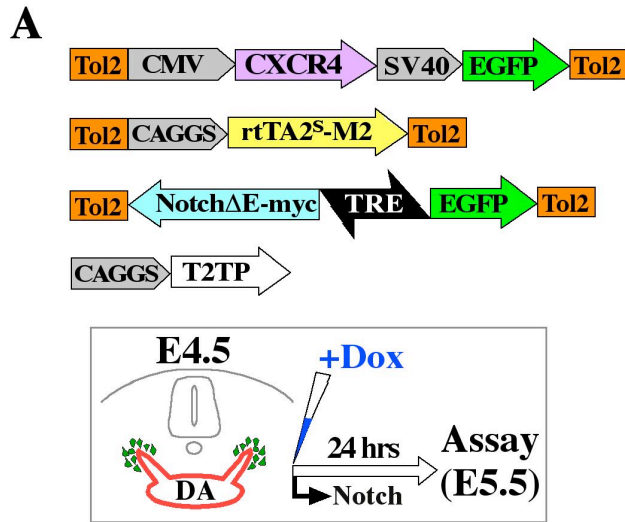
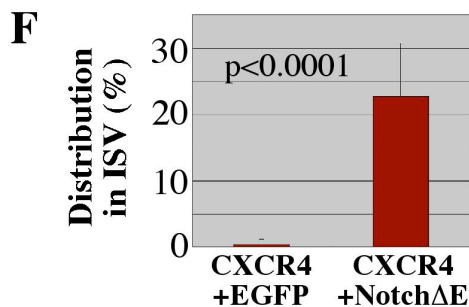
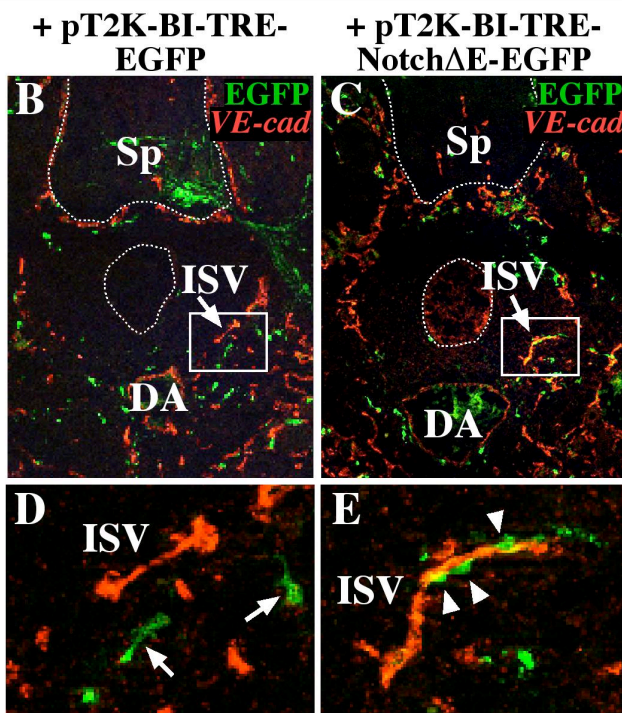


図 13. 発生のより後期でも、Notch 活性の付与によって体節細胞は血管内皮細胞へと転換する

(A) 発現プラスミドのセットと実験手順を模式図で示す。まず CXCR4 のみの働きによって体節間血管周辺に細胞を集積させ、4.5 日目胚の時点で Dox を添加し、それらの細胞で Notch を活性化させる。24 時間後 (5.5 日目胚)、それらの細胞が血管内皮細胞に分化しているかを VE-cadherin をマーカーとして評価する。(B-E) 5.5 日目胚の横断切片を示す。CXCR4 強制発現細胞 (緑) は体節間血管 (ISV) 周辺に存在していたが (B, D; 矢印)、Notch 活性を得ると血管内皮細胞として体節間血管に組み込まれた (C, E; 矢頭)。VE-cadherin 遺伝子発現を赤で示す。(F) 遺伝子導入細胞が体節間血管の血管内皮細胞になっていた割合。EGFP 陽性かつ VE-cadherin マーカー陽性の細胞数を、総エレクトロポレーション細胞数で割った。統計には、各条件の 3 個体から 4 切片を選出して用いた。DA, 背側大動脈 (dorsal aorta); Sp, 脊髄 (spinal cord); ISV, 体節間血管 (intersomitic vessel)

### ⚡ pT2K-CMS-CXCR4-EGFP



### Movie 1

pTRE-EGFP を遺伝子導入した体節を胚体外培養し、タイムラプス観察した。EGFP 陽性細胞は、ほとんど変化が見られず、丸い形をしていた。対物レンズには 20x Plan-Apochromat を用いて、ムービーは 2 分ごとに 96 分間撮影した。

### Movie 2

pTRE-CXCR4-EGFP を遺伝子導入した体節細胞を胚体外培養し、タイムラプス観察した。CXCR4 強制発現細胞は、多数の長い糸状仮足を伸ばしており、糸状仮足が分岐する像も観察された。対物レンズには 20x Plan-Apochromat を用いて、ムービーは 2 分ごとに 96 分間撮影した。

### Movie 3

pTRE-Notch $\Delta$ E-EGFP を遺伝子導入した体節細胞を胚体外培養し、タイムラプス観察した。Notch 活性型細胞は、多数の糸状仮足を伸ばしていた。対物レンズには 20x Plan-Apochromat を用いて、ムービーは 2 分ごとに 96 分間撮影した。

## 第二部

### 血管サブタイプを規定するケモカイン SDF1/CXCR4 の役割

#### CXCR4 mRNA の血管内皮細胞での発現パターン

第一部では主に体節細胞に発現する CXCR4 に注目して解析を進めてきたが、第二部では、血管内皮細胞に発現する CXCR4 に注目する。ニワトリ 3.5 日目胚では、体節間血管は体節の分節パターンに従って、周期的に左右対となって背側大動脈から伸長し形成される (図 2C)。この背側大動脈と体節間血管に焦点を当てると、両者は連続した血管であるにもかかわらず、CXCR4 mRNA は体節間血管の血管内皮でのみ発現しており、背側大動脈には発現が見られないという興味深いパターンを示した (図 14A; 背側大動脈, 14B, 14C; 背側大動脈と伸長中の体節間血管)。胎生 12.5 日目のマウス胚においても、CXCR4 mRNA は伸長中の体節間血管 (後の肋間血管) で強く発現する (図 14D, 14E, 14H)。一方、SDF1 mRNA は、体節間血管 (後の肋間血管) の伸長する道筋に発現を示した (図 14F, 14G, 14H) (ニワトリ 3.5 日目胚での SDF1 mRNA の発現パターンは図 6D を参照)。これらの発現パターンから、SDF1/CXCR4 は体節間血管の形成に何らかの役割を持っていることが予想された。

#### CXCR4 ノックアウトマウスは肋間血管の重篤な形成不全を示す

そこで、CXCR4 ノックアウトマウスを血管パターンニングに注目して解析した。胎生 17.5 日目胚において、野生型では肋骨と肋骨の間に肋間血管が規則正しく配置されるのに対し (図 15A; 矢印、n=8)、ノックアウトマウスでは肋間血管がほとんど形成されていないか、1~2 本形成されていたとしても異常な走行パターンを示していた (図 15B, 15C; 別々の 2 個体 (#1 と #2) を示す、n=9) (図

15A, 15C は理研 CDB の河西利治さんより提供)。一方で背側大動脈に関しては、ノックアウトマウスでも変化ないようだったことから、肋間血管特異的に異常が起こっていると考えられた。このことは、CXCR4 の遺伝子発現が背側大動脈にはなく、体節間血管に限局していることと一致する。ノックアウトマウスの肋間血管の欠損は、マウスの血管内皮細胞特異的なマーカーである PECAM-1 抗体を用いた組織染色によって、胎生 13.5 日目ですでに確認することができる (図 15D; 野生型、矢印、n=3, 15E; ノックアウトマウス、n=3, PECAM-1 免疫染色は、理研 CDB の河西利治さんより提供)。血管形成不全の理由として、血管の伸長が阻害されている可能性と、一度伸長した血管が維持されずに退縮や細胞死を起こす可能性が考えられた。そこで、TUNEL 染色を行って血管パターンニングと細胞死との関連を調べてみたが、ノックアウトマウスの血管で有意に細胞死が起こっているという結果は得られなかった (図 15P; 野生型、n=5, 15Q, 15R; ノックアウトマウス、n=5) (血管以外の組織で見られる細胞死に関しては、次項で述べる)。そこで、肋間血管の原基である体節間血管の形態を詳細に知るために、発生期を遡って、血管の安定・成熟化に必須の平滑筋細胞 (smooth muscle actin 抗体) の局在と、PECAM-1 シグナルを指標とする血管パターンについて解析を行った。野生型胚の観察から、胎生 10.5 日目胚で見られる形成し始めの体節間血管は平滑筋細胞に覆われておらず (図 15H, 15I; 矢印、n=5)、ある程度血管伸長が進行すると平滑筋細胞に取り囲まれた (図 15F; n=7)。これらの現象は、一般的によく知られている血管新生時に見られる細胞挙動と一致する。ところがノックアウトマウスでは、形成し始めの体節間血管の周囲を平滑筋細胞が取り囲んでいる像がしばしば観察され (図 15J, 15K; 矢印、n=5)、その後末梢に向かってダイナミックに伸長する体節間血管はほとんど見られなかった (図 15G; n=8)。血管内皮細胞は平滑筋細胞と密接に相互作用し合い、平滑筋細胞のリクルートメントは血管形成を鎮静化させる、つまり血管を quiescent な状態にさせることがよく知られている (Jain, 2003)。このことを

踏まえると、本来ならば血管伸長の促進状態（未熟で active な血管の状態）にあるはずの初期体節間血管（図 15H, 15I）が、CXCR4 ノックアウトマウスではすでに平滑筋細胞に取り巻かれていることから、CXCR4 の機能阻害によって体節間血管の内皮細胞は quiescent な状態に変化し、その結果として血管伸長が停滞してしまったのではないかと考えられた。つまり、本来の発生過程において、体節間血管で発現する CXCR4 は、これらの血管を active な状態にし、血管伸長を促進させる働きがあるのではないかと予想した。

#### CXCR4 ノックアウトマウスでは神経系や筋肉細胞にも異常が現れる

血管パターンニング以外にも特筆すべき CXCR4 ノックアウトマウスの表現系として、まず神経パターンニングの異常が挙げられる。これまでに、マウスやゼブラフィッシュの解析から、CXCR4 が神経細胞の移動やパターンニングに必須であることは知られていた (Belmadani et al., 2005; Gilmour et al., 2004; Lieberam et al., 2005; Zou et al., 1998)。本研究では新規に、ニューロフィラメントマーカの 2H3 抗体を用いて、胎生 13.5 日目胚の CXCR4 ノックアウトマウスでは肋骨間に規則正しく配置される肋間神経が消失していることを見出した（図 15L; 野生型, n=3, 15M; ノックアウトマウス, n=3, 2H3 免疫染色は、理研 CDB の河西利治さんより提供）。また肋間神経に加え、感覚神経の一種である後根神経節の異変も新規に発見した（図 15N, 15O）。本来ならば脊髄の両側に左右一対ずつ形成される後根神経節は（図 15N; 野生型 n=10）、ノックアウトマウスの後肢の付け根のレベルでのみ、脊髄の腹側に沿うように連結していた（図 15O; ノックアウトマウス 矢印, n=10）。このとき、脊髄自体も異常な形態を示し、脊髄腹側の細胞が有意に増加しているようだった（図 15O）（大畑の未発表データ）。

またノックアウトマウスの組織で細胞死を調べたところ、筋肉前駆細胞が有

意にアポトーシスを起こしていることが、胎生 10.5 日目胚を用いた TUNEL 染色から明らかとなった (図 15P;野生型, n=3, 15Q, 15R;ノックアウトマウス, n=3)。

### 血管内皮細胞での CXCR4 の過剰発現は血管新生を促進する

血管形成に注目した CXCR4 ノックアウトマウスの解析から、CXCR4 を発現する体節間血管の血管内皮細胞は、血管伸長に対して active な状態にあり、その時期に quiescent な状態にある背側大動脈から区別されることによって、体節間血管のみで伸長が促進されるという可能性が考えられた。そこで、血管内皮細胞に CXCR4 を強制発現させ、血管全体が active な状態になるかを検証した。血管内皮細胞への遺伝子導入には、当研究室でごく最近開発された方法を用い、トランスフェクション試薬を使用して調製した DNA 溶液を、ニワトリ 2 日目胚の心臓から直接血管内へインジェクションすることによって行った (方法論は当研究室の高瀬悠太さんによって論文作成中)。導入プラスミドとして、pCAGGS-tTA (tTA: Dox 非存在下で TRE 配列に結合し、目的遺伝子と EGFP の転写を活性化させる。本来は Dox 添加によって遺伝子発現を停止させる Tet-off system として利用されるが、今回は Dox を添加せず、恒常発現誘導因子として利用した。)と共に、pTRE-EGFP、または pTRE-CXCR4-EGFP、または pSilencer 1.0-U6-CXCR4-shRNA-#1-EGFP、または pSilencer 1.0-U6-CXCR4-shRNA-#2 をそれぞれ調製した。遺伝子導入された胚は、36 時間後の 3.5 日目胚で固定し解析した。この方法を用いると、背側大動脈や体節間血管をはじめ、頭部や目の血管、心臓、胚体外血管にも遺伝子を強制発現させることが可能である (図 16A)。

横断切片を作製し観察すると、コントロールでは、EGFP のシグナルは背側大動脈と体節間血管にランダムに局在した (図 16A, 16B, 16G; n=4)。これに対して、CXCR4 を強制発現された血管内皮細胞は、伸長中の体節間血管領域に集

積する傾向が見られた (図 16C, 16H; 矢印、n=5)。または、背側大動脈から CXCR4 陽性の異所的な血管が出芽しようとする像がしばしば観察された (図 16D, 16I; 矢印、n=5)。このときの背側大動脈は、本来ならば成熟した円形をしているのだが、CXCR4 を導入されるとその形態が崩れ、凹凸が目立つ管構造をとる (図 16G と図 16I を比較)。これとは逆に、RNAi を用いて血管内皮細胞での CXCR4 の機能を阻害すると、これらのノックダウン細胞は形成中の体節間血管の中には存在しなかった (shRNA-#1: 図 16E, 16J; n=5、shRNA-#2: 図 16F, 16K; n=5)。以上の結果から、CXCR4 陽性の血管内皮細胞は積極的に血管伸長を促進する可能性が示唆された。本来の発生過程では、このような役割をもつ CXCR4 を体節間血管のみに限局して発現させることにより、背側大動脈を成熟血管の状態に保ったまま、体節間血管のみで伸長を促すことが考えられた。

#### CXCR4 と協調的に働いて血管伸長を促進させる因子の探索

血管内皮細胞において、CXCR4 と協調的に働いて血管伸長を促進させる因子を探索するために、*CXCR4* mRNA の発現が体節間血管 (肋間血管の原基) に限局するニワトリ 3.5 日目胚において、さまざまな血管形成因子の mRNA 発現パターンを調べた。これまでに発現解析を行ったのは、*VEGF*、*Quek1* (トリ VEGF receptor2 ホモログ)、*TGFβ2*、*TGFβ3*、*CXCR7*、*PDGFb*、*PDGF receptorβ* (以下 PDGFRβ と略す)、*PDGFa*、*CTGF* (connective tissue growth factor)、*APJ* (マウス apelin のレセプター)、*Notch1*、*Delta-like4* (以下 Dll4 と略す)、*Angiopoietin1*、*Tie2* の 24 分子である (図 17)。*Quek1*、*CXCR7*、*Tie2* は、背側大動脈と体節間血管のどちらの血管内皮細胞でも一様に発現していた。*PDGFb*、*PDGFRβ*、*Notch1*、*Dll4* は体節間血管で強く発現する傾向が見られる。逆に *TGFβ3*、*CTGF*、*Angiopoietin1* は背側大動脈で強く発現する傾向があった。*VEGF*、*TGFβ2*、*PDGFa*、*APJ* はどちらの血管にも強いシグナルは観察されなかった。マウスの網膜血管を使った研

究から、PDGFb や D114 は、伸長血管の先端に存在して血管伸長を促進する Tip 細胞で特異的に発現していることが報告されており (Claxton et al., 2008; Phng and Gerhardt, 2009)、私は特にこれらの因子と CXCR4 との関わりに注目し、解析を続けていく予定である。



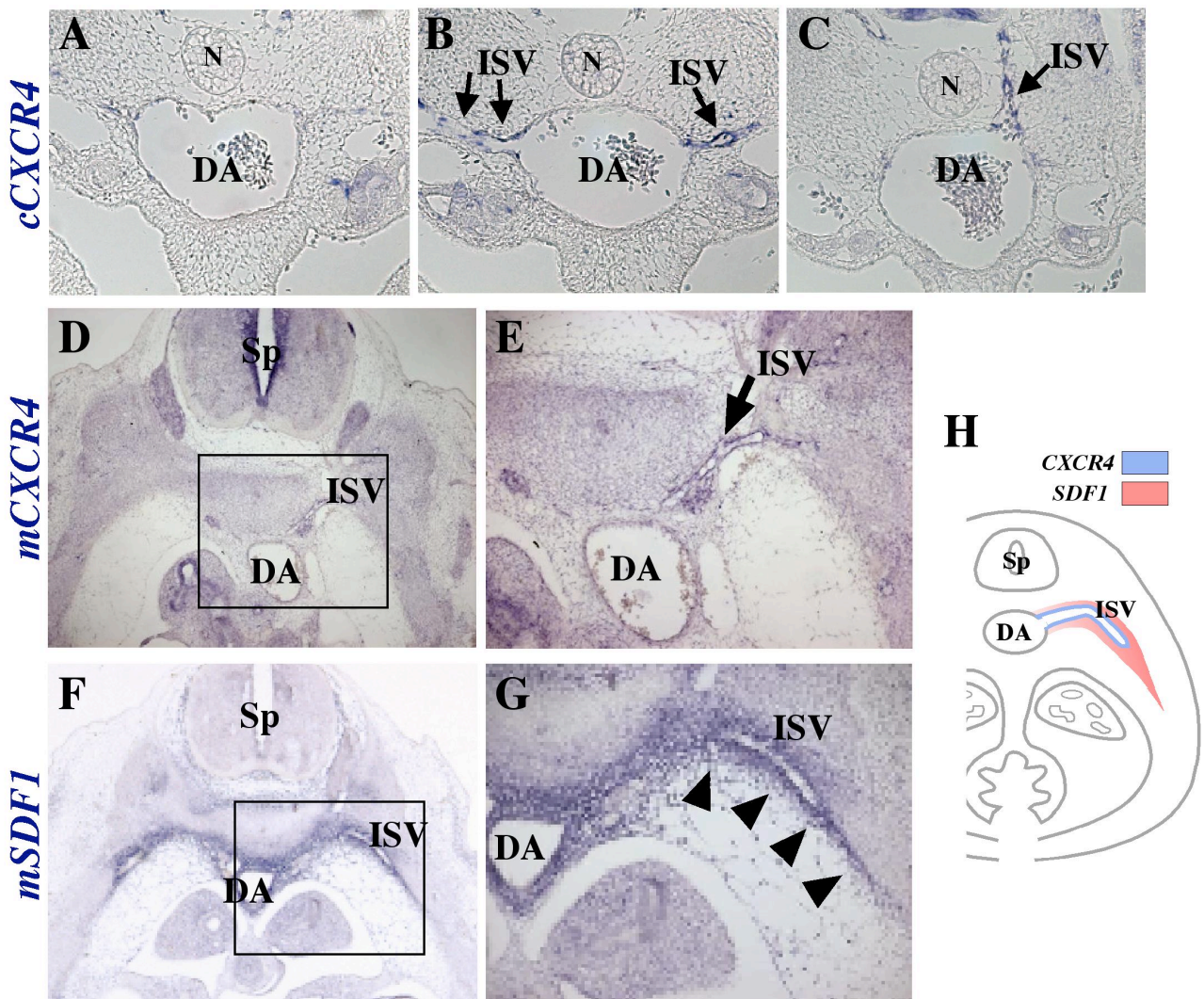


図 14. CXCR4 は体節間血管の血管内皮に発現し、背側大動脈には発現しない

(A-C) ニワトリ 3.5 日目胚の血管に注目すると、CXCR4 mRNA は背側大動脈の血管内皮細胞には発現しておらず (A)、伸長中の体節間血管の血管内皮特異的に発現していることがわかった (B, C)。(D-E) マウス 12.5 日目胚でも同様に、CXCR4 mRNA の発現は背側大動脈ではなく、伸長中の体節間血管に見られた。(F, G) マウス 12.5 日目胚の SDF1 は、体節間血管が伸長する道筋に発現していた。(ニワトリ 3.5 日目胚の SDF1 発現パターンは図 4D に示す。)(H) CXCR4 (青) と SDF1 (赤) の mRNA 発現パターンの模式図を示す。DA, 背側大動脈 (dorsal aorta); ISV, 体節間血管 (intersomitic vessel); N, 脊索 (notochord); Sp, 脊髄 (spinal cord)

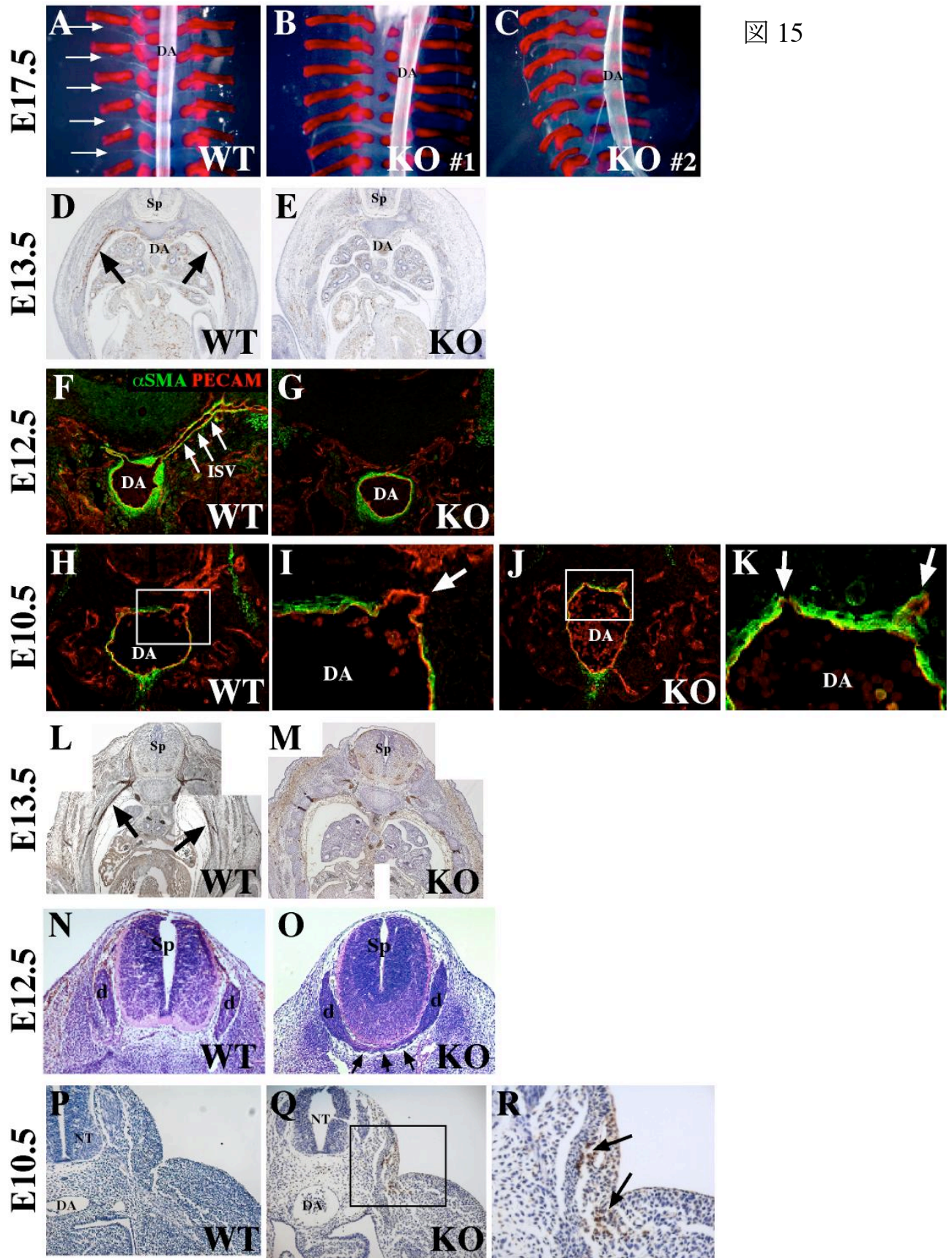


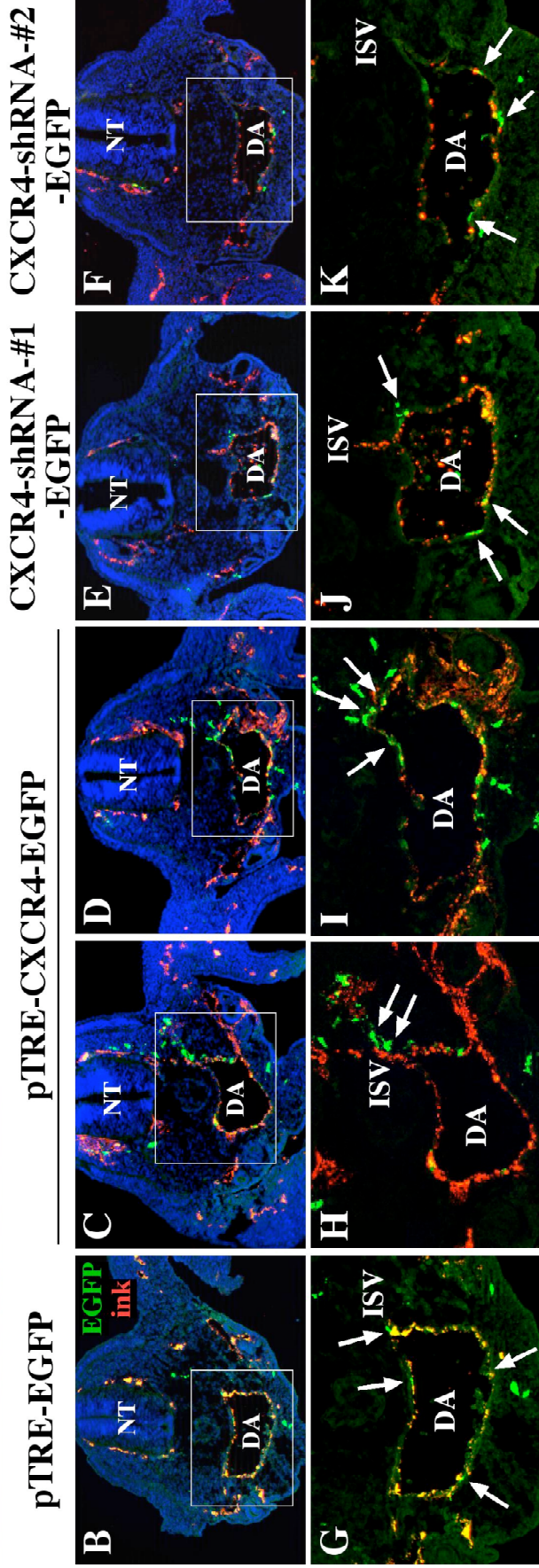
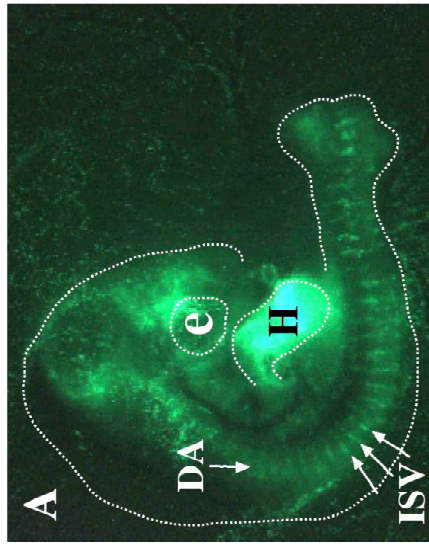
图 15

図 15. CXCR4 ノックアウトマウスは血管や神経に異常を示す

(A-C) 胎生 17.5 日の肋骨 (赤) と血管パターン。野生型 (A) では、肋骨間を規則正しく走る肋間血管 (矢印) が見えるのに対し、ノックアウトマウス (B, C、異なる 2 個体を示す) では肋間血管はほとんどなくなっているか、あっても異常な走行パターンを示していた。背側大動脈は正常のようであった。(D, E) 肋間血管の消失は、PECAM-1 シグナル (茶色) を指標として、胎生 13.5 日目胚ですでに観察された。(F, G) 胎生 12.5 日目胚の野生型 (F) では、平滑筋細胞 (緑) に取り囲まれた形成中の肋間血管が認められるが、ノックアウトマウス (G) では観察されなかった。PECAM-1 シグナルを赤で示す。(H-K) 発生過程を遡ると、胎生 10.5 日目胚において、野生型 (H, I) では伸長し始めの肋間血管 (体節間血管) の周辺には平滑筋細胞が存在していなかったが、ノックアウトマウス (J, K) では、しばしばこれらの血管周辺にも平滑筋細胞が存在していることが観察された。smooth muscle actin シグナルを緑、PECAM-1 シグナルを赤で示す。I と K はそれぞれ H と J の拡大図。(L, M) ニューロフィラメントマーカーである 2H3 抗体で神経パターンを可視化すると、胎生 13.5 日目胚の野生型では肋骨間に規則正しく配置される肋間神経が見られるのに対し (L; 矢印)、ノックアウトマウスでは肋間神経は認められなかった (M)。(N, O) 胎生 12.5 日目胚以降、後肢の付け根のレベルでは、脊髄を挟んで一対ある後根神経節が、ノックアウトマウスでは脊髄の腹側でつながってしまうことを見出した (O; 矢印) (H&E 染色)。(P-R) TUNEL 染色を行って細胞死を可視化すると、ノックアウトマウスでは筋肉細胞でシグナルが観察された。R は Q の拡大図。DA, 背側大動脈 (dorsal aorta); Sp, 脊髄 (spinal cord); NT, 神経管 (neural tube); ISV, 体節間血管 (intersomitic vessel); d, 後根神経節 (dorsal root ganglia)

図 16. CXCR4 を強制発現された血管内皮細胞は、積極的に血管伸長を行う

(A) 当研究室でごく最近開発された方法で、血管内皮細胞に EGFP を導入した。写真は遺伝子導入されたニワトリ 3.5 日目胚を側方から見たもの。頭尾軸にそって走る背側大動脈 (DA) とストライプ状に配置された体節間血管 (ISV) で EGFP の発現が観察された。その他、頭部や目 (e)、心臓 (H)、また胚体外血管にも EGFP シグナルが見られた。(B-K) コントロール (B, G; 矢印) では、遺伝子導入細胞は背側大動脈と体節間血管の両方に局在するのに対し、CXCR4 発現細胞は伸長中の体節間血管に集積したり (C, H; 矢印)、背側大動脈から異所的な伸長を起こそうとする傾向が見られた (D, I; 矢印)。これとは逆に、CXCR4 に対する shRNA を発現させると、ノックダウン細胞は伸長中の体節間血管内には存在しなかった (shRNA-#1: E, J; 矢印、shRNA-#2: F, K; 矢印)。B-K では、蛍光インクのインジェクションによって血管を可視化した (赤色)。NT, 神経管 (neural tube); DA, 背側大動脈 (dorsal aorta); ISV, 体節間血管 (intersomitic vessel)



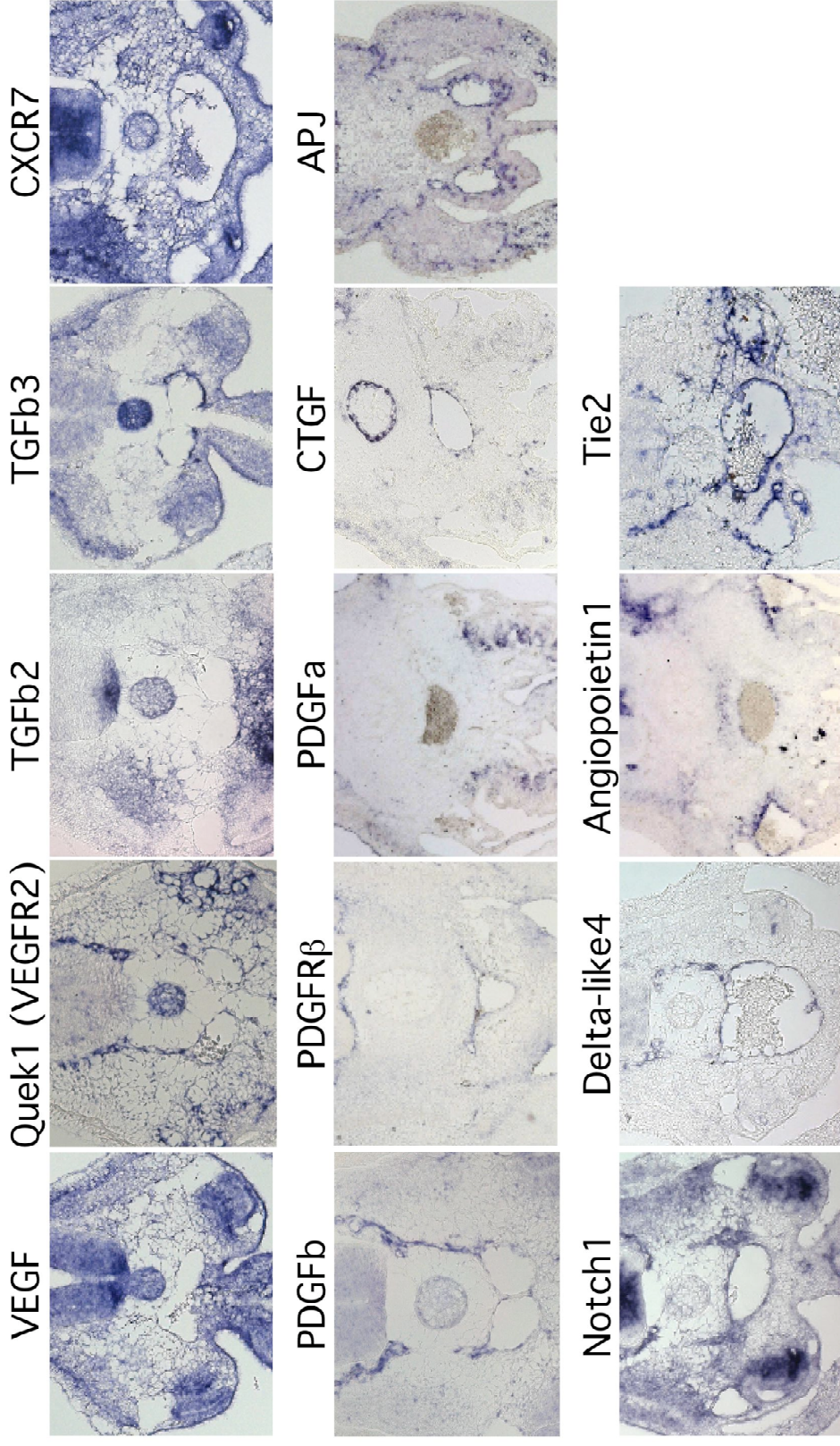


図 17. 体節間血管の形成時期におけるさまざまな遺伝子の mRNA 発現パターン

ニワトリ 3.5 日目胚、またはマウス 11.5 日目胚 (APJ のみ) での背側大動脈と体節血管に注目した遺伝子発現パターン。Quek1、CXCR7、Tie2 は、背側大動脈と体節間血管のどちらの血管内皮細胞でも一様に発現していた。PDGFB、PDGFR β、Notch1、DLL4 は体節間血管で強く発現する傾向が見られた。逆に TGF β 3、CTGF、Angiopoietin1 は背側大動脈で強く発現する傾向があった。VEGF、TGF β 2、PDGFa、APJ は、どちらの血管にも強いシグナルは観察されなかった。

## 考察

### 体節が寄与する血管形成と Notch シグナル

初期発生過程において、背側大動脈形成に寄与する体節細胞は、Notch シグナルの活性化によって大動脈原基へと積極的に移動し、その後血管内皮細胞へ分化することがわかっていたが (Sato et al., 2008)、本研究では、Notch シグナルはその最終ステップ、つまり細胞移動の経路にはよらず、大動脈周辺に集積した体節細胞を血管内皮へと転換させる過程において決定的な役割を果たしていることを明らかにした (Ohata et al., in press)。SDF1/CXCR4 を介したケモカインシグナルの誘引作用によって、実験的に背側大動脈へと移動させた体節細胞において、時期特異的遺伝子発現法 (Tet-on system) を用いて Notch 活性を付与することにより、血管内皮細胞への分化を促すことができた (Ohata et al., in press)。興味深いことに、Notch 活性を付与された体節細胞でも、血管の周辺に存在しなかったものは血管内皮に転換せず、異所的な血管が形成されたわけではなかったことから、Notch シグナルによる分化誘導には、血管由来の未知の因子 (群) が必要であることが示唆された。このことは、体節内でも背側大動脈から離れている皮筋節細胞が、Notch 活性をもっているにも関わらず血管内皮細胞には分化しないことと一致する (Ben-Yair and Kalcheim, 2008)。また本研究の解析から、Notch 活性化細胞を背側大動脈へと誘引する因子は SDF1/CXCR4 ではなかったことから、新たな誘引因子の探索が待たれる。

Notch 細胞がナイーブな細胞を血管内皮へ転換させるという本研究から得られた知見は、今後の再生医療や血管治療の分野にも寄与することが期待される。たとえば、遺伝子操作した間充織細胞を、移植や細胞誘引作用を利用して生体内の特定の場所に配置させ、時期特異的に Notch 活性を付加すれば、それらの細胞は隣接する血管に取り込まれることが予想されるため、場所特異的に血管

を操作することが可能になると考えられる。

### SDF1/CXCR4 シグナルが Notch 活性を抑制する可能性について

本研究前半の結果から、体節細胞はもともと血管内皮細胞へ分化するポテンシャルを持っているにも関わらず、CXCR4 を過剰発現された体節細胞は決して血管内皮細胞には分化しないことが明らかとなった。逆に、CXCR4 に対する RNAi を体節細胞に発現させ、内在的な CXCR4 の機能を阻害した場合、これらのノックダウン細胞はかなりの割合で背側大動脈の血管内皮細胞へと分化した (data not shown)。このことから、体節細胞で発現する CXCR4 は、血管内皮細胞への分化を積極的に抑制しているのではないかと考えられた。そこで、SDF1/CXCR4 を介したシグナルが Notch シグナルを抑制するという可能性について考察する。これまでに、Dll4-Notch シグナルの活性化によって、HUVEC 細胞における CXCR4 mRNA の発現が減少するという報告はあるが (Williams et al., 2008a)、逆に SDF1/CXCR4 が Notch 活性を抑制するという報告はまだない。SDF1/CXCR4 を介したシグナルが Notch シグナルを阻害するステップとしては、以下の4点が予想される。①SDF1/CXCR4 シグナルの下流で生産される分子 (群) が、隣接する細胞に働きかけて、Notch リガンドの発現または機能を抑制する。②SDF1/CXCR4 シグナルは、細胞自律的に Notch の発現を抑制する。③SDF1/CXCR4 シグナルは、Notch の細胞内ドメインを切断するのに必要な ADAM や  $\gamma$ -secretase といったプロテアーゼの機能を阻害する。④SDF1/CXCR4 シグナルは、Notch シグナルの下流因子の機能を阻害する。上記の CXCR4 強制発現細胞が血管内皮細胞へ分化しないという結果は、①~④のいずれの場合においても成り立つと考えられる。

マウスの網膜血管網やゼブラフィッシュの体節間血管をモデルとした研究から、血管の伸長には血管内皮細胞の Notch 活性が低下する必要があることがわかっている。この知見が本研究で注目した肋間血管の伸長にも当てはまると仮

定すると、CXCR4 ノックアウトマウスでみられた血管の形成不全を Notch シグナルとの関連で説明できるだろうか。①の場合では、CXCR4 ノックアウトマウスの肋間血管では Notch リガンドが過剰に発現すると予想されるため、血管内皮細胞内に Notch シグナルが過剰に伝達される結果、血管の伸長が阻害されると考えられる。②の場合、ノックアウトマウスの血管内皮細胞では Notch が過剰に発現すると予想されるため、Notch の過活性によって血管伸長は阻害されると考えられる。同様に、③④の場合でも、Notch シグナルが肋間血管に過剰に伝達されることになるため、CXCR4 ノックアウトマウスの血管形成不全と矛盾しない。今後、SDF1/CXCR4 の血管伸長に関わる機能を解析していく際、Notch シグナルを抑制している可能性について重点的に検証していきたい。

#### 体節中胚葉で機能する SDF1/CXCR4 の形態形成における役割

本研究前半の結果から、SDF1/CXCR4 を介したケモカインシグナルは、体節由来の血管形成には関与していないようであった。では、本来の発生過程における体節細胞での SDF1/CXCR4 の役割は何なのだろうか？ 図 6A、6E で示したように、SDF1 と CXCR4 はそれぞれ表皮外胚葉と PSM の背側領域で発現しており、図 7 に示すように、これらの組織間では誘引作用が働いていることがわかった。さらに、CXCR4 ノックアウトマウスでは、皮筋節細胞が有意にアポトーシスを起こしていた（図 15P-R）。これらの結果から、CXCR4 陽性の皮筋節前駆細胞は、表皮外胚葉からの SDF1 に誘引されて体節背側領域に留まり、さらに SDF1 からの生存シグナルを受け (Horuk, 2001)、将来の骨格筋形成に寄与することが予想された。これまでの知見から、発生過程で筋肉細胞が体節から四肢へと移動する際には CXCR4 が必要であることが報告されており (Vasyutina et al., 2005)、この現象との関連が考えられる。さらに SDF1/CXCR4 シグナルの入った体節細胞は決して血管内皮細胞に分化しないことから、CXCR4 陽性細胞を体節背側領



域に集積させることによって、体節腹側領域に効率よく背側大動脈を形成させる働きをもつことも予想される。実際に、CXCR4 シグナルの下流で働く因子の一つである JAK-STAT シグナル(Ahr et al., 2005; Soriano et al., 2003)を阻害するようなドミナントネガティブ型 CXCR4 を作製し、体節中胚葉に強制発現させると、体節内に異所的な血管が形成されるという実験結果を得ており(大畑の未発表データ)、SDF1/CXCR4 が体節内の細胞の配置を制御することによって、血管形成の場所を規定するという可能性が示されている。

では、背側大動脈とその周辺で強く発現する SDF1 の役割は何だろうか？ 現在までのところ、少なくとも三種類の細胞挙動に関与していると考えている。一つ目は、神経管の頂端部から生じ、体内を移動してさまざまな末梢神経組織を形成する神経冠細胞 (neural crest cell) の細胞移動である。私自身、または当研究室の齋藤大介助教らによって、神経冠細胞の中でも、背側大動脈に近接して交感神経節を形成するサブタイプや、背側大動脈の脇を通過してさらに腹側の副腎形成領域まで移動するサブタイプには CXCR4 が発現しており、これらの細胞移動には背側大動脈からの SDF1 が寄与することが示されている(未発表データ)。二つ目は、SDF1/CXCR4 を介して胚体外から生殖巣原基にむかって移動する始原生殖細胞 (primordiam germ cell) に対してである。ニワトリ胚の場合、始原生殖細胞は血流にのって生体内に入り、背側大動脈から予定生殖領域へと血管外遊出することが知られている(Tsunekawa et al., 2000)。そこで、SDF1 の誘引作用が血流中の始原生殖細胞を効率よく捕らえ、血管外遊出を促進することが考えられる。そして三つ目は、SDF1 は血管内皮細胞自体に作用し、血管パターンニングに寄与するということである。これについては、次項で述べる。

#### **CXCR4 が規定する血管内皮細胞の性質**

本研究後半の結果から、SDF1/CXCR4 は肋間血管という血管サブタイプ特異的な形態形成に必須の役割を持つことが示された。さらに、血管内皮細胞での CXCR4 の強制発現や RNAi を用いた機能阻害から、CXCR4 は SDF1 の誘引作用に従って血管伸長の方向を規定すると共に、形成中の肋間血管の内皮細胞を活発な状態にすることによって、血管伸長を促進する可能性が見えてきた。今後は、この「活発な状態」とはどのようなものかを詳細に解析していく予定である。

これまでのマウスの網膜血管やサカナの体節間血管をモデルとした血管新生の研究から、血管の伸長には Tip 細胞の存在が重要であり、Tip 細胞は PDGFb や D114 を発現していることがわかっている (Claxton et al., 2008; Phng and Gerhardt, 2009)。本研究の結果から、このような Tip 細胞の指標となる PDGFb や D114 が伸長中の体節間血管で強く発現していることから、CXCR4 の規定する血管の動的な状態との関連が予想される。

血管伸長を促進する要因としては、血管内皮細胞間の接着因子の動態が挙げられる (Dejana et al., 2009)。HUVEC 細胞を用いた研究から、VE-cadherin がエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれ、血管内皮細胞間の接着が弱まるのが、血管伸長には必要であると報告されている (Abraham et al., 2009; Dejana et al., 2008)。Rho ファミリーの一つである活性型 Rac は、VE-cadherin の細胞内ドメインをリン酸化して、エンドサイトーシスを引き起こすことがわかっているため (Gavard and Gutkind, 2006)、CXCR4 の下流で活性化される Rac とこのような現象がリンクしている可能性が考えられる。

また別の要因としては、血管を取り巻く支持細胞の挙動が挙げられる。支持細胞は伸長中の血管周辺には存在せず、逆に伸長が停止した血管周辺に集積して、血管の成熟化に寄与する (Jain, 2003)。伸長血管の周囲から支持細胞を除去する役割を持つ因子として、Angiopoietin2 が知られている (Augustin et al., 2009)。CXCR4 ノックアウトマウスでは、伸長し始めの血管周辺に支持細胞が残留することから (図 15K)、CXCR4 と Angiopoietin2 とのクロストークも予想さ

れる。また、細胞外基質を分解する matrix metalloproteinase (MMP) も、血管内皮細胞の移動能や支持細胞の除去に重要な働きをしている (Adams and Alitalo, 2007)。ヒト由来の平滑筋細胞において、CXCR4 は MMP2 の発現を上昇させることが報告されているため (Kodali et al., 2006)、血管内皮細胞においても同様のメカニズムが存在する可能性は高い。

以上のように、今後も SDF1/CXCR4 を介したケモカインシグナルに注目し、血管内皮細胞内での他の血管形成因子との関わり、血管内皮細胞間での接着分子の動態、また血管を取り巻く支持細胞や細胞外基質との相互作用を解明して、生体内の血管パターンニングを包括的に理解していきたい。

## 謝辞

CXCR4 ノックアウトマウスと、マウス CXCR4 およびマウス SDF1 の RNA プローブは、長澤丘司教授（京都大学・再生研）より供与いただきました。TP1-Venus レポーターは、岡野栄之教授（慶応大学）と神山淳博士（現・本学分子神経分化制御学講座助教）より供与いただきました。Notch  $\Delta E$  は、R. Kopan 博士より供与いただきました。マウス APJ プローブは、高倉伸幸教授（大阪大学・微生物病研）より供与いただきました。Thomas N. Sato 教授（本学・生体機能制御学講座）には、研究内容に関するアドバイスやサイエンスについて非常に丁寧なご指導を頂きました。

本学の分子発生生物学講座、ならびに理化学研究所・発生再生科学総合研究センター（理研 CDB）のパターン形成研究チームのみなさまには、多大なサポートをいただき、今日までの研究生活を続けていくことができました。齋藤大介助教には、RNAi を用いた実験系や研究全般に対するディスカッションを、田所竜介助教には、組織培養とタイムラプス観察を、佐藤有紀博士（現・熊本大学准教授）には、Tol2-トランスポゾンシステムと Notch に関して、仲矢由紀子博士（現・理研 CDB）には、エレクトロポレーション実験と Rho ファミリーに関して、渡邊忠由博士（現・UCSF）には Tet-on system を、それぞれご指導・ご助言いただきました。吉野剛史さん、高橋輝明さんには、たくさんのディスカッションとご助言をいただきました。高瀬悠太さんには、血管への遺伝子導入法をご指導いただきました。内山朱美さんには、コンピューターのサポートとたくさんのイラストを供与いただきました。利根川あかね博士には、CXCR4 に関する基礎的なデータを、河西利治さん（現・株式会社トランスジェニック）には、CXCR4 ノックアウトマウスの解析や CXCR4 を用いた研究全般をサポートしていただきました。

実験マウスの維持には、本学の動物飼育実験施設（動物実験専門部会・承認

番号 18) と理研 CDB の動物資源開発室のご協力をいただきました。

安田國雄元本学学長、影山龍一郎教授（京都大学・ウィルス研）、相沢慎一博士（理研 CDB・グループディレクター）、片岡浩介准教授、井上邦夫准教授（現・神戸大学）、影山裕二博士（現・基礎生物学研究所）、荻野肇准教授には、さまざまなご助言をいただくとともに、本学での学生生活をサポートしていただきました。

私は、理化学研究所・ジュニアリサーチアソシエイトと本学 COE・リサーチアソシエイトに採用され、研究生活をバックアップしていただきました。

最後に、高橋淑子教授には、本学に入学してから 7 年半の間、研究全般と学生生活に関して、たくさんのご指導とさまざまな貴重な機会を与えていただきました。

以上のたくさんの方々に、この場を借りてお礼申し上げます。

## 参考文献

- Abraham, S., Yeo, M., Montero-Balaguer, M., Paterson, H., Dejana, E., Marshall, C. J. and Mavria, G.** (2009). VE-Cadherin-mediated cell-cell interaction suppresses sprouting via signaling to MLC2 phosphorylation. *Curr Biol* **19**, 668-74.
- Adams, R. H. and Alitalo, K.** (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 464-78.
- Ahr, B., Denizot, M., Robert-Hebmann, V., BreLOT, A. and Biard-Piechaczyk, M.** (2005). Identification of the cytoplasmic domains of CXCR4 involved in Jak2 and STAT3 phosphorylation. *J Biol Chem* **280**, 6692-700.
- Ambler, C. A., Nowicki, J. L., Burke, A. C. and Bautch, V. L.** (2001). Assembly of trunk and limb blood vessels involves extensive migration and vasculogenesis of somite-derived angioblasts. *Dev Biol* **234**, 352-64.
- Ara, T., Tokoyoda, K., Okamoto, R., Koni, P. A. and Nagasawa, T.** (2005). The role of CXCL12 in the organ-specific process of artery formation. *Blood* **105**, 3155-61.
- Augustin, H. G., Koh, G. Y., Thurston, G. and Alitalo, K.** (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 165-77.
- Belmadani, A., Tran, P. B., Ren, D., Assimacopoulos, S., Grove, E. A. and Miller, R. J.** (2005). The chemokine stromal cell-derived factor-1 regulates the migration of sensory neuron progenitors. *J Neurosci* **25**, 3995-4003.
- Ben-Yair, R. and Kalcheim, C.** (2008). Notch and bone morphogenetic protein differentially act on dermomyotome cells to generate endothelium, smooth, and striated muscle. *J Cell Biol* **180**, 607-18.
- Benedito, R., Roca, C., Sorensen, I., Adams, S., Gossler, A., Fruttiger, M. and Adams, R. H.** (2009). The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on

angiogenesis. *Cell* **137**, 1124-35.

**Claxton, S., Kostourou, V., Jadeja, S., Chambon, P., Hodivala-Dilke, K. and Fruttiger, M.** (2008). Efficient, inducible Cre-recombinase activation in vascular endothelium. *Genesis* **46**, 74-80.

**Dejana, E., Orsenigo, F. and Lampugnani, M. G.** (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* **121**, 2115-22.

**Dejana, E., Tournier-Lasserre, E. and Weinstein, B. M.** (2009). The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell* **16**, 209-21.

**Gavard, J. and Gutkind, J. S.** (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol* **8**, 1223-34.

**Gilmour, D., Knaut, H., Maischein, H. M. and Nusslein-Volhard, C.** (2004). Towing of sensory axons by their migrating target cells in vivo. *Nat Neurosci* **7**, 491-2.

**Gros, J., Serralbo, O. and Marcelle, C.** (2009). WNT11 acts as a directional cue to organize the elongation of early muscle fibres. *Nature* **457**, 589-93.

**Hamburger, V. and Hamilton, H. L.** (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* **195**, 231-72.

**Hellstrom, M., Phng, L. K., Hofmann, J. J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A. K., Karlsson, L., Gaiano, N. et al.** (2007). Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* **445**, 776-80.

**Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J. and Ish-Horowicz, D.** (1995). Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* **375**, 787-90.

- Himly, M., Foster, D. N., Bottoli, I., Iacovoni, J. S. and Vogt, P. K.** (1998). The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses. *Virology* **248**, 295-304.
- Horuk, R.** (2001). Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**, 313-35.
- Jain, R. K.** (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* **9**, 685-93.
- Kodali, R., Hajjou, M., Berman, A. B., Bansal, M. B., Zhang, S., Pan, J. J. and Schecter, A. D.** (2006). Chemokines induce matrix metalloproteinase-2 through activation of epidermal growth factor receptor in arterial smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* **69**, 706-15.
- Kohyama, J., Tokunaga, A., Fujita, Y., Miyoshi, H., Nagai, T., Miyawaki, A., Nakao, K., Matsuzaki, Y. and Okano, H.** (2005). Visualization of spatiotemporal activation of Notch signaling: live monitoring and significance in neural development. *Dev Biol* **286**, 311-25.
- Kucia, M., Jankowski, K., Reza, R., Wysoczynski, M., Bandura, L., Allendorf, D. J., Zhang, J., Ratajczak, J. and Ratajczak, M. Z.** (2004). CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol* **35**, 233-45.
- Lawson, N. D., Scheer, N., Pham, V. N., Kim, C. H., Chitnis, A. B., Campos-Ortega, J. A. and Weinstein, B. M.** (2001). Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* **128**, 3675-83.
- Lawson, N. D., Vogel, A. M. and Weinstein, B. M.** (2002). sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev Cell* **3**, 127-36.
- Leslie, J. D., Ariza-McNaughton, L., Bermange, A. L., McAdow, R., Johnson, S. L. and Lewis, J.** (2007). Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis. *Development* **134**, 839-44.
- Lieberam, I., Agalliu, D., Nagasawa, T., Ericson, J. and Jessell, T. M.** (2005). A



Cxcl12-CXCR4 chemokine signaling pathway defines the initial trajectory of mammalian motor axons. *Neuron* **47**, 667-79.

**Nagasawa, T., Nakajima, T., Tachibana, K., Iizasa, H., Bleul, C. C., Yoshie, O., Matsushima, K., Yoshida, N., Springer, T. A. and Kishimoto, T.** (1996). Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14726-9.

**Nakaya, Y., Kuroda, S., Katagiri, Y. T., Kaibuchi, K. and Takahashi, Y.** (2004). Mesenchymal-epithelial transition during somitic segmentation is regulated by differential roles of Cdc42 and Rac1. *Dev Cell* **7**, 425-38.

**Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J.** (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**, 193-9.

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

**Ohata, E. and Takahashi, Y.** (2009). In ovo electroporation for targeting the somitic mesoderm. Springer.

**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**, 1363-71.

**Patrussi, L. and Baldari, C. T.** (2008). Intracellular mediators of CXCR4-dependent signaling in T cells. *Immunol Lett* **115**, 75-82.

**Phng, L. K. and Gerhardt, H.** (2009). Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell* **16**, 196-208.

**Phng, L. K., Potente, M., Leslie, J. D., Babbage, J., Nyqvist, D., Lobov, I., Ondr, J. K., Rao, S., Lang, R. A., Thurston, G. et al.** (2009). Nrarp coordinates endothelial

Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis. *Dev Cell* **16**, 70-82.

**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**, 1013-22.

**Raz, E.** (2003). Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. *Nat Rev Genet* **4**, 690-700.

**Risau, W. and Flamme, I.** (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 73-91.

**Roland, J., Murphy, B. J., Ahr, B., Robert-Hebmann, V., Delaunay, V., Nye, K. E., Devaux, C. and Biard-Piechaczyk, M.** (2003). Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. *Blood* **101**, 399-406.

**Salcedo, R. and Oppenheim, J. J.** (2003). Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation* **10**, 359-70.

**Salcedo, R., Wasserman, K., Young, H. A., Grimm, M. C., Howard, O. M., Anver, M. R., Kleinman, H. K., Murphy, W. J. and Oppenheim, J. J.** (1999). Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am J Pathol* **154**, 1125-35.

**Salvucci, O., Yao, L., Villalba, S., Sajewicz, A., Pittaluga, S. and Tosato, G.** (2002). Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood* **99**, 2703-11.

**Sato, Y., Kasai, T., Nakagawa, S., Tanabe, K., Watanabe, T., Kawakami, K. and Takahashi, Y.** (2007). Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos. *Dev Biol* **305**, 616-24.

**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. *Dev Cell* **14**, 890-901.

**Sato, Y., Yasuda, K. and Takahashi, Y.** (2002). Morphological boundary forms by a novel inductive event mediated by Lunatic fringe and Notch during somitic segmentation. *Development* **129**, 3633-44.

**Schroeter, E. H., Kisslinger, J. A. and Kopan, R.** (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* **393**, 382-6.

**Siekman, A. F. and Lawson, N. D.** (2007). Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature* **445**, 781-4.

**Soriano, S. F., Serrano, A., Hernanz-Falcon, P., Martin de Ana, A., Monterrubio, M., Martinez, C., Rodriguez-Frade, J. M. and Mellado, M.** (2003). Chemokines integrate JAK/STAT and G-protein pathways during chemotaxis and calcium flux responses. *Eur J Immunol* **33**, 1328-33.

**Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S. et al.** (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* **393**, 591-4.

**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**, 1975-84.

**Tonegawa, A., Kasai, T. and Takahashi, Y.** (2003). Systematic screening for signaling molecules expressed during somitogenesis by the signal sequence trap method. *Dev Biol* **262**, 32-50.

**Tsunekawa, N., Naito, M., Sakai, Y., Nishida, T. and Noce, T.** (2000). Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* **127**, 2741-50.

- Vandercappellen, J., Van Damme, J. and Struyf, S.** (2008). The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett* **267**, 226-44.
- Vasyutina, E., Stebler, J., Brand-Saberi, B., Schulz, S., Raz, E. and Birchmeier, C.** (2005). CXCR4 and Gab1 cooperate to control the development of migrating muscle progenitor cells. *Genes Dev* **19**, 2187-98.
- Wang, H. U., Chen, Z. F. and Anderson, D. J.** (1998). Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* **93**, 741-53.
- 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. *Dev Biol* **305**, 625-36.
- Williams, C. K., Segarra, M., Sierra Mde, L., Sainson, R. C., Tosato, G. and Harris, A. L.** (2008a). Regulation of CXCR4 by the Notch ligand delta-like 4 in endothelial cells. *Cancer Res* **68**, 1889-95.
- Williams, D. A., Zheng, Y. and Cancelas, J. A.** (2008b). Rho GTPases and regulation of hematopoietic stem cell localization. *Methods Enzymol* **439**, 365-93.
- 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**, 242-8.
- Zhong, T. P., Childs, S., Leu, J. P. and Fishman, M. C.** (2001). Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature* **414**, 216-20.
- Zou, Y. R., Kottmann, A. H., Kuroda, M., Taniuchi, I. and Littman, D. R.** (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* **393**, 595-9.