

■原 著■ 2017 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## ゼブラフィッシュ血管内皮細胞の初期分化

藤田深里<sup>1,3</sup> 磯貝純夫<sup>2</sup>

### Early Differentiation of Vascular Endothelial Cells During Zebrafish Development

Misato Fujita<sup>1,3</sup> and Sumio Isogai<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Department of Anatomy, School of Medicine, Iwate Medical University, Shiwa-gun, Iwate 028-3694, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: fujita-bio@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Early differentiation of vascular endothelial cells is indispensable for the proper patterning and lumen formation of blood vessels. The vascular network forms in a reproducible and evolutionarily conserved manner, and their molecular mechanisms of formation have been markedly focused on. However, the differentiation process of vascular progenitors, angioblasts, remains unclear. Here, we report several tools to detect and analyze undifferentiated vascular endothelial cells in zebrafish embryos, including the vascular-specific transgenic lines, inhibitor treatments, and 3D reconstruction technique of electron microscopic serial images.

**Keywords:** zebrafish, vascular endothelial cell, angioblast, differentiation, serial section scanning electron microscopy

## 序論

生物の細胞は、一つの受精卵から卵割を経て数を増やし、さらなる細胞分裂と分化を経てさまざまな役割を担う形態と機能を獲得する。血管は血液を全身へ巡らせる器官であり、血液は酸素と栄養などを運搬し、二酸化炭素と老廃物などを処理する。管腔の内側を一層の血管内皮細胞が裏打ちし、外側は管の太さに応じて血管平滑筋細胞やペリサイトといった壁細胞が補強をしている。したがって、血管内皮細胞という細胞は、動脈・静脈および毛細血管のすべての種類の血管において内腔に存在する細胞である。またその形態は個々の細胞が薄く広がって接着している一層の扁平上皮構造を取っている。太い血管では多数の細胞により管腔をなしているが、細い血管では一細胞単独で管腔構造を取ることもある。血管内皮細胞は血液と組織との境界に位置し、選択的物質透過、血液凝固の阻止、逆に血栓性作用、また血管壁緊張調節、虚血応答による血管新生などさまざまな機能を担う多機能で動的な細胞であるが、細胞内小器官が少ないことが特徴として挙げられる<sup>1,2)</sup>。未分化な血管内皮細胞、すなわち血管芽細胞がどの

ような分化を経て多機能で瘦せた細胞に変化するのかが、詳細な形態変化観察や遺伝子メカニズム解析はまだ進んでいない。

小型の真骨魚類であるゼブラフィッシュは、受精後 6 時間にて原腸陥入、10 時間にて体節形成を開始する。その後、26 時間頃には血流を開始する<sup>3)</sup>。このように発生が早く、また卵生で卵膜も胚も透明なため顕微鏡下で生きたまま発生を観察するのに非常に適している<sup>4)</sup>。また、トランスジェニック技術を利用して血管内皮細胞に特異的に蛍光タンパク質を発現させる系統がいくつか作製されており、細胞の挙動を時空間的に観察することが可能である<sup>5)</sup>。未分化な血管芽細胞やさらに未分化な血管血球芽細胞に発現する遺伝子もいくつか解明されており、そのプロモーターを用いたトランスジェニック系統が作製されているため、血管内皮細胞の初期の分化を解析するモデル生物としても期待が持てる。

共焦点レーザー顕微鏡を含め一般的な光学顕微鏡はその分解能が 0.2 μm 程度である。原理的には光の波長の約半分までの分解能があるとされる。超解像

顕微鏡の技術開発が飛躍的に進んでいるがまだ身近ではない。毛細血管の内皮細胞は核の存在部位で2~3  $\mu\text{m}$ 、辺縁部では0.1~0.2  $\mu\text{m}$ あるいはそれ以下と非常に薄いため<sup>2)</sup>、光学顕微鏡で内皮細胞の形態やその中の細胞小器官を観察するのは難しい場合が多い。トランスジェニック技術により発現させた蛍光タンパク質も、細胞質分布タイプ・局所局在タイプおよび特定のタンパク質との融合タイプのいずれも光学顕微鏡上の漏れこみなどが無視できない。そのため、電子顕微鏡による解析も重要である。

近年、走査電子顕微鏡 (SEM: Scanning electron microscope) を用いて樹脂包埋試料の連続断面観察をする方法 (Array tomography 法) が組織解析技術を飛躍的に進展させた。集束イオンビームを用いたブロック面観察法 (FIB: Focused Ion Beam/SEM) や、マイクロトームを鏡体内に組み込んだ切削ブロック面観察法 (SBF: Serial Block-Face/SEM) の他に、超薄連続切片をガラス板に載せ、撮影した SEM 像を 3D 再構築する技法も報告されている<sup>6,7)</sup>。細胞内外の超微細構造を電子顕微鏡レベルで立体情報として得られるこれらの技術は画期的である。一方で、Array tomography 法の特徴である同一標本での電顕観察と蛍光観察を可能にするためには、超微形態と抗原露出の相反する条件を満たす固定法を検討する必要がある。そこで本研究では、血管内皮細胞の最も初期の分化過程を遺伝子メカニズムの側面と形態変化の側面から明らかにすることを目的として、分子シグナルの阻害実験と電子顕微鏡解析の条件検討を行った。

## 材料と方法

### ゼブラフィッシュ

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) 胚は、雌雄分けて飼育した成魚を交配用タンク (Tecniplast) に仕掛けて自然産卵により得た。野生型の系統として、EK、RW、TAB を用いた。発生段階は Kimmel et al., 1995 に従った<sup>3)</sup>。血管内皮細胞に蛍光タンパク質を発現する系統として、*Tg (fli1a:EGFP)*<sup>4)</sup> を用いた<sup>5)</sup>。受精後 24 時間以降で観察する場合は 1-phenyl-2-thiourea (PTU, nacalai) を用いて黒色素形成を抑制し、麻酔はトリカイン (SIGMA, A5040) を使用した<sup>8)</sup>。

### 阻害剤実験

VEGFR 阻害剤 (SU5416, abcam) と PI3K 阻害剤 (LY294002, Calbiochem) をそれぞれ DMSO に溶解して 30 mM ストック溶液を調整した。ピンセットで卵膜を除去した胚を 10  $\mu\text{M}$  VEGFR 阻害剤また

は 30  $\mu\text{M}$  PI3K 阻害剤に浸して発生させた。24-well プレートの 1-well に 5 匹ずつで阻害剤処理を行った。

### 顕微鏡観察

麻酔した胚を、7% メチルセルロースを用いてディプレッションスライドガラスにマウントし、蛍光実体顕微鏡 (Olympus, SZX16) を用いて観察および画像取得を行った。詳細な蛍光画像解析には、胚は 1% 低融点アガロースゲルを用いてガラスベースディッシュ (IWAKI, 3970-035) にマウントし、倒立型共焦点顕微鏡 (Zeiss, LSM700) を用いた。

### 連続切片 SEM 法の反射電子像による 3D 再構築

各発生段階の胚を 2% Paraformaldehyde (PFA)・1.25% Glutaraldehyde (GA) / 0.05 M リン酸緩衝液 (PB: Phosphate Buffer) 混合液で前固定し、1% 四酸化オスミウムで後固定した。固定後脱水し、エポキシ樹脂 (TAAB, エボン 812) に包埋した。ウルトラマイクロトームとダイヤモンドナイフ (DiATOME, histo jumbo 8.0 mm) で厚さ 200 nm の連続切片を切削し、基板 (導電処理済みスライドガラス) に回収した。光顕用として、1% トルイジンブルー染色を行った。トルイジンブルー染色標本をバーチャルスライドスキャナ (浜松ホトニクス, NanoZoomer) に取り込み、閲覧ソフトウェア (浜松ホトニクス, NDP view2) にて観察した。走査電子顕微鏡用として、1% 酢酸ウラン水溶液 (30 分) と硝酸鉛 (5 分) での電子染色を行った。セミインレンズ方式の超高分解能電界放出形 SEM (日立, SU8010) を用い対象細胞の反射電子 (BSE: Back Scattered Electron) 像を加速電圧 1.5 kV で連続撮影した。BSE 像を白黒反転することで透過電子顕微鏡 (TEM) の透過像と同様のコントラスト情報を取得した。Fiji ImageJ のソフトウェアを用いて、連続切片画像のアラインメントを施した。目的とする構造体を Adobe Photoshop を使用してライソソームや小胞体、ミトコンドリアなど目的の領域を選択した。3D Slicer ソフトウェアを用いてサーフェスレンダリング法にて 3D 再構築した。

### 免疫電子顕微鏡法

各発生段階の *Tg (fli1a:EGFP)*<sup>4)</sup> 胚を 4% PFA・0.05% GA / 0.1 M PB 混合液で前固定し、抗 GFP 抗体 (sc-9996, Santacruz; G1544, SIGMA) を用いて抗体反応を行った。発色前に 1% GA により再固定し、DAB 発色後 1% 四酸化オスミウムによる後固定を行い、脱水後エポキシ樹脂 (エボン 812, TAAB) に包埋した。ウルトラマイクロトーム (ULTRACUT-UCT、

Leica) で厚さ約 1  $\mu\text{m}$  の切片により光学顕微鏡で位置を確認した。ダイヤモンドナイフに替えて 60-90 nm の超薄切をグリッドに回収した。DAB 染色により抗原陽性細胞ではオスミウムブラックが形成され透過電子顕微鏡で黒く染まって見えるため、電子染色は硝酸鉛染色のみの単独染色を行い反応部位以外のコントラストはほとんど施さなかった。透過電子顕微鏡 TEM (H-7650、日立) を用いて撮影した。

## 結果

### 頭部血管芽細胞の出現時期

頭部の血管芽細胞になる予定の細胞は、ETS ファミリーの転写因子の一つ *etsrp* の mRNA 発現によって 5 体節期 (受精後 11.5 時間) に認められる<sup>9,10</sup>。ゼブラフィッシュの血管内皮細胞に蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック系統は複数作製されているが、ETS ファミリーの転写因子の一つ *fli1a* のプロモーターを用いた *Tg(fli1a:EGFP)<sup>fl</sup>* が、発現開始が早く、また発現量も多い<sup>5</sup>。蛍光実体顕微鏡で観察した場合、14 体節期 (受精後 16 時間) にはすでに数細胞からなるクラスターが認められた (Fig. 1A,D)。血管芽細胞のクラスターは、吻側は前脳と眼柄の間 (Fig. 1 矢頭)、尾側は前脳の側面 (Fig. 1 矢印) に分かれて、左右に対をなしていた。より早い 12 体節期 (受精後 15 時間) は蛍光実体顕微鏡では観察と撮影が難しいが、共焦点顕微鏡では認められた。18 体節期 (受精後 18 時間、Fig. 1B,E)、22 体節期 (受精後 20 時間 Fig. 1C,F) と発生が進むにつれてそれぞれのクラスターの細胞数が増加して、特に尾側は管腔形成が進んだ (Fig. 1D-F)。管腔が認められると、血管内皮細胞への分化が完了してい

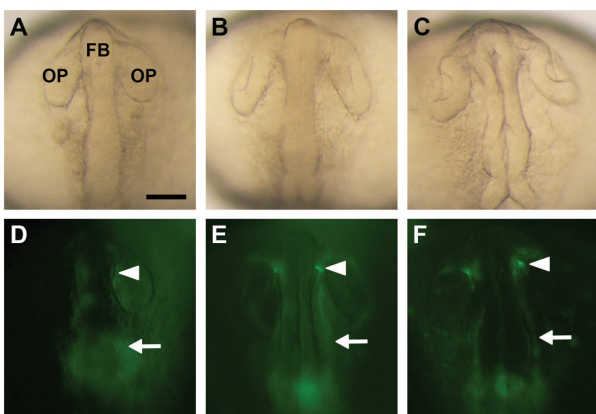


Fig. 1. Angioblasts of the developing zebrafish head. A-C. Transmitted light images of zebrafish at 14-(A), 18-(B), and 22-(C) somite stages. D-F. Fluorescent images of A-C. Arrows and arrowheads indicate anterior and posterior angioblast cluster, respectively, between optic lobe and forebrain. Dorsal views. Rostral is to the top. FB: forebrain, OP: optic lobe. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

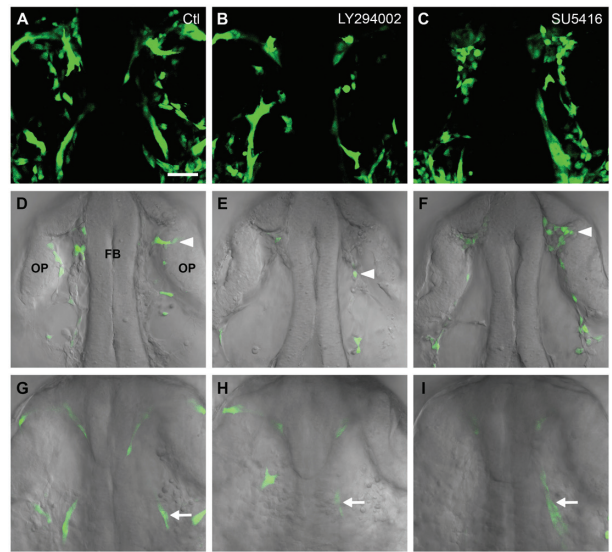


Fig. 2. Angioblast morphology in inhibitor treated embryos. A-I. Confocal images of the anterior head of 18 somite stage *Tg(fli1a:EGFP)<sup>fl</sup>* embryos treated with either control DMSO carrier (A,D,G), the PI3K inhibitor LY294002 (B,E,H), or the VEGFR inhibitor SU5416 (C,F,I). 3D reconstructed images (A-C). Selected dorsal planes show rostral GFP-positive clusters (D-F, arrowheads) and selected ventral planes show caudal GFP-positive clusters (G-I, arrows). Dorsal views. Rostral is to the top. FB: forebrain, OP: optic lobe. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

ることは確実である。ゼブラフィッシュ胚の血流開始は 30 体節期 (受精後 24 時間) 以降であるが 22 体節期にはこのようにすでに一部の血管は管腔形成が進んでいた。*Tg(fli1a:EGFP)<sup>fl</sup>* を用いた場合、遅くとも 12 体節期には蛍光観察ができること、また極めて短期間に細胞分化が進み管腔形成が進行することがわかった。

### 阻害剤による頭部血管発生への影響

血管内皮細胞増殖因子 VEGF ファミリーはその受容体 VEGFR ファミリーを介して脈管形成および血管新生に主要な役割を担っている。VEGF シグナルの刺激によってホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) が活性化され、その下流の Akt などの細胞内シグナル伝達が活性化される。ゼブラフィッシュの血管発生においても、VEGF シグナルと PI3K シグナルは重要な役割を担っている<sup>11,12</sup>。これらのシグナリングが頭部血管芽細胞の分化と脈管形成にどのように関与するか調べるため、VEGFR 阻害剤 (SU5416) および PI3K 阻害剤 (LY294002) を用いた。10 体節期に阻害剤処理を開始し、18 体節期に血管内皮細胞の観察を行った (Fig. 2)。胚全体の発生の明視野観察ではコントロール胚と差がなかった。共焦点顕微鏡観察では、コントロール胚では吻側および尾側両方のクラスター由来と思われる位置



に管腔が形成されているのを認めた (Fig. 2A,D 矢頭,G 矢印)。PI3K 阻害剤処理胚では吻側のクラスターの管腔形成が抑制された (Fig. 2B,D 矢頭,G 矢印)。VEGFR 阻害剤処理胚においても吻側のクラスターの管腔形成が抑制されていたが、さらに丸みを帯びた細胞が多く存在していた (Fig. 2C,F 矢頭,I 矢印)。血管芽細胞が未分化なまま増殖していることが示唆される。この分化異常は LY294002 に比べて SU5416 処理の方がより強く影響が出ていた。これらの結果から、頭部の血管芽細胞の最も初期の分化において VEGF シグナルと PI3K シグナルは関与しており、さらに、VEGF シグナルの下流に PI3K 以外のシグナルも併せて作用している可能性が示唆された。

### 連続切片 SEM 法の反射電子像による 3D 再構築

マウスなどの Array tomography 法に用いられる一般的な前固定液は、4% PFA・2.5% GA/0.1 M PB 混合液である<sup>13)</sup>。ゼブラフィッシュ成魚の組織から単離された初代培養細胞を用いた Array tomography 法では、前固定液として 4% PFA・4% GA/0.1 M PIPES 混合液が用いられている<sup>14)</sup>。しかし、ゼブラフィッシュ体節形成期のホールマウント胚では、細胞の形態および細胞内の微細構造が膨化や収縮などの影響を受けずに観察できる固定具合ではなかったため、適切な固定法を得るために条件検討を行った。緩衝液として、PB の他にカコジル酸およびリン酸緩衝生理食塩水を試験したが大きな差異は認めなかったため PB を採用した。続いて、PB の濃度について検討した。PB はマウスなどのほ乳類では通常 0.1 M で使用されるが、魚類胚では経験的に 0.01 M まで濃度を下げることがある。動物種や発生段階によって体液の浸透圧や組織の緻密さが異なるためである。ゼブラフィッシュ初期胚での至適濃度を調べるため、0.01、0.05、0.10 M の 3 種類の PB を用いて固定液を調整し比較をしたところ、明確な差異は認めなかった。また、固定試薬は混合せずに PB のみを初期胚の発生用培地として、卵膜を除去したゼブラフィッシュ胚を発生させたところ、0.10 M PB においてやや軽度の発生異常が見られた。これらの結果から、PB は 0.05 M を用いることとした。組織の密度が低くタンパク質が少ない初期胚では、4% PFA および 2.5% GA はともに強かったため、固定に影響が出ない濃度まで下げ、それぞれ 2% および 1.25% とした。また、固定は氷上にて 4 時間以上ゆるやかに振盪し、固定液のまま 4°C 保存した。固定標本の配送は冷蔵便を利用した。オルガネラの固定状況や細胞の形態を見ながらこのように固定液の条件検討をし、体節

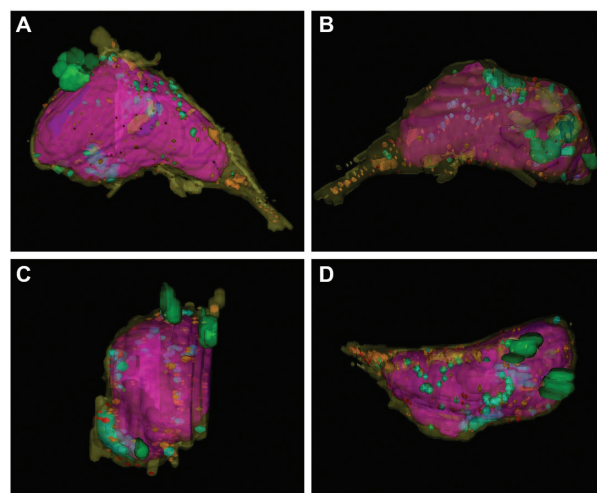


Fig. 3. 3D reconstruction of an endothelial cell in angulus venosus. A-D. Various angle views. 5 days post fertilization. Purple: nucleus, yellow: cytoplasm, green: lysosome, light blue: mitochondria, brown: ER, red: desmosome.

形成期から孵化仔魚までのゼブラフィッシュ胚では、3D 再構築法用として、2% PFA・1.25% GA/0.05 M PB 混合液で前固定することとした。

受精後 5 日のゼブラフィッシュ孵化仔魚の静脈角の内皮細胞の 3D 再構築画像を示す (Fig. 3)。赤紫で示した核が細胞の体積の大多数を占め、細胞質 (黄色) は少なかった。ライソソーム (緑) や小胞体 (茶色)、ミトコンドリア (水色) などの細胞小器官も少なかった。成熟分化した内皮細胞が細胞小器官に乏しいという知見<sup>1,2)</sup>と一致する。このように、内皮細胞の内部微細構造について形態的なアーティファクトなしに観察できることが確認でき、ゼブラフィッシュに最も適した固定条件を得ることができた。今後、この固定条件を用いて初期の未分化な内皮細胞の継時変化を観察および解析していく。

### 免疫電子顕微鏡法

血管トランスジェニック *Tg(fli1a:EGFP)<sup>yl</sup>* の観察から、初期胚の血管芽細胞の位置は推定できるが、管腔を形成していないため、蛍光識別できない切片上では判断が難しい。電子顕微鏡により観察する細胞が実際に血管芽細胞かどうかを特定するためには、免疫電顕用切片で蛍光を検出するか血管内皮細胞に発現するタンパク質の抗体を用いて染色するなどの必要がある。前述の 3D 再構築に用いた前固定液は、GA 濃度は 1.25% と低い、それでも EGFP の免疫染色において十分な染色が得られなかった。グルタルアルデヒドのタンパク質架橋作用が EGFP 抗原へ影響していると考えられる。そこで改めて条件検討し、免疫電顕用の固定として細胞の形態と微細構造を維持しつつ抗原も保持する濃度として GA 0.05%

と得た。一方で PFA の濃度を 4% に上げることで固定の強さを補った。したがって、体節形成期から 8 日目までの孵化仔魚に関しては、免疫電顕用として、4%PFA・0.05% GA/0.1 MPB 混合液で前固定することとした。前固定後、Array tomography 法と包埋前染色法(酵素抗体法)で比較した。前者は受精後 8 日以降の孵化仔魚には用いることができたが体節形成期の胚では形態も蛍光反応も十分な結果を得られなかったのに対し、後者は 12 体節期などの初期胚においても電子密度の高い沈殿として陽性シグナル(オスミウムブラック)を得ることができた。ただし、1 次抗体の反応には 7 日間の浸透を要した。

18 体節期のゼブラフィッシュ頭部切片の DAB 染色では、眼柄の内側、および、脳からやや離れた側方の眼柄の尾側の位置に抗 GFP 抗体で染色される細胞を複数認めた (Fig. 4A、矢頭)。これらの細胞局在位置は共焦点顕微鏡像と一致する (Fig. 2D,G 参照)。またその電子顕微鏡像においても陽性と判断できる十分な染色を得ることができた (Fig. 4B,C)。12 体節期および 18 体節期の血管芽細胞は、細胞質が多く丸みを帯び、典型的な未分化な細胞の形態を取っていることが確認できた。

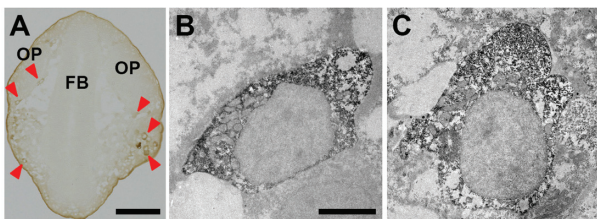


Fig. 4. Immunohistochemical staining and immunoelectron microscopy of zebrafish angioblast at the earliest stages. A. DAB staining of horizontal section of 18-somite stage *Tg(fli1a:EGFP)<sup>y1</sup>* embryo. Anterior is to the top. B, C. Anti-GFP staining by immunoelectron microscopy of *Tg(fli1a:EGFP)<sup>y1</sup>* embryo at 12-somite stage (B) and 18-somite stage (C). FB: forebrain, OP: optic lobe. Scale bars: 100  $\mu$ m in A, 4  $\mu$ m in B.

## 討論

血管内皮細胞に蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック魚として本研究では *fli1a* プロモーターの *y1* 系統を用いた<sup>5)</sup>。*fli1a* 遺伝子は血管内皮細胞以外にも、一部の血球・リンパ管内皮細胞・神経堤細胞・間充織細胞・マクロファージなどに発現することが報告されており、識別の難しい部位もあるためより適したトランスジェニック系統が必要である。血管内皮細胞への特異性が高いものとして *kdrl* プロモーターの系統も作製されているが<sup>15,16)</sup>、発現開始が遅いことと動脈に比べて静脈での発現が弱いことが血管芽細胞の分化の解析には難点である。*cdh5* (*VE-*

*cadherin*) は動静脈の差は無いが、発現開始は *fli1a* よりは遅い<sup>17)</sup>。より早くに発現を開始する遺伝子として *etv2* が挙げられ<sup>18)</sup>、血管芽細胞の分化の解析に有用かどうか検討する必要がある。同じ遺伝子のプロモーターを用いても、コンストラクトの性能や挿入されたゲノム環境により発現レベルも変化するため、allele 番号が異なる系統についても考慮する必要がある。

VEGFR 阻害剤および PI3K 阻害剤は、10 体節期から 18 体節期までの 4 時間作用させた。頭部の初期の血管芽細胞の分化に対して作用させるためにこの時期を選択したが、吻側の血管と尾側の血管で異なる結果を得た。この結果は、選択した時期が吻側の血管芽細胞クラスターの分化にとって最も重要な時期であった可能性を示唆する。また、VEGF-VEGFR シグナルは動脈化に関与することが知られているため、部位により応答が異なった可能性も考えられる。阻害剤を作用させた後に通常の胚用培地に戻して発生させることにより、個々の血管の分化に重要なタイミングを検索することが可能であると考えられる。VEGFR シグナルの阻害および PI3K シグナルの阻害において認められた丸みを帯びた血管芽細胞については、実際に未分化な状態が維持されているのか、または別の影響を生じているのか今後の検討が必要と考えられる。

電子顕微鏡解析では、標本の固定が極めて重要である。マウスで一般的に用いられている固定法がゼブラフィッシュ胚、孵化仔魚および成魚に適していなかったことから、さまざまな条件検討が必要であった。高い恒常性の保たれた羊水の中で発生する有羊膜類とは異なり、魚類など無羊膜類は卵膜を介して直接外界に触れていることから、一部の外的因子に対して浸透をあまり許さない表皮構造になっている可能性が考えられる。一方で、PFA および GA はともにタンパク質の固定に作用するため、タンパク質がまだ少なく脂肪組織の多い胚では、それぞれ濃度を上げて固定効果はあまり向上しないことが示唆された。不飽和脂肪酸が多いことも影響しているのではないかと考えられる。結果的に連続切片 SEM 法では PFA および GA は濃度を下げたものを採用することとなったが、同じゼブラフィッシュでも文献に見られる成魚の条件とも異なることから、発生段階や細胞の特性に合わせて固定条件を検討する必要があることがわかった。

Array tomography 法は、反射電子像による 3D 再構築も免疫電子顕微鏡像による 3D 再構築もいずれも可能であると謳われている。しかし、免疫電顕染色法において GA は除外したい成分であるが GA を

使用しないとゼブラフィッシュ胚の固定は不十分となり組織が崩れた。免疫組織染色用に改めて条件を検討しより良好なプロトコルを得ることができ、未分化な血管芽細胞の判別について確証を得ることができた。

ゼブラフィッシュ胚を用いて血管内皮細胞の初期分化を解析するにあたり、有用なトランスジェニック系統について検討および観察を行った。血管芽細胞の初期分化に関与する遺伝子の一端を明らかにした。血管芽細胞の形態変化を電子顕微鏡レベルで立体的に解析するための条件を検討した。今後さまざまな分化段階での形態学的特徴とその変化に関する遺伝子メカニズムを明らかにしていきたい。

## 謝辞

本研究は2017年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成(RIIS201712)を受けて行われました。電子顕微鏡解析は岩手医科大学生命科学研究技術支援センターにご協力いただきました。ご厚情に深く感謝申し上げます。

## 文献

- 1) Fawcett DW and Jensch RP (2002) *Concise Histology*. CRC Press, Florida.
- 2) 渡辺陽之輔, 小川和朗, 永野俊雄, 鈴木昭男, 清寺真 (1996) 人体組織学 (脈管、血液・リンパ系). 朝倉書店, 東京.
- 3) Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B and Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**: 253-310.
- 4) Fujita M (2017) Model organisms for research on vascular development: zebrafish and medaka. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **28**: 389-392.
- 5) Lawson ND and Weinstein BM (2002) In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* **248**: 307-318.
- 6) Wacker I and Schroeder RR (2013) Array tomography. *J Microsc.* **252**: 93-99.
- 7) 甲賀大輔 (2015) 連続切片 SEM 法. *Scientific Instrument News.* **58**: 5008-5014.
- 8) Westerfield M (2000) *The Zebrafish Book: A Guide for Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. University of Oregon Press, Oregon.
- 9) Sumanas S and Lin S (2006) Ets1-related protein is a key regulator of vasculogenesis in zebrafish. *PLoS Biol.* **4**: 60-69.
- 10) Pham VN, Lawson ND, Mugford JW, Dye L, Castranova D, Lo B and Weinstein BM (2007) Combinatorial function of ETS transcription factors in the developing vasculature. *Dev. Biol.* **303**: 772-783.
- 11) Zheng H, Fu G, Dai T and Huang H (2007) Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1a/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **50**: 274-280.
- 12) Fujita M, Cha YR, Pham VN, Sakurai A, Roman BL, Gutkind JS and Weinstein BM (2011) Assembly and patterning of the vascular network of the vertebrate hindbrain. *Development* **138**: 1705-1715.
- 13) 佐野 豊 (1981) 組織学研究法 (理論と術式). 南山堂, 東京.
- 14) Wacker I, Chockley P, Bartels C, Spomer W, Hofmann A, Gengenbach U, Singh S, Thaler M, Grabher C and Schröder RR (2015) Array tomography: characterizing FAC-sorted populations of zebrafish immune cells by their 3D ultrastructure. *J. Microsc.* **259**: 105-113.
- 15) Jin SW, Beis D, Mitchell T, Chen JN and Stainier DY (2005) Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish. *Development* **132**: 5199-5209.
- 16) Liu J, Fraser SD, Faloon PW, Rollins EL, Vom Berg J, Starovic-Subota O, Laliberte AL, Chen JN, Serluca FC and Childs SJ (2007) A bPix-Pak2a signaling pathway regulates cerebral vascular stability in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**: 13990-13995.
- 17) Lenard A, Ellertsdottir E, Herwig L, Krudewig A, Sauter L, Belting HG and Affolter M (2013) In vivo analysis reveals a highly stereotypic morphogenetic pathway of vascular anastomosis. *Dev. Cell.* **25**: 492-506.
- 18) Veldman MB and Lin S (2012) Etsrp/Etv2 is directly regulated by Foxc1a/b in the zebrafish angioblast. *Circ. Res.* **110**: 220-229.