

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 16 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究（C）一般

研究期間：2009～2012

課題番号：21580371

研究課題名（和文）

血管内皮細胞・周細胞相互陥入部を介した血管新生制御機構の三次元電顕免疫学的研究

研究課題名（英文）

Three-dimensional ultrastructural study of Endothelial cells and pericytes interdigitation in angiogenesis

研究代表者

和久井 信（WAKUI SHIN）

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：40201157

研究成果の概要（和文）：

ラット皮下に移植した polymer disc を in vitro で検討した。血管内皮細胞・周細胞相互陥入部 Endothelial cell and pericyte interdigitation は、血管新生初期に比較にして血管新生成熟期に有意にその数が増加すること、さらに、同時期に新生血管成熟を制御する Angiopoietin 1 が有意に発現増加を示すことを三次元電顕免疫学のおよび、タンパク・mRNA レベルで明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

Endothelial cells and pericytes play critical role in angiogenesis by the angiopoietin system. Endothelial cell and pericyte interdigitations (EPI), consisting of cytoplasmic projections of pericytes and corresponding endothelial indentations, are frequently present at angiogenic sites. Rats subcutaneous implantation of a thermoreversible gelation polymer discs were incubated in vitro 24-72hr. The capillary density increased to a peak on 48hr. A number of EPI were observed to a peak on 72hr. Serial sectioning electron microscopy immunohistochemical analysis revealed that Angiopoietin-1 localized at Pericytes and EPI. Quantitative RT-PCR analysis revealed that the level of Angiopoietin-1 increased on 72hr. The present study showed that the microvessel maturation might to be involved in the expression of EPI and Angiopoietin-1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
=総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：病理、血管新生制御

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

血管系は生体機能維持に必須だけでなく、癌・肉腫・動脈硬化・糖尿病性網膜症・関節リウマチなど多くの疾患を悪化させる為に、多くの血管新生制御因子が発表され「抗血管新生療法」が現在模索されている。しかし、血管新生制御因子は複雑な Crosstalk を示す為に、実用的な血管新生制御治療法は完成されていない。新生血管リモデリングは、既存血管からの新生血管内皮細胞増殖に始まり、周細胞による被覆という2種類の細胞群の密接な構築ステップを経て完成される。従来の解析法では、血管リモデリング時に血管内皮細胞・周細胞に作用して血管形成を調節する因子群と、それらに対応する血管内皮細胞・周細胞の受容体の発現についての解析は進められてきた。しかし、血管新生は血管新生制御因子の多くは血管以外の細胞（炎症性細胞・腫瘍細胞）から放出される為に、新生血管のみを単離解析する事は不可能と考えられてきた。従って緒因子の発現が血管内皮細胞・周細胞に作用した際、どのようなシグナル伝達系を介して、どのような遺伝子の発現を誘導し、血管形成を調節しているのかということについては *in vitro* モデル解析の結果からの考察であり、これが *in vivo* での血管新生機構の理解において重大な問題となっていた。従って *in vivo* 血管新生の検討には、新生毛細血管モデルが必須であった。血管新生は従来の実験動物の皮下にインプラント方法には多数の実験動物と長期にわたる実験期間が必要であったが、**Matric Gel** 内に新生血管を誘導形成させ、その形態を光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡を用いて検討し、この解析方法によって、人為的に添加した化学物質等の、血管新生への影響を形態学的に検討することが可能とすることができる。同法で **Matric Gel** 内に誘導形成された新生血管の血管内皮細胞・周細胞相互陥入部を三次元電顕免疫学的に検討してきる。

2. 研究の目的

本研究では、生体内における新生血管リモデリング時に多出する血管内皮細胞・周細胞質相互陥入 **Endothelial - Pericyte Interdigitation (EPI)** の出現と、両細胞における血管新生制御関連因子について三次元電顕免疫組織化学的・分子生物学的に検討する為に、血管新生制御を分子レベルで検討することができる研究方法を開発する。さらに、同法を用いて、**EPI** を介した血管新生制御機構を三次元電顕免疫学的に研究することを目的とする。

3. 研究の方法

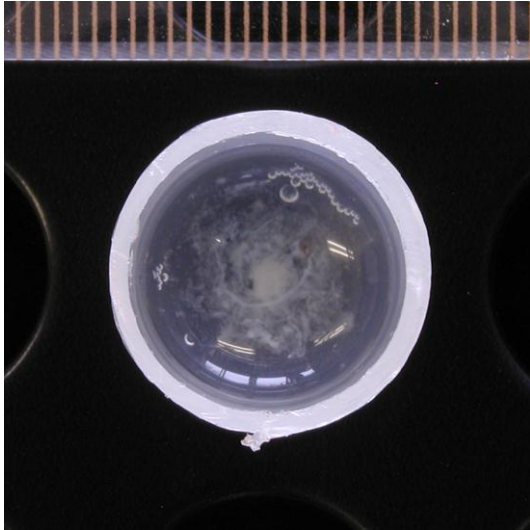
従来の実験動物の皮下にインプラント

Matric Gel 方法では新生血管のみを単離することは不可能であり然るに、新生血管における血管新生制御因子の分子レベルの検討は不可能であった。そこで、本研究者は、熱感受性培養ゲル **Thermoreversible Gel Angiogenic (TGA)** 法を開発した。実験動物（ラット）の皮下に **Thermoreversible Gel** をインプラント法を開発し **TGA** 解析法とした。熱可逆性ゲルポリマー **Thermoreversible Gelation Polymer (TG)** は 10°C 以下で水溶液状のゾル状態に、 25°C 以上でゲル状態になる特性を持つ細胞培養用培地である。 $25-27^{\circ}\text{C}$ 環境下で直径 **8mm** 厚さ **3mm** の **Gel-disc** を作製し無菌的にラット背部皮下に埋め込む。5日後に **disc** を摘出した後、**24** ウェルプレート底部に静置したのち、プレート内上部に **TG** に添加して重層培地を作製し、 37°C インキュベータ内で **3** 次元培養を行い、**24・48・72** 時間後に新生血管のみを単離して電顕三次元的解析を行い、また、**Angiopoietin-1** の発現分布について電顕免疫組織学的に検討した。さらに、一部の組織から **mRNA** を抽出した後、**RT-PCR** 法で **Angiopoietin-1 mRNA** の発現を検討する。**TGA** の特徴としては、**Disc** 内に進入する組織は **fibrovascular**（毛細血管・線維芽細胞・膠原線維）のみで、他の炎症性細胞は全く認められないことである。**TGA** 法は生体内で起きる新生血管の形成過程段階の血管内皮細胞と周細胞のみを単離培養し培養することで、新生血管の形態だけでなく発現する血管新生制御因子 **mRNA** を定量的に解析し、さらに、新生血管が発現する分子を網羅的に解析できる解析法である。

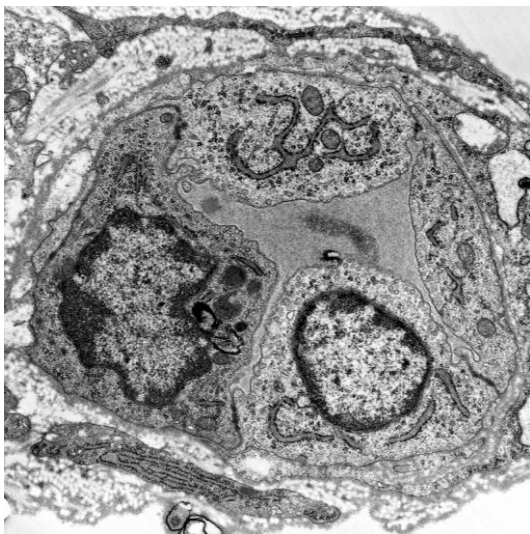
4. 研究成果

TGA 解析法から、単離培養した新生血管組織量は、単離後 **48** 時間で最大を示し、その後減数して、**72** 時間後では **24** 時間後よりも有意に少なく成った。これに対し **EPI** の発現は **72** 時間後で最高値を示した。このことから、**EPI** が新生血管の成熟に関与することが示唆された。しかし、培養組織の為に人工的技術的に壊死を示す細胞も多数あり、新生血管数の定量化はできなかった（図 1）。今後、**TG** からの新生血管単離法の改良の必要性が求められた。しかし、多くの組織は、生体内とほぼ同様の新生血管形態を示し、十分に電顕三次元的解析を行う為の標本として活用することができた（図 2）。また、新生血管では、**Angiopoietin-1** タンパクは新生血管周細胞に強く発現していたのに対し、新生血管内皮細胞ではほとんど発現は認められなかった（図 3）。さらに、**TG** 単離培養後、**24・48** 時間後の **Angiopoietin-1 mRNA** の発現は、生体

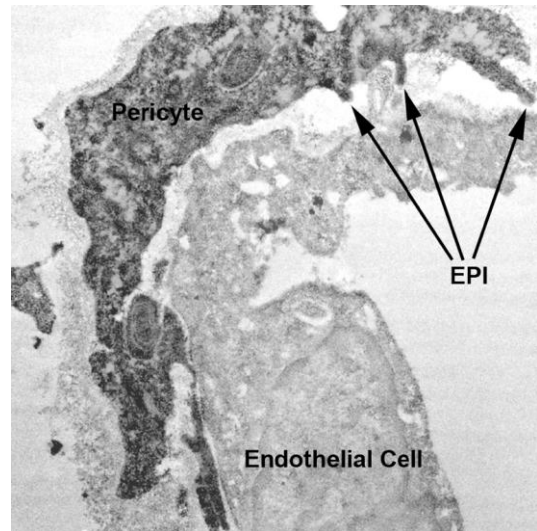
皮下の新生血管の発現レベルと比較した有意に低い値を示した (0.5 fold)。しかし、培養後 72 時間後では有意に上昇発現 (30 fold) が認められた。したがって、今回の TGA 解析法から、新生血管制御が EPI を介する Angiopoietin-1 の発現によって行われていることが示唆された (図 4)。



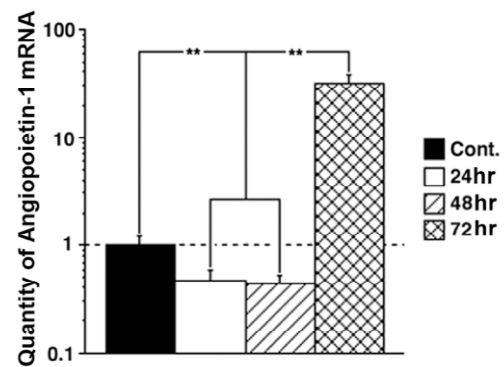
(図 1) 48 時間後の新生血管、固定的に置換し後の画像。



(図 2) 48 時間後に認められた新生毛細血管。血管内皮細胞と周細胞が認められ、管腔様構造も認められる。電位顕微鏡像



(図 3) 48 時間後に認められた新生毛細血管構成細胞における Angiopoietin-1 タンパクの発現分布。電顕免疫組織学像



(図 4) 48,48,72 時間後の Angiopoietin1 mRNA の発現レベル。RT-PCR 法

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 21 件)

① Wakui, S., Kobayashi, Y., Ishida, K., Motohashi, M. and Muto, T. In a Sprague-Dawley rat: Sertori-Leidig cell tumor of the testis. *J. Toxicol. Pathol.* (2009) 22: M55.

② Kobayashi, Y., Ishida, K., Motohashi, M., Muto, T. and Wakui, S. Rats prenatally 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB126) Modulate ERK and ERα expression in N-nitrobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP) induced lung carcinogenesis. *J. Toxicol. Pathol.* (2009) 22: M 18.

③ Wakui, S., Muto, T., Motohashi, M.,

- Kobayashi, Y., Suzuki, Y., Shirai, M., Takahashi, H. and Hano, H. Testicular spermiation failure in rats exposed prenatally to 3,3',4,4',5'-pentachlorobiphenyl. *J. Toxicol. Sci.* (2010) 35: 757~765.
- ④Ishida, K., Muto, T., Motohashi, M., Kobayashi, Y., Imai, K. and Wakui, S. LAT1 antagonists suppressed N-methyl-N'-nitrosoguanidine induced rat gastric carcinogenesis. *J. Toxicol. Pathol.* (2010) 23: M43.
- ⑤Motohashi, M., Muto, T., Ishida, K., Kobayashi, Y., Imai, K. and Wakui, S. Male-female rats gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitrosoguanidine phthalate. *J. Toxicol. Pathol.* (2010) 23: M56.
- ⑥Kobayashi, Y., Muto, T., Ishida, K., Motohashi, M., Imai, K. and Wakui, S. Lung and testicular development in rats with prenatal perfluorooctane-sulfate exposure. *J. Toxicol. Pathol.* (2010) 23: M56.
- ⑦Wakui, S., Muto, T., Motohashi, M., Kobayashi, Y., Suzuki, Y., Takahashi, H. and Hano. Testicularspermiation failure in rats exposed prenatally to 3,3',4,4',5'-pentachlorobiphenyl. *J. Toxicol. Sci.* (2011) 35: 757-765.
- ⑧Wakui, S., Imai, K., Mtohashi, M., Kobayashi, Y., Tanaka, I., Nishimoto, T., Sato, T., Muto, T., Takahashi, H. and Hano, H. Mrophometorical analysis on preneoplastic cellular nuclei in BBN induced rat bladder carcinogenesis. *J. Toxicol. Pathol.* (2011) 24: M64.
- ⑨Imai, K., Ochiai, M., Hippo, Y., Igarashi, M., Wakui, S. and Nakagama, H. MicroPNA changes induced by heterocyclic amines and its significance in the early satges of colon charcinogenesis. *J. Toxicol. Pathol.* (2011) 24: M60.
- ⑩Wakui, S., Motohashi, M., Muto, T., Takahashi, H., Hano, H., Jutabha, P., Anzai, N., Wempe, M.F. and Endou, H. Sex-associated difference in estrogen receptor β expression in N-methyl-N'-nitro-N'-nitrosoguanidine-induced rat gastric cancers. *Comparative. Med.* (2011) 61: 1~7.
- ⑪Motohashi, M., Wakui, S., Muto, T., Suzuki, Y., Shirai, M., Takahashi, H. and Hano, H. Cyclin D1/cdk4, estrogen receptors α and β , in N-methyl-N'-nitro-N'-nitrosoguanidine-induced rat gastric carcinogenesis: immunohistochemical study. *J. Toxicol. Sci.* (2011) 36: 373~378.
- ⑫Wakui, S., Muto, T., Anzai, N., Takahashi, H., Jutabha, P., Sakata, A., Wempe, M.F., Hano, H. and Endou, H. In vitro thermoreversible gel disc quantitative assay of rat angiogenesis. *AATEX.* (2011) 16: 59~65.
- ⑬Wempe, M.F., Quade, B., Jutabha, P., Iwen, T.J., Frick, M.F., Rice, P.J., Wakui, S. and Endou, H. Human uric acid transporter 1: an inhibitor structure-activity relationship study. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* (2011) 30:1312~1323.
- ⑭Anzai, N., Wakui, S., Jutabha, P., Muto, T., Hayashi, M., Hayashi, K., Domae, M., Uchida, K., Wempe, M.F. and Endou, H. Human drug transporter gene-expressing cells are useful alternatives to predict pharmacokinetics in man. *AATEX.* (2011) 16: 66~73.
- ⑮Jutabha, P., Anzai, N., Wempe, M.F., Wakui, S., Endou, H. and Sakurai, H. Apical voltage-driven urate efflux transporter NPT4 in renal proximal tubule. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* (2011) 30:1302~1311.
- ⑯Wempe, M.F., Rice, P.J., Lightner, J.W., Jutabha, P., Hayashi, M., Anzai, N., Wakui, S., Kusuhara, H., Sugiyama, Y. and Endou, H. Potent hURAT1 inhibitors: in vitro and in vivo metabolism and pharmacokinetic studies. *Drug Design, Develop, Therapy.* (2011); 30: 3112-3113.
- ⑰Wakui, S., Mtohashi, M., Imai, K., Kobayashi, Y., Tanaka, I., Nishimoto, T., Sato, T., Muto, T., Takahashi, H. and Hano, H. Mrophometorical analysis on preneoplastic cellular nuclei in BBN induced rat bladder carcinogenesis. *J. Toxicol. Pathol.* (2012) 25: M15.
- ⑱Wakui, S., Muto, T., Suzuki, Y., Takahashi, H. and Hano, H. Sertoli cells proliferate in adult rats with prenatal exposure to 3,3',4,4',5'-pentachlorobiphenyl. *Arch. Toxicol.* (2012) 86: 159~162.
- ⑲Wempe, M.F., Rice, P.J., Lightner, J.W., Jutabha, P., Hayashi, M., Anzai, N., Wakui, S., Kusuhara, H., Sugiyama, Y. and Endou, H. Metabolism and pharmacokinetic studies of JPH203, an L-amino acid transporter. *Drug Metab. Pharmacokineti.* (2012) 27: 155~161.
- ⑳Wempe, M.F., Rice, P.J., Lightner, J.W., Jutabha, P., Hayashi, M., Anzai, N., Wakui, S., Kusuhara, H., Sugiyama, Y. and Endou, H. Potent hURAT1 inhibitors: in vitro and

in vivo metabolism and pharmacokinetic studies. Drug Design, Development and Therapy (2012) 6: 323-339

②Wakui, S., Takahashi, H., Muto, T., Shirai, M., Jutabha, P., Anzai, N., Wempe, M.F. Kansaku, N., Hano, H., Inomata, T. and Endou, H. Atypical Leydig cell hyperplasia in adult rats with low T and high LH induced by prenatal di(n-butyl) phthalate exposure. Toxicol. Pathol. (2013) 41: 480-486

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕無し

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和久井信 (WAKUI SHIN)
麻布大学・獣医学部・准教授
研究者番号：40201157

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し