

平成 30 年 9 月 12 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25450473

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)Thermoreversible gel disc assay of rat 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞・周細胞相互陥入部Endothelial cell and pericyte interdigitation (EPI)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を本研究者はラット実験肉芽組織モデルを用いて三次元電顕免疫学的に証明した。さらに、EPIでは血管新生因子の受容体は周細胞側に発現すること、さらに内皮細胞の増殖阻害因子が発現することを三次元電顕免疫学的に証明した。この結果から、EPIが血管新生制御機構に於いて新生血管の増加よりも、新生血管数の選択的維持に関与することを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Endothelial cells and pericytes play critical role in angiogenesis, which is controlled, in part, by the angiopoietin (Ang)/Tie-2 system and vascular endothelial growth factor (VEGF). Endothelial cell and pericyte interdigitations(EPI), consisting of cytoplasmic projections of pericytes and corresponding endothelial indentations, are frequently present at angiogenic sites. After subcutaneous implantation of a thermoreversible gelation polymer disc in rats, the capillary density was low on day 5, increased to a peak on day 7, and then decreased on days 10-20. A small number of EPI were observed on day 5, then increased sharply to a peak on day 10, but had decreased on day 20.

研究分野：微小循環学

キーワード：血管新生 微小循環学

1 (研究開始当初の背景)

ラットに熱可逆性ゲルポリマーを無菌的にインプラントし、同ゲルポリマー内にラットの毛細血管を誘導する。その後、新生毛細血管を構成する血管内皮細胞と周細胞の変化動態について三次元超微形態学的に検討を行うことで、血管の新生メカニズムを解明することを目的として研究を行ってきた。本検討では、1) 悪性腫瘍の血管熱感受培養ゲル Thermoreversible Gel Disc Angiogenesis (TGA) の検討方法を改良した。BBN 誘発ラット膀胱癌インプラント熱感受培養ゲル Thermoreversible Gel Disc Angiogenic (TGA) の作製に初めて成功した。2) TGA 法で新生血管の安定増殖を確認した。その後、血管新制度と血管内皮細胞・周細胞質相互陥入 Ednothelial Pericyte Interdigitation (EPI) 等に関して三次元電顕免疫組織化学的・分子細胞学的解析を行い、血管新生制御における EPI system における Cross-talk について考察した。さらに、移植後 5,7 日後の disc の器官培養した毛細血管における (Ang-1,2)/Tei2 の発現分布の変化を試みた。3) ラット BBN 誘発膀胱癌モデルを作成し、乳頭状膀胱癌を対象として TGA を検討した。内径 2mm 長さ 3mm のチューブ内に Thermoreversible Gel を注入した後、チューブの編端は非溶解性血管培養ゲル (matori Gel) で塞ぎ Thermoreversible Gel の流出を防止した新たな TGA (TG-1) を考案作成した。ラット膀胱癌に (TG-1) を医用接着剤でインプラントした後、10 日後に TG-1 を無菌的に生体外に摘出して TG-1 の器官培養を行った。

2 (研究の目的)

三次元マトリックス・ジェルは培養マトリックスとして開発されたジェルである。特性として、低温では流動性水溶性を示す。これに対し室温以上では流動性を示さない固形のハイドロゲルとなることが報告されている。すなわち、ハイドロゲル状態で各種細胞増殖因子・抑制因子を添加することが可能である。さらに、この変化は温度変化に対応するものであり、可逆的に繰り返し行うことができる。さらに、ジェル内において各種細胞が増殖可能であることから、ラット皮下に埋設することで周囲の生体に既存の血管構成細胞がジェル内に発育進入することが想定され、本検討ではこのジェル内で新生血管が発育進展することを確認するとともに、マトリックス・ピル作成のためジェル濃度の成作条件設定を変動させることから、新生血管の検討のための新規実験肉芽組織形成のモデルとして使用するための条件設定を行った。凍結乾燥したメビオール・ジェルの培養液希釈倍率を変化させた。その結果、等倍希釈で作成したマトリックス・ピルに最も多くの新生血管を確認することができた。本検討から、三次

元超微形態学的検討に最適な希釈倍率が明らかとなった。本検討では、N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine 誘発ラット膀胱癌組織内にマトリックス・ピルを無菌的に埋没させ、新生血管のマトリックス・ピル内への誘導させたのちに、生体外に摘出して、培養することから新規実験肉芽組織形成のモデル開発の検討を行った。しかし、この条件で作成したマトリックス・ピルから poly(A+)RNA を抽出したところ、希釈倍率に逆相関的に抽出率は低下を示したことから、希釈倍率をさらに厳密に調整し最適なマトリックス・ピルの生体内維持時間など作成条件設定を行った。

3 (研究の方法)

ラット膀胱癌インプラント熱感受培養ゲル Thermoreversible Gel Disc Angiogenic (TGA) の作製に世界で初めて成功した。その後、生体外に摘出して Thermoreversible Gel (TG) を用いて器官培養を行い、新生血管の安定増殖を行った。本年度までに、膀胱癌 TGA 解析法はほぼ確定することができた。その後、血管新制度と血管内皮細胞・周細胞質相互陥入 Ednothelial Pericyte Interdigitation (EPI) 等に関して三次元電顕免疫組織化学的・分子細胞学的解析の条件設定を行った。本検討では TGA 解析法を改良して、10 以下で水溶液状のゾル状態に、25 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、ラット膀胱癌インプラント熱感受培養ゲル Thermoreversible Gel Disc Angiogenic (TGA) を用いて三次元電顕免疫組織化学的解析を行えた。さらに、25-27 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 TGA を行った。

4 (研究成果)

血管内皮細胞・周細胞相互陥入部 Endothelial cell and pericyte interdigitation (EPI) 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を本研究者はラット実験肉芽組織モデルを用いて三次元電顕免疫学的に証明した。さらに、EPI では血管新生因子の受容体は周細胞側に発現すること、さらに内皮細胞の増殖阻害因子が発現することを三次元電顕免疫学的に証明した。この結果から、EPI が血管新生制御機構に於いて新生血管の増加よりも、新生血管数の選択的維持に関与することを示唆した。しかし、安定した器官培養結果が得られたが、血管抽出量が少なく分子細胞学的検討は行えなかった。

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)

1. Okayama, Y., Wakui, S., Sugiyama, M., Mutou, T., Takahashi, H., Wempe, MF., Kume, E., Ikegami, M., In utero exposed to di(n-butyl) phthalate induce morphological and biochemical changes in rats postpuberty. *Toxicol. Pathol.* (2017) 45:526-535.

2. Kume, E., Okayama, Y., Sugiyama, M., Takahashi, H., Mutou, T., Wempe, MF., Ikegami, M., Wakui, S. Quantitative morphometric analysis of vimentin filaments in Sertoli cells of rats after in utero DBP exposure. *Fundament. Toxicol.* (2017) 4:1-10

3. Kume, E., Mutou, T., Kansaku, N., Takahashi, H., Wempe, MF., Ikegami, M., Kani, Y., Endou, H., Wakui, S. Ultrastructural immunohistochemical study of L-type amino acid transporter 1-4F2 heavy chain in tumor microvasculature of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) Nitrosamine (BBN) induced rat bladder carcinoma. *Microscopy* (2017) 1-6

4. Motohashi, M., Wempe, MF., Mutou, T., Takahashi, H., Kansaku, N., Ikegami, M., Inomata, T., Asari, M., Wakui, S. Male rats exposed in utero to di(n-butyl) phthalate: age-related changes in Leydig cell smooth endoplasmic reticulum and testicular testosterone-biosynthesis enzymes/peptides. *R. Reprod. Toxicol.* (2016) 5

Motohashi, M., Wempe, MF., Mutou, T., Takahashi, H., Ikegami, M., Inomata, T., Asari, M., Wakui, S. In utero-exposed di(n-butyl) phthalate induce dose dependent, age-related changes of morphology and testosterone-biosynthesis enzymes/associated proteins of Leydig cell mitochondria in rat. *J. Toxicol. Sci.* (2016) 41:195-206

6. Motohashi, M., Wakui, S., Takahashi, H., Mutou, T., Yoshida, A., Inomata, T., Asari, M., Ikegami, M., Adenocarcinoma of the ampullary glands of the ductus deferens in a Sprague-Dawley rat. *Toxicol. Pathol.* (2015) 43:593-599

7. Wakui, S., Motohashi, M., Inomata, N., Kansaku, N., Mutou, T., Takahashi, H., Ikegami, M., Asari, M., Three-dimensional reconstruction of deferent ducts papillae in urogenital duct system of the male rat. *The Prostate* (2015) 45:285-290

8. Motohashi, M., Inomata, T., Ichihara, N., Kansaku, N., Mutou, T., Takahashi, H., Ikegami, M., Asari, M., Wakui, S. Three-dimensional study of terminal portion in Sprague-Dawley rat ejaculatory ducts. *Ant. Histo. Embryol.* (2015) 45:285-290

9.

Wakui, S., Mutou, T., Takahashi, H., Ikegami, M., Wanibuchi, H., Fukushima, S., Vascular endothelial growth factor mRNA as a biomarker on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine induced rat bladder carcinogenesis. *J. Appl. Toxicol.* (2014) 35:181-190

10. Wakui, S., Shirai, M., Motohashi, M., Mutou, T., Oyama, N., Wempe, MF., Takahashi, H., Inomata, T., Ikegami, M., Endou, H., Asari, M., Effect of in utero exposure to di(n-butyl) phthalate for estrogen receptor alpha, beta, and androgen receptor of Leydig cell on rats. *Toxicol. Pathol.* (2014) 42:877-887

11. Wakui, S., Takahashi, H., Mutou, T., Shirai, M., Jutaha, P., Anzai, N., Wempe, MF., Kansaku, N., Hano, H., Inomata, T., 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

12. Shirai, M., Wakui, S., Wempe, MF., Mutou, T., Oyama, N., Motohashi, M., Takahashi, H., Kansaku, N., Inomata, T., Hano, H., Endou, H., Male Sprague-Dawley rats exposure to in utero di(n-butyl) phthalate: dose dependent and age-related morphological change in Leydig cells smooth endoplasmic reticulum. *Toxicol. Pathol.* (2013) 41:984-991

13. Wakui, S., Motohashi, M., Satoh, T., Shirai, M., Muto, T., Takahashi, H., Wempe, MF., Endou, H., Inomata, T., Asari, M., Nuclear morphometric analysis of Leydig cells of male pubertal rats exposed in utero to di(n-butyl) phthalate. *J. Toxicol. Pathol.* (2013) 26:439-446

{ 雑誌論文 } (計 13 件)

{ 学会発表 } (計 0 件)

{ 図書 } (計 0 件)

{ 産業財産権 }

出願状況 (計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:
 国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
 発明者:

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

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

(4)研究協力者 無し