

令和 2 年 6 月 14 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01382

研究課題名（和文）微小血管形成過程に及ぼす電磁界修飾作用のin vivoイメージングによる解明

研究課題名（英文）Intravital microscopic observation of modulatory actions of the angiogenesis under static magnetic field exposure

研究代表者

増田 宏（Masuda, Hiroshi）

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10321861

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：再生医学研究の進展にともない再生過程の組織・臓器に酸素や栄養を補給する微小血管の役割が重要視され、その形成過程や促進因子の解明が進められていることから、本研究では、従前研究で開発したin vivoイメージング法に改良を加えることで、C57BL/6NCrSlcマウスの生体内部に形成される微小血管を直視的かつ経時的に観察する方法を確立した。次に、血管形成過程への関与が強く示唆されている電磁界の修飾作用を調査し、血管形成促進作用を示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本観察システムが構築されたことにより血管形成のライブ観察像が得られるとともに、形成過程のタイムコースを同一個体で追跡可能となった。今後、今回の研究だけでなく各種化学的因子の評価など、他の研究における応用可能性を期待できる。また、本実験において生体内の微小血管形成に対する電磁界の関与を示唆するデータが得られた。今後さらに研究を進めることで、再生医学や治療に対する応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Angiogenesis is known to be an important step for bone formation and wound healing. To observe dynamic changes in the angiogenic process under exposure to a static magnetic field, we improved on the traditional closed cranial window method for C57BL/6NCrSlc mice. The improved method allowed for in vivo and repeated imaging of the angiogenesis in mouse brains under the exposure at 80 mT of static magnetic field for about one month. The angiogenic process at early stages seemed to be accelerated with the exposure, although further investigations were required.

研究分野：微小循環

キーワード：微小血管形成 イメージング 電磁界

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究は、次に示す 2 つの側面、「再生医学研究の発展」および「物理的因子の医学的応用」におけるニーズを背景として計画した。

(1) 再生医学分野における微小血管形成研究の重要性

昨今の再生医学研究の進展にともない再生組織・臓器における微小血管形成メカニズムの解明が待たれている。分化誘導された細胞が組織・臓器を形作るために次に必要となるのは酸素や栄養を自らに補給する微小血管である。事実、血管を形作る内皮細胞を iPS 細胞由来軟骨細胞と共培養することで、これまで困難と言われていた軟骨再生が動物実験レベルで可能となっている (Takebe et al., *J Clin Invest*, 2014)。さらに同発想は、軟骨だけでなく骨組織や肝臓、膵臓の形成でも有用であることがわかってきた (Takebe et al., *Nature*, 2014)。したがって、微小血管の形成メカニズムおよびこれを促す因子を解明することが再生医学研究のさらなる発展に役立つと期待される。

(2) 微小血管形成に対する物理的因子の有効性

微小血管の形成や血行動態に対して物理的因子、中でも「電磁界」の有効利用が期待されている。電磁界は既に骨再生促進治療に使われているが (Bassett et al., *Science*, 1974)、この促進作用に血管形成の関与が示唆されている。一方、電磁界が血管病変にも深く関わるアルツハイマー症状を改善することも動物実験で分かってきた。開発が複雑かつ高価な薬剤などの化学的因子に比べ、物理的因子である電磁界は容易かつ安価に発生できる。しかも体外から体内に向けて非侵襲的に照射可能であることから、各種疾患に対する治療応用を視野に国内外で基礎研究が始まっている。

2. 研究の目的

再生医学研究の進展にともない再生過程の組織・臓器に酸素や栄養を補給する微小血管の役割が重要視され、その形成過程や促進因子の解明が進められていることから、本研究ではまず、従前研究で開発した *in vivo* イメージング法に改良を加えることで、生体内に形成される微小血管を直視的かつ経時的に観察する方法の確立を目的とした。次に、本手法を用いて未だ直視的解明の進んでいない創傷治癒部位における微小血管形成過程を調査し、この形成過程への関与が強く示唆され、治療応用が期待されている物理的因子「電磁界」の修飾作用を探索することとした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

本研究では 8 週齢の雄性 C57BL/6NcrSlc マウスを用いた。実験動物は、室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、明暗が 12 時間ごとに制御されたクリーンルーム内にて飼育し、固形飼料は自由給餌、水は自由給水にて与えた。実験動物には手術および観察の間、吸入麻酔を施した。麻酔薬としてイソフルランと酸素の混合麻酔ガスを用いた。濃度約 80%の酸素をキャリアーガスとし、処置に応じて 2~3%のイソフルランを流量 500 mL/min で吸入させた。麻酔した実験動物はアクリル製脳定位固定治具に保定した。さらに深部体温を一定に保つためにプレート型ヒーターを下腹部に配置した。なお、本動物実験は久留米大学動物実験委員会の承認を得て実施されたものである。

(2) クラニアルウィンドウ法

クラニアルウィンドウ法は我々がラット脳軟膜微小循環観察用に以前開発した手法をマウス用に一部改良した。麻酔下の実験動物頭頂部皮膚を切開し、結合組織および骨膜、頭頂部頭蓋骨を取り除いた。頭頂骨の円形穴にガラス window をかぶせてシアノアクリレート系接着剤にて固定した。

(3) 静磁界ばく露

静磁界ばく露は実験動物頭頂部にネオジウム永久磁石を埋め込み施した。磁石は形状およびサイズ、重量の異なったものを何種類か用意し、動物の頭頂部に埋め込んだ。パイロットスタディで用いた磁石の表面およびクラニアルウィンドウ内の最大磁束密度はそれぞれ 360 mT および 80 mT であった。なお、偽ばく露を施す実験動物には磁気を帯びていないダミー磁石を用いた。

(4) 血管の *in vivo* イメージング

静磁界ばく露中のクラニアルウィンドウ内の血管新生過程は生体顕微鏡的に観察した。イソフルラン麻酔下の実験動物頭部を脳定位固定装置に固定し、実体顕微鏡下に配置した。実体顕微鏡により観察された血管像はカメラにより撮影・解析した。

4. 研究成果

(1) in vivo イメージングシステム構築

本研究を実施する上で最も要となる in vivo イメージング法をおおむね構築できた。当方が有する一般的な蛍光顕微鏡で血管形成を観察する場合、解像度や深度等に制限があり、定性評価はもとより、定量評価も難しかった。そこで、2種類のモジュールを新たに導入しこの問題を克服することに成功した。

そのひとつは、共焦点モジュールである。別途資金協力を受け既存の蛍光顕微鏡に共焦点システムを導入することでこれを達成した。この共焦点システムには3色のレーザーが組み込まれているため、観察対象において3種類の蛍光色素で標識した細胞等を3次的に評価可能となった。これにより血管形成過程の追跡に不可欠な3次元解析が可能となった。

そしてもうひとつが連続光顕観察モジュールである。同モジュールの導入により細胞レベルの微細な挙動までオールカラーで直視的に観察可能となった。

以上のモジュールから取得できる情報は、細胞と血管のインタラクションを詳細に評価する上でも非常に有用であり、研究を今後実施する上でも貢献できるものと考えている。

(2) 微小血管形成モデル構築

微小血管形成観察法の確立に着手し、その形成過程を時系列で追跡できることを確認した。骨形成時の微小血管形成をターゲットとして選択し、これを惹起させる方法について検討した。以前より骨形成を観察する場合は大腿骨または頭蓋骨をくり抜く方法が用いられてきたが、施術後の経時的/経日的観察を考慮するとアクセスが容易な頭蓋骨をターゲットとする後の方が有用である。最近の in vivo 研究でもこちらが主流となっていることから、我々もこの方法を採用した。本方法に対しては、くり抜く穴のサイズや深さなどによって、骨形成が成立しない場合がある。そこで施術の条件検討も実施した。その結果、至適条件を見つけ、良好な骨形成像およびその過程における微小血管形成を惹起させることに成功した。

(3) 微小血管形成過程の in vivo イメージング

上記方法で惹起された微小血管形成を in vivo イメージング法を用いて観察できるよう観察系に改良を加えた。光源や固定方法等、種々の問題が生じたため、最適の組み合わせとなるように検討を重ね、マウス体動によるブレを軽減した観察像が得られるようになった。

本方法を用いたところ、同一部位の血管形成過程を約ひと月にわたり経日的に観察可能であることを確認できた。埋め込み後1日目では既存の脳軟膜血管網だけが観察されており、その他の血管は認められない。これに対し埋め込み14日後のウィンドウ内では新生された血管が網状構造を構築し、さらに静止画では示せないが微小循環動態も確認できた。

以上の結果は、血管形成および血管網の3次元構築を静磁界ばく露環境下においても経日的に観察できることを示している。しかも、血管運動をはじめとする微小循環動態パラメータに対する静磁界ばく露影響を評価できる有用性も併せ持つことを示せた。

本方法については、今回の研究だけでなく各種化学的因子の評価など、今後他の研究における応用可能性を期待できる。

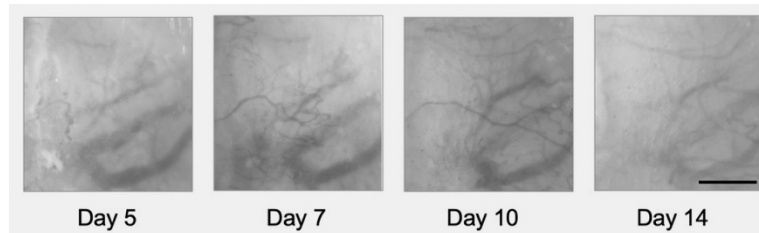


図1 微小血管形成の経日的観察 (Bar: 0.5 mm)

(4) 静磁界の修飾作用

前述の一連の手法を用いて微小血管形成過程への静磁界ばく露影響について調査した。マウスに対する静磁界ばく露処置および偽ばく露処置はそれぞれ永久磁石とダミー磁石の埋め込みにより行った。その結果、血管形成の初期段階において静磁界ばく露による形成促進作用が観察された。しかしながら、その後もばく露と観察を続けたところ、双方の差異は不明瞭となった。以上の結果から、静磁界ばく露は血管新生過程の早期段階にのみ影響を及ぼすという可能性が示唆された。今後、観察インターバルなどを調整し更なる調査を進めることで、再生医学や治療に対する応用が期待できる。

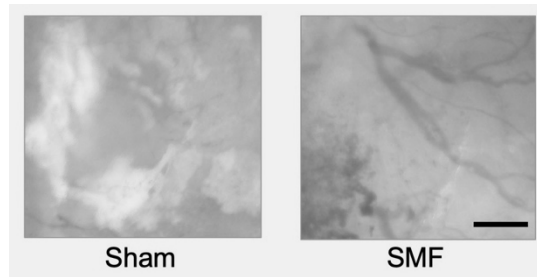


図 2 微小血管形成に及ぼす静磁界の影響 ばく露 10 日後における観察像. Sham:偽ばく露. SMF:静磁界ばく露. (Bar: 0.5 mm)

<引用文献>

- ① Takebe T, Kobayashi S, Suzuki H, Mizuno M, Chang Y-M, Yoshizawa E, Kimura M, Hori A, Asano J, Maegawa J, Taniguchi H. Transient vascularization of transplanted human adult-derived progenitors promotes self-organizing cartilage. *J Clin Invest* 124: 4325-4334, 2014.
- ② Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, Zhang R-R, Ueno Y, Zheng Y-W, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 499: 481-484, 2013.
- ③ Bassett CA, Pawluk RJ, Pilla AA. Augmentation of bone repair by inductively coupled electromagnetic fields. *Science (New York, NY)* 184: 575-577, 1974.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroshi MASUDA, Akiko NAGAI, Akimasa HIRATA, Yoshitaka MORIMATSU
2. 発表標題 Intravital microscopical exploration of modulatory actions of static magnetic field exposure on in vivo angiogenesis
3. 学会等名 第44回日本微小循環学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Masuda, Akimasa Hirata, Akiko Nagai, Itsuki Kageyama, Yoshitaka Morimatsu, Tatsuya Ishitake
2. 発表標題 Intravital microscopic observation of modulatory actions of the angiogenesis under static magnetic field exposure
3. 学会等名 BioEM2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平田 晃正 (Hirata Akimasa) (00335374)	名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (13903)	
研究分担者	森松 嘉孝 (Morimatsu Yoshitaka) (40320163)	久留米大学・医学部・准教授 (37104)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	永井 亜希子 (Nagai Akiko) (40360599)	愛知学院大学・歯学部・准教授 (33902)	