

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007~2008

課題番号：19790588

研究課題名 (和文) 胎生期大動脈由来 Sca-1 陽性細胞の腎内皮障害に対する有用性

研究課題名 (英文) The role of embryonic dorsal aorta Sca-1 positive cells in the renal endothelial regeneration

研究代表者 伊藤 千春 (ITO CHIHARU)

自治医科大学医学部・助教

研究者番号：00424010

研究成果の概要：

マウス胎児背側大動脈由来Sca-1陽性細胞 (EASCA1C) が、腎糸球体内皮修復に関与するかどうかの検討を行った。コラゲナーゼ処理背側大動脈初代培養後、胎児大動脈由来Sca-1陽性細胞を分離抽出した。EASCA1Cの内皮細胞への分化条件を、*in vitro*で検討したが、内皮細胞への分化は観察できなかった。

なお、マウス摘出背側大動脈3次元培養下の萌芽血管新生における、TGF- β の役割についても検討した。低酸素下、VEGF添加にて、コラーゲンゲル3次元培養下での管腔形成が促進し、TGF- β で阻害されることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000		1,600,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	360,000	3,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 腎臓内科学

キーワード：背側大動脈, stem cell antigen-1

1. 研究開始当初の背景

腎糸球体内皮障害は、糸球体腎炎・血管炎・血栓性微小血管障害・移植腎拒絶などの腎障害の初期変化として認識され、内皮の組織学的障害の程度は腎障害の進行に大きくかわる。一旦惹起した内皮障害の程度が初期の状態に留まれば、内皮の裏打ち構造が自然修復される。また、組織学的に内皮細胞増殖・血管新生促進因子の発現増強・血管新生

に伴う形態的变化等、内皮修復を示唆する現象が、修復過程にある実験腎炎において観察される。一方進行性腎障害では血管新生因子の発現低下・血管新生抑制因子の発現増強がみられる。血管内皮増殖因子(VEGF)が糸球体微小血管の修復・糸球体障害の進展抑制効果を発揮することから、単なる糸球体構成細胞としての内皮の喪失だけでなく、内皮の修復・再生の過程の障害についても、腎障害進

展にかかわる可能性があることが指摘されている。これらの内皮再生の機序について検討を重ねることは、糸球体硬化・慢性腎不全の病態解明の一助になることと考えられる。

近年循環血中血管内皮前駆細胞の存在が明らかにされているが、腎障害におけるその機能的役割については未だ不明な点が多い。**Stem cell antigen-1(Sca-1)**は、血球系・間葉系幹細胞を含む、マウス骨髄中幹細胞系の表面に発現するフォスファチジルイノシトール結合糖タンパクの一種で、**Sca-1** 陽性細胞は多能性分化・自己複製能を持ち、骨髄由来幹細胞の選択マーカーとしても利用される。胚性幹細胞由来 **Sca-1** 陽性前駆細胞が内皮細胞・平滑筋細胞に分化することが最近報告され、その血管修復に対する機能的意義が注目されている。

C57BL/6J マウス胎生 14 日胎児から摘出した背部大動脈を 1 型コラーゲンゲル中に包埋し、低酸素(5%酸素)、5%胎仔血清・**VEGF** あるいは **fibroblast growth factor 2(FGF2)** 存在下で培養すると、索状構造をとる新生血管が大動脈組織より発生することが報告されている。これは低酸素・**VEGF** 存在下において、胎生期大動脈壁内に存在する中胚葉由来間葉系未熟細胞が形態的に血管新生に寄与していることを示唆する。過去にも胎生期大動脈内の幹細胞の存在について報告されており、大動脈壁内をニッシュとする幹細胞がその末梢循環での血管新生に関与していることが予想される。

我々は **C57BL/6J** マウス胎生 14 日胎児背部大動脈を **collagenase** 処理し、その初代培養系を確立した。さらにこの初代培養細胞中に **Sca-1** 強陽性細胞を免疫組織染色にて同定し、その増殖維持には低酸素と **VEGF** の添加が必要であることを確認した。

2. 研究の目的

胎児大動脈由来 **Sca-1** 陽性細胞 (**EASCA1C**) を用いて、腎障害モデルにおける腎微小血管内皮細胞障害修復に与える影響を検討する。

3. 研究の方法

EASCA1C の分離法

1) **C57BL/6J** マウス胎生 14 日胎児背部大動脈の初代培養；大動脈摘出後、周囲結合組織を取り除いた後、IV 型 **collagenase** 含有 **MCDB131** 培養液中にて 37°C 下で反応させ、組織を滅菌した金属刃でミンス後、さらに

collagenase 処理する。遠心し上清を捨て、初代培養用ディッシュで 5%胎仔血清、10ng/ml **VEGF** を添加した **MCDB131** 培養液で低酸素下に培養する。

2) **EASCA1C** の分離・培養；**MACS**, **Anti-Sca-1** マイクロビーズキット (**Miltenyi Biotec**) にて行う。分離した **EASCA1C** についても上記と同様の培養液にて初期培養する。**Fibronectin** 薄層被覆ディッシュ上で **VEGF** 存在下に培養継代する。

3) **EASCA1C** の内皮分化条件の検討；**EASCA1C** を正常酸素分圧あるいは低酸素下で、内皮細胞増殖条件 (**EGM-2**) において培養する。**RT-PCR**, 蛍光免疫組織法・**Western blotting** にて **VE-cadherin**, **von Willebrand factor**, **CD34** の mRNA・蛋白発現を評価する。

胎児背側大動脈の I 型コラーゲンゲルによる 3 次元培養

60 μ l の **MCDB131** 培養液含有 I 型コラーゲンゲル (1.6mg/ml) にシリンダー状に裁断した胎児背側大動脈を浮遊させ、37°C でゲル化させる。その後 5%胎仔血清、**VEGF** あるいは他の増殖因子を含有する **MCDB131** 培養液 100 μ l をゲル上部にのせ、約 1 週間 **Modular Incubator Chamber** で低酸素下にて培養する。ゲルを **Bouin** 液にて固定後、内皮のマーカーである **Alexa Fluor 488** 標識 *Griffonia simplicifolia* **isolectin IB₄** にて染色する。ゲルを **PBS** にて洗浄後、スライドガラス上に圧排し、顕微鏡にて形態を評価する。

4. 研究成果

C57BL/6J マウス胎生 14 日胎児背側大動脈由来細胞の初代培養後、**MACS**, **Anti-Sca-1** マイクロビーズキットにて、胎児大動脈由来 **Sca-1** 陽性細胞 (**EASCA1C**) を分離抽出した。低酸素下、**VEGF** 添加にて、第 4-5 継代培養細胞中の **EASCA1C** を 40-50% に維持できることを、細胞免疫抗体法にて確認した。しかしながら、正常酸素分圧、**VEGF** 非添加のいずれの条件下でも、**EASCA1C** の細胞数を維持することはできなかった。次に、**EASCA1C** の内皮細胞への分化条件を、*in vitro* で検討した。**EASCA1C** を正常および低酸素分圧下にて、**EGM-2** 中で培養しても、**VE-cadherin**, **von Willebrand factor** の発現増強を見出せなかった。**Matrigel**, **fibronectin** あるいは **type IV collagen** 被膜細胞培養ディッシュ上で同様に培養しても、両マーカーの発現増強を認めなかった。近年血管内皮前駆細胞の分化因子として注目され

る insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP3)を培養液中に添加しても、内皮細胞への分化は観察できなかった。以上より、*in vitro*での EASCA1C の内皮細胞への分化を試みたが困難であった。

なお、胎児の発芽血管新生における TGF- β の役割についても検討した。低酸素下、VEGF 添加にて、3次元培養下での管腔形成が促進し、TGF- β 1 添加で阻害されることがわかった。TGF- β が血管形態分化に阻害的に働くことが示唆された（以下添付参照）。

Organogenesis accompanies the establishment of the vascular system which begins with sprouting angiogenesis. Vascular endothelial growth factor (VEGF) provides the primary stimulation in the vascular sprouting process but the negative regulation of this process remains unclear. This study examined the role of the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily in vascular sprouting using three-dimensional dorsal aorta culture system, in which the dissected tissue was embedded in type I collagen gel. We previously showed that VEGF did not affect the morphology of dorsal aorta under normoxia. When cultured under hypoxic conditions, thereby enhancing the expression of Flk-1, a receptor for VEGF, the dorsal aorta formed many cord-like structures in response to VEGF. To examine the role of TGF- β in vascular sprouting, each member of the TGF- β superfamily was applied to this culture system. TGF- β 1, as well as TGF- β 2 and TGF- β 3, inhibited capillary formation. Though activin A, another member of TGF- β superfamily, also abolished vascular sprouting, bone morphogenetic protein 2 did not change the morphology. Both

neutralizing anti-TGF- β 1 antibody and TGF- β type I receptor (ALK5) inhibitor partially reversed the additional effect of TGF- β 1. TGF- β may be a regulator for vascular sprouting during embryonic period.

Embryonic aortic tissue culture in three-dimensional collagen gel

The animal procedures were approved by the Jichi Medical School Institute of Animal Care and Use Committee. Dorsal aortas were surgically carefully dissected from embryonic day 14 (E14) C57/Bl6J mice (CLEA Japan, Tokyo, Japan). Briefly, the tissues were sectioned and extra connective tissues were removed from the dorsal aorta. Thereafter, they were cut into cylindrical shapes using ophthalmic micro-scissors and embedded in 60 μ l type I collagen gel (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) in 96 wells culture dishes (Beckton Dickinson). Each well received 90 μ l media, including the additives indicated in the text after the collagen had gelled. The cultures were maintained at 37°C in a hypoxic environment (5% CO₂ and 5% O₂). VEGF (Sigma, St. Louis, MO), TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, activin A, follistatin, bone morphogenetic protein-2 (BMP2), or ALK5 inhibitor (Calbiochem, San Diego, CA) was administered to the media simultaneously to avoid repeated room air exposure within the first culture day after gelation, by which sometimes caused failure of sprouting new vessels development. Cultures were examined under brightfield microscopy using a Nikon phase-contrast

inverted microscope. Fluorescent microscope images were captured using an OLYMPUS BX50 microscope (OLYMPUS, Tokyo, Japan) with a DP71 color digital camera (OLYMPUS). Images were imported into Adobe PhotoShop Elements 2.0 for final processing and layout. Morphological and quantitative analysis of vessels formation from aortic explants were performed with some modifications (Akimoto et al. 2002). The number of capillary structures was quantified by counting. Briefly, the capillary structures were examined to determine if they bound Alexa Fluor 488-conjugated Gs-IB₄ (Molecular Probes, Eugene, OR) and originated from the aortic explants. The capillary sprouts were distinguished from fibroblasts based on their morphology; wide caliper and uniformly cohesive pattern. The average of number of vessels in duplicate conditions was recorded and all experiments were repeated more than three times. In some experiments, the length of the vessels was measured using the Image J 1.37 software.

As documented in previous articles, VEGF induced new vessel sprouting and elongation in 3D culture of cylindrical shaped mouse dorsal aorta (**Fig. 1A and B**). The administration of TGF- β 1 inhibited both new vessel sprouting and elongation (**Fig. 1C**). Treatment with either neutralizing anti-TGF- β 1 antibody or ALK5 inhibitor partially reversed the inhibitory effect of TGF- β 1 (**Fig. 1E, F and G**). Lower dose of neutralizing anti-TGF- β 1 antibody (5, 10, 20 μ g/ml) than 40 μ g/ml did not change the

degree of new vessel sprouting (data not shown).

Next, other isoforms of TGF- β were applied to this experimental system. TGF- β 2 (**Fig. 2C**) and TGF- β 3 (**Fig. 2D**) also abolished the sprouting angiogenesis but the efficacy of TGF- β 2 was less effective than TGF- β 1 or - β 3. It is possible that TGF- β s play coordinately and redundantly with respect to the inhibition of sprouting angiogenesis. Activin A, at a concentration of 200 ng/ml, exerted only a partial inhibitory effect (**Fig. 2E**) and follistatin, an endogenous inhibitor of activin A, almost completely reversed the effect of activin A (**Fig. 2F**). In contrast, BMP2 induced no apparent morphological change (**Fig. 2H**).

Figures

Fig.1

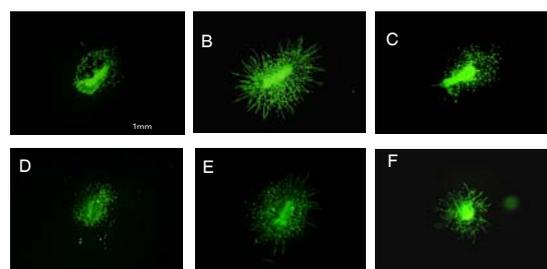


Fig1.G

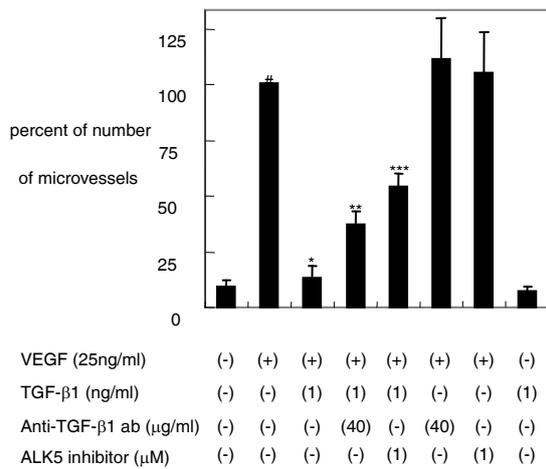


Fig. 1.

Effects of TGF-β1 on VEGF-mediated new vessels formation. After 5 days, mouse aorta tissues culture in collagen gels were fixed and stained with *Griffonia simplicifolia* isolectin IB4 (Gs-IB₄). Data are representative of four experiments. A: control (5% fetal bovine serum), scale bar: 1mm, B: VEGF (25 ng/ml), C: VEGF + TGF-β1 (1 ng/ml), D: TGF-β1 (1 ng/ml), E: VEGF + TGF-β1 + neutralizing anti-TGF-β1 antibody (40μg/ml), F: VEGF + TGF-β1 + ALK5 inhibitor (1μM), G: Quantification of new vessels formation. Five identical experiments were performed to confirm reproducibility. Number of new vessels was counted in each condition (n=4 or 5). Columns and error bars mean average and SE, respectively. The height of columns means the percentage of new vessels number compared to VEGF alone. #: P < 0.01 versus control, *: P < 0.01 versus VEGF alone, **: P<0.05 versus without anti-TGF-β1 antibody, ***: P<0.01 versus VEGF+ TGF-β1+anti-TGF-β1

antibody.

Fig.2

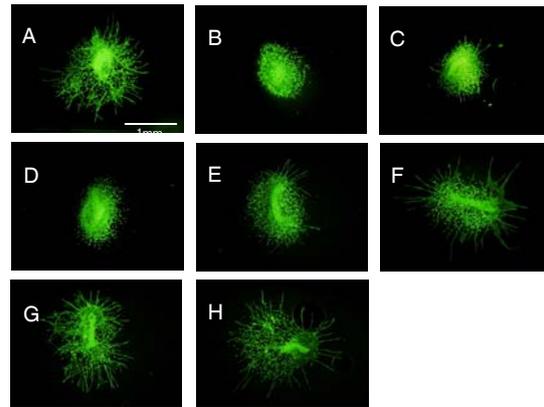


Fig2.I

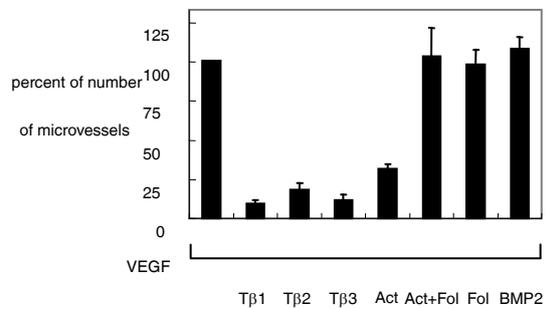


Fig. 2. Effects of other members of TGF-β superfamily on new vessels formation. Mouse 5 days dorsal aorta tissues in collagen gels were fixed and stained with Gs-IB₄. Data are representative of three experiments. A: VEGF (25 ng/ml), scale bar: 1mm, B: VEGF + TGF-β1 (1 ng/ml), C: VEGF + TGF-β2 (1 ng/ml), D: VEGF + TGF-β3 (1 ng/ml), E: VEGF + activin A (200 ng/ml), F: VEGF + activin A + follistatin (400 ng/ml), G: VEGF + follistatin (400 ng/ml), H: VEGF + BMP2 (200 ng/ml). I: Quantification of new vessels formation. Four identical experiments were performed to confirm reproducibility. Number of new vessels was counted in each condition (n=3

or 4). Columns and error bars mean average and SE. Tβ1: TGF-β1, Tβ2: TGF-β2, Tβ3: TGF-β3, Act: activin A, Fol: follistatin.

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 2 件)

1. Chiharu Ito, Tetsu Akimoto, Takashi Ioka, Takahisa Kobayashi, Eiji Kusano. TGF-β inhibits vascular sprouting through TGF-β type I receptor in the mouse embryonic aorta. *Tohoku J Exp Med.* 218(1):63-71, 2009 査読あり
2. Takahisa Kobayashi, Yusuke Furukawa, Jiro Kikuchi, Chiharu Ito, Yukio Miyata, Shigeaki Muto, Akira Tanaka and Eiji Kusano. Transactivation of RON receptor tyrosine kinase via PDGF receptor during steady-state growth of human mesangial cells. *Kidney Int* 75(11):1173-83. 2009 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

1. 小林高久, 古川雄, 菊池次郎, 伊藤千春, 武藤重明, 草野英二. メサンギウム増殖性腎炎における受容体型チロシンキナーゼ RON の発現. *日本腎臓学会誌* 50 巻 3 号 Page340(2008.04)
2. Chiharu Ito, Tetsu Akimoto, Takashi Ioka, Takahisa Kobayashi, Eiji Kusano. Role of transforming growth factor-beta in embryonic angiogenesis. *Am Soc Nephrol* 2007.
3. Takahisa Kobayashi, Yusuke, Furukawa, Jiro Kikuchi, Chiharu Ito, Yukio Miyata, Shigeaki Muto, Eiji Kusano. Cross Talk between the Receptor Tyrosine Kinase RON and PDGF Receptor during Mesangial Cell Proliferation. *Am Soc Nephrol* 2007.
4. Takashi Ioka, Shuichi Tsuruoka, Chiharu Ito, Hisashi Yamamoto, Tetsu Akimoto, Hideki Iwaguro, Takayuki Asahara, Akio Fujimura, Eiji Kusano. Erythropoietin (EPO)-Related cGMP Production Inversely Correlated with the Ratio of EPO Receptor (EPOR) Subtype mRNA in Circulating endothelial Progenitor Cells (EPCs) of HD Patients and HUVECs. *Am Soc Nephrol* 2007.
5. 発生段階における血管形成への TGF-β の影響. 伊藤千春, 秋元哲, 井岡崇, 小林

高久, 草野英二. *日本腎臓学会誌* 49 巻 3 号 Page268(2007.04)

6. 小林高久, 古川雄祐, 菊池次郎, 伊藤千春, 宮田幸雄, 武藤重明, 草野英二. メサンギウム細胞増殖における受容体型チロシンキナーゼ RON の役割. *日本腎臓学会誌* 49 巻 3 号 Page307(2007.04)
7. エリスロポエチン(EPO)誘発性血圧上昇は末梢血血管内皮前駆細胞における受容体(EPOR)サブタイプ比と相関する. 井岡崇, 鶴岡秀一, 伊藤千春, 秋元哲, 山本尚史, 岩畔英樹, 浅原孝之, 藤村昭夫, 草野英二. *日本腎臓学会誌* 49 巻 3 号 Page260(2007.04)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織
(1) 研究代表者
伊藤 千春 (ITO CHIHARU)
自治医科大学医学部・助教
研究者番号 00424010

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者