

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580129

研究課題名(和文) 発生期腎臓血管網を解析するシステムの開発および血管ネットワークの構築

研究課題名(英文) Development a novel method to analyze blood vessel occurrence in metanephroi and its network construction

研究代表者

王 碧昭 (WANG, Pichao)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：80261775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓血管の由来は長く論議されたが、定説は明らかになっていない。これまでangiogenesis説(血管侵入)とvasculogenesis説(現地形成)があるが、どちらも初期血管の形成に確実な結論を出していない。本研究は新方法を開発し、発生初期のマウスはE12.375期に背側大血管から後腎への侵入写真を捉え、腎血管形成初期にangiogenesisはvasculogenesisより先行したことを明らかにした。また生体外培養と移植実験により、大血管のangiogenesisにより血管網の完全構築を実証した。これらに成果を生かし血管再生の応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：How blood vessel originated in metanephros is a question discussed for a long time. Angiogenesis and vasculogenesis are two main hypotheses. The former is related to blood vessel invasion, and the latter differentiation of progenitors from mesenchymal cells. However, which one is prerequisite to the very early stage has not been clarified. We developed a method to elucidate temporal angiogenesis originated from dorsal aorta and established a method to constitute the blood vessel network by applying the angiogenesis.

Using resin combined with ink-template method to inject into umbilical cord, we succeeded in the identification of occurrence time of angiogenesis. In vivo transplantation subsequent to in vitro culture, we succeeded in generation of a full blood vessel network in kidney. These techniques are useful to both kidney and other organs.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：angiogenesis vasculogenesis 後腎 発生期 墨鋳型法 血管形成 血管鋳型

## 1. 研究開始当初の背景

腎臓は再生医学においてやや出遅れている印象のある臓器である。血管網に絡んでいる腎臓糸球体や尿細管は ES、iPS 細胞による再生医療も及ばない複雑な臓器であり、その再生に必要なキーファクターの一つは複雑な血管系の構築・再生である。ゆえに腎組織の再生には、血管ネットワーク形成過程の論理立てが必要である。腎血管系は大血管と糸球体毛細血管及び尿細管周囲毛細血管から構成される。腎血管の発生機構には二つの論説がある。一つは背側大動脈である外部血管が発生期腎臓（後腎）に侵入し腎血管を形成していく angiogenesis 説(外因説)である。もう一つは糸球体原基周囲の間葉系細胞内に分化・成熟により腎血管が形成される vasculogenesis 説(内因説)である。近年の研究では vasculogenesis は主に糸球体毛細血管網を作る経路であると報告されていたが、発生腎の大血管形成に関する報告は少ない。その理由は大血管形成に関連する血管侵入—angiogenesis—を証明する方法は開発されず、直接観測が困難である。また、angiogenesis と vasculogenesis 両者とも染色データに基づいて報告されたが、決定的な根拠は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究は後腎発生期の血管網形成は angiogenesis と vasculogenesis の協調的な作用ではないかと推測し、マウス発生期後腎を用い、発生初期未解明の angiogenesis の発生を調べ、特に初期腎臓髄質に生まれた血管がいつ、どのように分岐、成熟化するのかを時空間的に解析し、angiogenesis と vasculogenesis の関連性を明らかにすると

もに、後腎の血管網構築法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究の具体的な実験は下記のステップを踏まえて行われた。

- (1) 新生血管を可視化する方法の開発；
- (2) 後腎発生期における angiogenesis と vasculogenesis の発生順序の解明；
- (3) angiogenesis の自発性および後腎発生に及ぼす影響の解明；
- (4) angiogenesis を利用する血管網ネットワーク構築法の開発。

(1) 新生血管の可視化方法については、①明視野観察法、②墨注入法、③血管鋳型法、④蛍光樹脂鋳型法、⑤墨樹脂鋳型法を試みた。その中、特に血管鋳型法を中核として実験を繰り返しながら、改良法を考案した。元々、微小循環系の研究方法は、循環量やその変動を検討する生理学的方法と脈管の微細構造などを追究する形態学的方法に大別され、血管の微細構築に関する研究は後者に属するものである。臓器の血管系を立体的に再現するために合成樹脂を用いた鋳型法が開発され、種々の臓器でこれが利用された。本実験はマウス胎児血管を鋳型にするために、樹脂 (Mercor) と走査型電子顕微鏡を用いて実験を行った。しかし、血管鋳型樹脂の注入場所は定められていないため、我々は胎仔心臓、眼底血管と臍帯血管を検討した。その結果、一番適切な場所は臍帯血管であることを明らかにした。本研究は発生腎鋳型血管の作成は臍帯血管からのアプローチを採用した。また鋳型の確立を実現するため、マウスの発生期後期を遡って、鋳型形成しやすい後期 E18.5 から中期 E16.5、E15.5、E15.0、前期

E13.5、E13.0、E12.5 の血管鑄型を作成・観察した。

(2) 後腎発生期における angiogenesis と vasculogenesis の発生順序の解明の必要性では、上記開発した墨樹脂法により背側大血管が後腎に侵入する時期を明らかにしたが、この angiogenesis は後腎内部の vasculogenesis より早く進行しているか、それとも同時に、あるいは遅く進行しているかはまだ解明されていないのである。本実験は、後腎発生期における angiogenesis と vasculogenesis の発生順序を解明することを重点に置く。実験方法としては、血管細胞を形成する各時期の遺伝子マーカーを用い、RT-PCR 法で解析した。本実験は、hemangioblast 血管芽細胞期マーカーである brachyury、血管内皮前駆細胞のマーカー c-kit を血管内皮細胞形成前の初期マーカーとして使用した。血管内皮新生の初期、中期、後期マーカーとして Flk1、Flt1、Tie2 を其々使用した。また、PECAM-1 を成熟血管組織マーカーとして使用した。使用後腎組織は E10.5, E11.5, E12.5, E13.5 の後腎である。

(3) angiogenesis の自発性および後腎発生に及ぼす影響の解明の必要性では、上記背側大血管が発生初期に後腎内部に侵入することを明らかにしたものの、angiogenesis は果たして生体内で自然に発生するかどうかはまだはっきりされていないからである。実験は E11.5 のマウス胎児後腎を用い、アダルトマウスの大腿血管に移植した。また、胎盤膜を用い、後腎の上にカーバーし、後腎を固定した。移植 9 日後、大腿血管から後腎への新たな血管を形成し、後腎内部への侵入を明視野顕微鏡で観察した。

(4) angiogenesis を利用する血管網ネッ

トワーク構築法の開発については、まず *in vitro* の血管新生培養系の構築を試みた。培養条件は高価な外的因子（サイトカイン）等の添加を避け、安価な物理条件を中心とする設計に工夫した。試行錯誤した結果、網状グリッドとポリカボンネット膜の併用および気液相の培養条件のみで、7-9 日間の培養期間後、後腎内の微小血管の出現を観察した。

#### 4. 研究成果

(1)の結果において、E18.5からE13.0までの血管網は明白に観察された。発生後期のE18.5は血管網の形成や糸球体の形成過程や糸球体の成熟の確認が得られた。派生中期のE16.5、E15.5、E15.0では分岐した血管の伸展およびさらなる分岐が観察された。発生前期E13.5の血管は後腎を覆うように形成されが、発生初期E13.0の鑄型では、一本の血管から三本に分岐したことを確認した。しかし、その前の時期E12.5の後腎血管がSEMにて観測できなかった。その理由は血管鑄型樹脂の粘性(15~20cp)が血液粘性の3cpより5倍以上高いため、腎内に侵入した小血管への樹脂注入は不可能であった。そこで試行錯誤で改良法を試みた。見出した方法は低い粘性かつ観察しやすいFITC蛍光色素と鑄型剤を混ぜ、臍帯血管から注入した方法である。また、3次元立体臓器の深部を観察しやすいため、生体試料を透明化するscaleAを導入し、1週間浸した後、蛍光顕微鏡にて観測を行った。その結果、E12.625の胎児の全体の蛍光イメージングが捉えた。しかし、後腎内部の微小血管の観測ができなかった。その理由は、肝臓に重なる部位が観察し難いだけでなく、鑄型血管も脆いことが分かった。次の改良法としては、強い蛍光色素の代わりに、明視野顕微鏡でも

観察できる墨を使用して、鋳型樹脂の粘性を下げながらscaleAを併用する方法を開発した。この方法により、E12.375の胎児腎臓に背側大血管の最初侵入様子の観察に成功した。

Angiogenesisにより胎盤からの栄養、酸素や成長因子が早期に流入することにより後腎全体の成長を早期に促すことができることが示唆された。

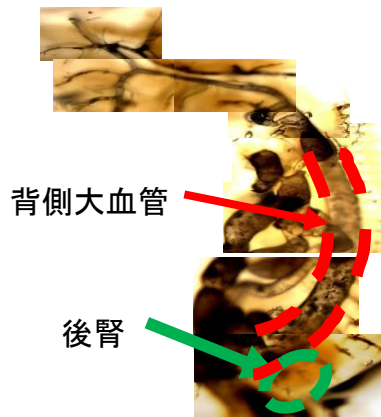


図1 墨樹脂鋳型の血管侵入観察

(2) RT-PCRの結果では、血管芽細胞マーカーであるbrachyuryがE13.5期に顕著に上昇したが、血管内皮前駆細胞マーカーのc-kitはまだ弱く発現されている。一方、血管成熟マーカーであるPECAM-1はE12.5期に強く発現した。これは発生初期の後腎内部のメサンカイマーが血管前駆細胞に分化する前、既に成熟血管が後腎に存在することを示唆した。また、血管内皮細胞新生因子のFlk1、Flt1、Tie2の発現はE12.5期ではなく、一日遅れてE13.5期になってからようやく観察できる程度で発現したことも分かった。これらの遺伝子発現解析結果から、E10.5~E12.5期間における腎血管形成はangiogenesisの働きを中心に起き、E13.5からはangiogenesisとvasculogenesis両方が協調しながら起きることが示唆された。E12.5期で強発現したPECAM-1は、E12.5期に背側大血管は既に後腎に侵入したことを示唆した。このことは

墨樹脂法で観察した現象を裏つけた。また、angiogenesisの起源は背側大血管から後腎内部への侵入を解明しただけではなく、angiogenesisはvasculogenesisより早期に進行することも示唆された。

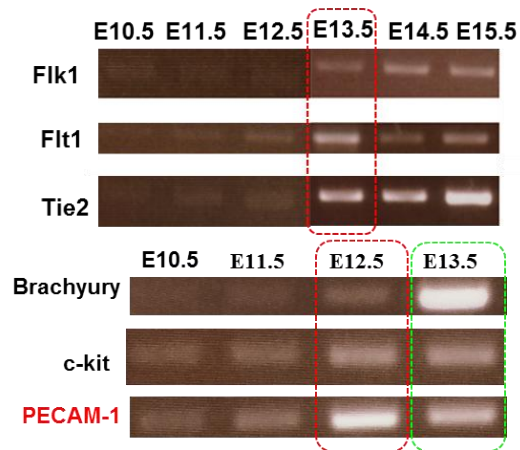


図2 RT-PCRによるangiogenesisとvasculogenesisの比較

(3) 移植結果では、移植された後腎部位に、大腿血管が顕著に伸展・分岐だけではなく、後腎内部に小血管が現れたことも確認した。また、移植前の腎臓に比べ、移植後の後腎は数倍も大きくなったことが明らかになった。一方、何も移植していない大腿血管は新たな伸展・分岐が観察されていない。また、大腿部位から摘出した後腎では管腔が繋がっていることも観察された。これらの結果により、大血管は近辺に存在する後腎に向かって自発的にangiogenesisを生じることが明らかになった。またangiogenesis由来の大血管侵入は後腎小血管の派生と管腔形成に関与することが明らかになった。

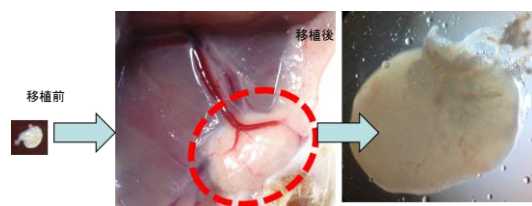


図3 Angiogenesisの自発性の証明

(4) *in vitro* の培養結果では、試料のホールマウト及び切片の免疫染色にて微小血管網の新生が認められた。しかし、殆どの微小血管は無秩序に配列し、大血管の形成が認められなかった。そこで、上記(3)で得られた *angiogenesis* の知見を導入し、生体内の大血管を利用して、上記の *in vitro* 条件で3日間培養した後腎をマウス大腿血管に移植した。9日後移植腎を明視野顕微鏡と共焦点顕微鏡を用い、大小血管を包括する複雑系血管ネットワークが認められた。また、大血管は *angiogenesis* 由来するものも実証した。*in vitro* 培養系で *vasculogenesis* により生じた微小血管網に比べ、*angiogenesis* を導入した後腎の血管数をはるかに多いし、腎臓も赤色を呈した。これらの結果により、複雑血管網の構築は *angiogenesis* の利用でようやく実現されると考えられる。

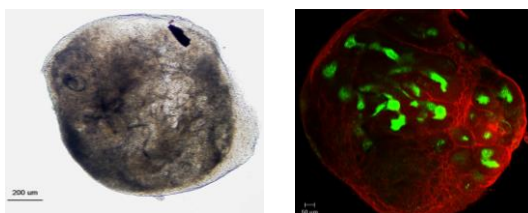


図4 血管ネットワークの構築

以上(1), (2), (3), (4)の結果をまとめると、発生期腎臓において *vasculogenesis* と *angiogenesis* の血管形成によって血管網が構築される。*vasculogenesis* の研究は世界で多くの報告があるが、*angiogenesis* に対する報告は僅かである。本研究は、腎臓外に存在する背側大動脈から腎血管網が形成されるか(*angiogenesis*)という血管の由来に関する研究とそれらによって後腎内部の血管変化および実用的な血管構築に関する研究に焦点を当てた。本研究の結果から下記の知見が

得られた。

明視野及び墨注入法の結果では、マウス E13.0 までの後腎血管を観察できたが、それ以前の時期の *angiogenesis* が実証できないため、血管鑄型法で検証し、さらに、粘性の低い蛍光色素と墨を採用し、新たな鑄型剤を作成し、簡易な観察法を開発した。その結果、マウスに背側大血管が後腎へ侵入するイメージングを初めて捉えた。また、*angiogenesis* と *vasculogenesis* の発生時期の前後において、血管発生各期のマーカーを活用し RT-PCR で解析したところ、*vasculogenesis* 説の血管発生初期段階で、成熟血管のマーカーが既に大量発現したことを突き止め、単純な内因説の *vasculogenesis* が成り立たないと共に、背側大血管からの血管侵入（外因説 *angiogenesis*）が先導的に発生することを実証した。また移植実験により、大血管が自発的に周辺の発生臓器に侵入・分岐する *angiogenesis* を起こす知見をえられた。これらの知見に基づき、*in vitro* 培養法と *in vivo* 移植法の併用により、通常構築できていない大小血管網を包括的な構築法を実現した。本研究で開発した新生血管のイメージング法と後腎内血管ネットワークの構築法は、腎臓のみならず、他臓器の血管新生・再生にも有用になると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計15件）

- ① 西村裕介、王 碧昭、セラミックス製担体培養による発生期腎臓血管ネットワークの形成、第13回日本再医療学会 2014年3月4日～6日、京都

- ② Yusuke Nishimura, PiChao Wang, Angiogenesis in developing kidney and transplanted kidney, 2013 ASCB (American Society of Cell Biology) Annual Meeting, 2013年12月14日～18、New Orleans, U.S.A.
- ③ 西村裕介、王 碧昭、拍動流培養装置を用いた発生期腎臓血管形成の検証、第51回日本人工臓器学会、第5回国際人工臓器学術大会、2013年9月27日～29日、横浜
- ④ 西村裕介、王 碧昭、発生期腎血管形成の解析と血管構築の試み、日本動物細胞工学会、2013年6月18日～19日、福井
- ⑤ 西村裕介、王 碧昭、背側大動脈による腎血管形成の解明、筑波技術研究会、2013年3月12日、筑波
- ⑥ 西村裕介、王 碧昭、発生期腎臓における angiogenesis の観察法、BMNM 2013 (日本顕微鏡学会バイオメディカルニューマイクロスコープ分科会、2013年3月5日、東京
- ⑦ Yusuke Nishimura, PiChao Wang, Elucidation of dorsal artery invasion to metanephros, 細胞アッセイ研究会、2012年12月10日、東京
- ⑧ Yusuke Nishimura, PiChao Wang, Generation of main blood vessels in the developing kidney. YABEC (Young Asia of Bio-Engineering Conference)2012, 2012年10月27日～28日、Tokushima, Japan
- ⑨ 西村裕介、王 碧昭、発生期講じんにおける血管新生の解明、第64回日本生物工学会、2012年10月23日～26日、神戸
- ⑩ 西村裕介、王 碧昭、発生期腎臓における angiogenesis の時空間的形成の解明、第21回日本次世代人工腎臓研究会、2012年9月29日、東京
- ⑪ 王 碧昭、西村裕介、時空間的形成による腎血管の解明、第44回日本化学工学会、2012年9月19日～21日、仙台
- ⑫ Yusuke Nishimura, PiChao Wang, Elucidation of angiogenesis of blood vessel during kidney development. The 5<sup>th</sup> International Biotechnology Symposium and Exhibition, 2012年9月16日～21日、Kaegu, Korea
- ⑬ 西村裕介、王 碧昭、発生期腎血管形成における angiogenesis と vasculogenesis の解明、ナノバイオメディカル学会、2012年7月9日～10日、つくば
- ⑭ 西村裕介、王 碧昭、マウス発生期腎血管鑄型の観察、第57回日本透析医学会、2012年6月22日～24日、札幌
- ⑮ 西村裕介、王 碧昭、マウス胎児期における腎血管の血管鑄型法開発、筑波技術研究会、2012年3月2日、つくば  
〔図書〕(計1件)
- ① 王 碧昭、他多数。動物細胞培養、技術情報協会、2014年 (総数700頁)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

王 碧昭 (WANG, PiChao)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：80261775