

三次元コラーゲンゲル培養法を用いた *in vitro*毛細血管損傷モデル作成の試み

藤田 恵子¹ 穂田 真澄²

要 旨：マウス大動脈片をコラーゲンゲル内で包埋培養すると大動脈片から毛細血管が新生される。ゲル内に新生した毛細血管をメスで切断した後、血管新生促進因子であるFGF-2と転写因子Egr-1の発現について検討した。Egr-1の発現は切断後90分で増強し、その後減少するのに対し、FGF-2の発現はEgr-1の発現が減少した後にもみられた。本モデルは毛細血管損傷後の遺伝子発現の解析に有用なモデルになり得ると思われる。(J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 637-641)

Key words: vascular injury, angiogenesis, FGF-2, Egr-1, collagen gel culture

序 言

血管新生は創傷治癒過程において必須の現象である¹⁾。血管新生を調べるための*in vitro*モデルとしては種々の方法が知られているが、コラーゲンゲルを用いた培養法は有用な方法として評価され、広く用いられている²⁻⁹⁾。われわれはコラーゲンゲルを用いた三次元培養法により、*in vitro*においても*in vivo*と同様の毛細血管様チューブが形成されることを形態学的ならびに組織化学的に観察してきた^{4,5,8)}。さらに、RT-PCR法および免疫組織化学的手法により、コラーゲンゲル三次元培養下での毛細血管様チューブの形成に線維芽細胞増殖因子(FGF-2)の発現がみられることを報告した⁹⁾。*In vivo*ならびに*in vitro*における血管新生に重要な役割を担っているFGF-2は内皮細胞、平滑筋細胞の増殖、創傷治癒および組織修復過程においてその発現が増強されることが知られている^{10,11)}。最近、新しく血管が形成される場や腫瘍が増殖する場ではFGF-2の関与するこれらの現象を転写因子であるearly growth response-1(Egr-1)がサポートしていることが報告され¹²⁾、Egr-1は血管損傷によって発現が誘導される遺伝子群の共通の調節因子であると考えられている。

血管損傷、特に内皮細胞損傷の*in vitro*モデルとし

て、ラバーポリスマンあるいはメスで単層培養された内皮細胞を培養皿からこそげとり、新たに増殖した内皮細胞の数や遊走距離を調べるscrape assay method(スクラップ法)が一般に用いられている¹³⁾。今回、メスによるスクラップ法に準じ、三次元コラーゲンゲル培養でゲル内に新生された毛細血管を切断後、FGF-2とEgr-1の発現について検討した。切断後、初期にEgr-1の強い発現を認め、その後激減するのに対し、FGF-2の発現は引き続き認められた。本法が毛細血管損傷後の遺伝子発現を解析する*in vitro*モデルとなり得ると思われたので報告する。

材料と方法

(1)コラーゲンゲル培養と新生毛細血管の切断

三次元コラーゲンゲル培養は以前に報告した方法に従った⁴⁻⁷⁾。1カ月齢のICRマウス5匹(♂)より胸大動脈を剔出し、外膜を除去した後に2mmに切断しリング状の大動脈片とした。直径35mmの各培養皿に大動脈片を4個、両断端が培養皿の底面と垂直になるように等間隔に置き、再構成コラーゲン液(0.3% Cellmatrix type I-A, 新田ゼラチン)を重層し、約10分間37°Cで静置した。ゲル化した後に、20%ウシ胎仔血清を含むHam's F-12培養液を加え、10日間培養した。大動脈片から新生した毛細血管は位相差顕微鏡で観察すると

¹埼玉医科大学解剖学教室

²埼玉医科大学中央研究施設形態部門

2005年6月6日受付 2005年9月13日受理



Figure 1 Endothelial cell-specific tomato lectin staining. Capillary-like tubes (arrow heads) formed from the aortic explant (asterisk) in the gel were strongly stained. $\times 90$

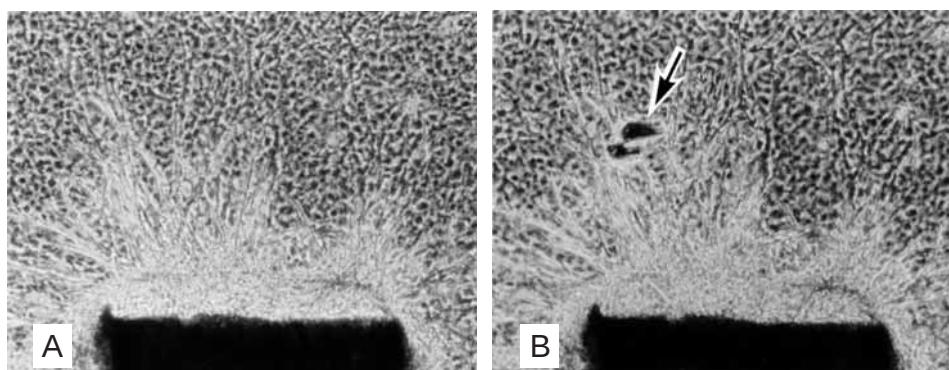


Figure 2 Phase-contrast micrographs of the migrating cells and capillary-like tubes into the collagen gels. $\times 35$
A: Before razor injury.
B: 30 minutes after razor injury (arrow).

もに、内皮細胞のフコースに特異的に結合するトマトレクチン(*Lycopersicon esculentum*, EY Laboratories)で染色し確認した。新生毛細血管ならびに周囲の遊走細胞を倒立型顕微鏡下で観察しながらメス(Surgical Blade Stainless Steel No.23, フェザー)を用いて切断した。大動脈片の断端より約10本の新生血管の形成がみられるものを選び、無作為に選んだ1本を切断した。メスによる切断の幅は約0.5mm, 切断の深さは約2mmである。

(2)リアルタイム定量PCR

切断直前ならびに切断から30分, 90分, 18時間培養を継続した後, リング状の大動脈片4個を各培養皿から取り除き, 残った新生毛細血管および遊走細胞からTRIzol(Invitrogen)を用いてtotal RNAを抽出した。Super Script II(Invitrogen)を用いてcDNAを合成した後, ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System(Applied Biosystems)を用いてTaqMan PCR法を行っ

た。プライマーはTaqMan® Gene Expression Assays(Applied Biosystems)を使用した。Egr-1ならびにFGF-2遺伝子のmRNA量はcomparative cycle threshold法($\Delta\Delta C_T$ 法)により, 内在性コントロールGAPDH遺伝子のmRNA量に対する比で解析した。

結 果

(1)コラーゲンゲル培養と新生毛細血管の切断

培養開始から7~10日でコラーゲンゲル内に埋め込まれた大動脈片から毛細血管様チューブの新生がみられた。これらのチューブはトマトレクチンで染色された(Fig. 1)。Fig. 2Aは大動脈片から新生した毛細血管, Fig. 2Bはこれを倒立型顕微鏡下でメスによって切断した後の位相差顕微鏡像である。

(2)リアルタイム定量PCR

Egr-1遺伝子は切断後90分で発現量が切断前の約8倍

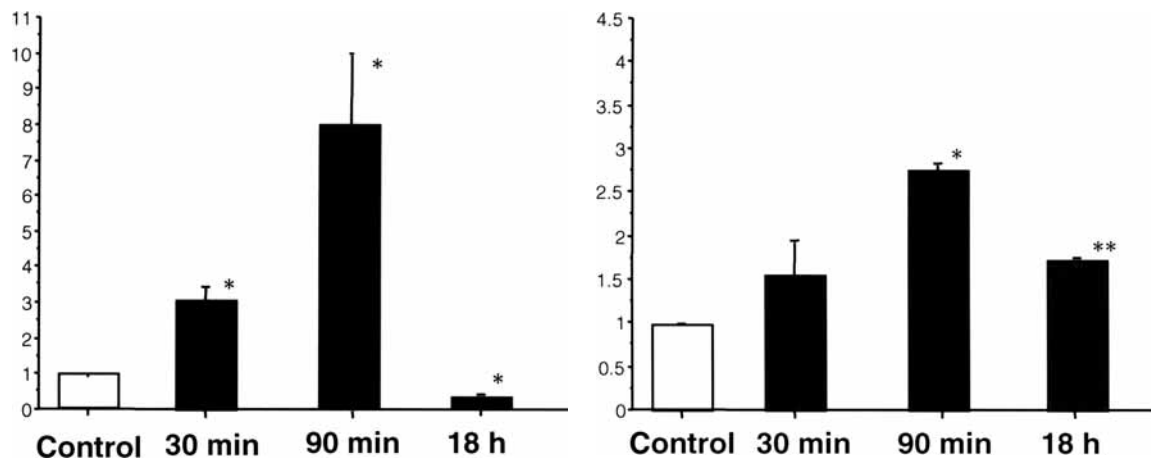


Figure 3

A: Amount of Egr-1 mRNA.

B: Amount of FGF-2 mRNA.

Each mRNA was expressed by the ratio to that of GAPDH gene mRNA, was normalized to the value obtained before and after injury. Student's *t*-test for unpaired data was used for statistical analysis. Data represent the mean ($\pm$ SE) of 5 dishes containing 20 aortic explants. There were significant differences (* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$).

A | B

に増加したが、切断後18時間にはその発現量は激減した (Fig. 3A)。これに対し、FGF-2遺伝子発現量は切断後90分で切断前の約3倍となり、切断後18時間でも切断前の約2倍の発現量が認められた。Controlに対して切断後90分 ($p < 0.01$), 18時間 ($p < 0.05$)にそれぞれ有意差が認められた (Fig. 3B)。

考 察

血管新生に関連した三次元培養法には、コラーゲンゲルを用いる方法のほかに、尿漿膜 (chrioallantoic membrane: CAM) を用いる方法¹⁴⁾、スフェロイドを用いる方法^{15,16)}などがある。毛細血管に機械的損傷を加える実験には、CAM法では炎症反応による血管新生をも考慮する必要があり、また遺伝子解析にあたり鳥類という制約がある。スフェロイドを用いる方法で新生血管を得るためには implantation が必要であり、位相差顕微鏡下で新生血管を切断する本実験の目的には適していない。コラーゲンゲル培養法は単層培養法に比べ、より *in vivo* に近い三次元の環境が得られる培養法である。コラーゲンゲル内に新生された毛細血管様チューブを切断することにより、従来より報告されている血管内皮細胞の単層培養を用いた二次的なスクラップ法よりも、毛細血管損傷後の遺伝子発現のみならず損傷後の細胞動態に関してより *in vivo* に近い情報

を得ることができると思われる。

Egr-1は成長、分化、免疫応答に加え、創傷治癒や血栓形成を含めた血管系の病態生理に関わる多くの遺伝子を調節する転写因子である¹⁷⁾。細胞増殖因子やサイトカイン、さらには低酸素、血管損傷などの刺激により早期に発現が誘導される。活性化されたEgr-1は血管新生に関わる細胞増殖因子、サイトカイン、受容体、接着分子、プロテアーゼなど一連の遺伝子群の発現の調節¹⁸⁾、また血管損傷時の修復過程に必要な種々の血管新生促進因子のプロモーターを活性化する¹⁹⁾。Egr-1によって誘導されることが報告されている遺伝子には、血小板由来増殖因子 (PDGF) AB、肝細胞増殖因子 (HGF)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、FGF-2²⁰⁾、トランスフォーミング増殖因子 beta 1 (TGF- β 1) およびその受容体がある²¹⁾。最近、Fahmyら¹²⁾は、Egr-1はFGFが関与する血管新生、細胞増殖、毛細血管内皮細胞による血管形成をサポートすると報告している。特に、FGF-2は内皮細胞、平滑筋細胞の増殖に関わり、創傷治癒、組織修復に関係する血管新生促進因子である¹¹⁻¹³⁾。一方、Neuhausら²²⁾は、stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) がEgr-1とVEGFの発現を誘導することを内皮細胞で報告している。Egr-1の発現にはextra-cellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2のリン酸化が関係していると考えられており、ERK 1/2を活性化させ

る因子がFGF-2であることが内皮細胞だけでなく軟骨細胞の機械的損傷実験でも報告されている^{23, 24)}。新生血管の損傷により放出されたFGF-2がERK 1/2を活性化させ、ERK 1/2のリン酸化を促進しEgr-1を発現させ、さらにFGF-2、VEGFの発現を誘導するというカスケードが考えられる²⁵⁾。Egr-1が誘導する血管新生促進因子にはVEGFも含まれ、Neuhausら²²⁾が報告したEgr-1発現に伴うVEGFの発現量の変化を、今回われわれが示したFGF-2の変化と比較すると、Egr-1の発現に遅れてVEGFの発現のピークがあるのに対し、FGF-2の発現はEgr-1の発現と同時に起きているように思われる。内皮細胞だけでなく平滑筋など多くの細胞の増殖因子であるFGF-2は組織・細胞損傷の初期により関与し、内皮細胞の特異的増殖因子であるVEGFはやや遅れて発現し、内皮細胞の増殖・修復により関与するのではないかと考えられる。

今回の実験からは、Egr-1の発現がFGF-2を誘導しているか否かは断定できない。Egr-1の発現をblockした後のFGF-2の発現抑制があるか否か、FGF-2のblockingがEgr-1の発現に影響しないかなど検討しなければならない。また、本研究では新生毛細血管と遊走細胞がともに損傷を受けており、新生毛細血管のみに選択的に損傷を加えた実験などを含め検討する必要がある。以上のようにいくつかの課題があるが、本研究では、メスによる毛細血管損傷後、Egr-1の発現と同時にFGF-2の発現量も増加しており、本法が毛細血管損傷後の遺伝子発現を解析する有用な*in vitro*モデルになり得ると思われた。さらに、毛細血管損傷後の遺伝子発現の解析だけでなく、毛細血管損傷後の細胞動態を含めた毛細血管の修復過程を経時的に観察することも可能であり、血管新生促進因子との関係も含めさらに検討を続けたい。

結 論

三次元コラーゲンゲル培養でゲル内に新生された毛細血管をメスによって切断後、FGF-2とEgr-1の発現について検討した。Egr-1の発現と同時にFGF-2の発現量が増加しており、本法は毛細血管損傷後の遺伝子発現の解析に有用な*in vitro*モデルとなり得る。

謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会；基盤研究C課題番号16591796より補助を受けた。

文 献

- 1) Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE et al: Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol*, 1998, 152: 1445–1452.
- 2) Mori M, Sadahira Y, Kawasaki S et al: Capillary growth from reversed rat aortic segments cultured in collagen gel. *Acta Pathol Jpn*, 1988, 38: 1503–1512.
- 3) Nicosia RF, Ottinetti A: Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis *in vitro*. *Lab Invest*, 1990, 63: 115–122.
- 4) Akita M, Murata E, Merker HJ et al: Formation of new capillary-like tubes in a three-dimensional *in vitro* model (aorta/collagen gel). *Ann Anat*, 1997, 179: 137–147.
- 5) Akita M, Murata E, Merker HJ et al: Morphology of capillary-like structures in a three-dimensional aorta/collagen gel culture. *Ann Anat*, 1997, 179: 127–136.
- 6) Fujita K, Asami Y, Murata E et al: Effects of thalidomide, cytochrome P-450 and TNF-alpha on angiogenesis in a three-dimensional collagen gel-culture. *Okajimas Folia Anat Jpn*, 2002, 79: 101–106.
- 7) Fujita K, Asami Y, Tanaka K et al: Anti-angiogenic effects of thalidomide: expression of apoptosis-inducible active-caspase-3 in a three-dimensional collagen gel culture of aorta. *Histochem Cell Biol*, 2004, 122: 27–33.
- 8) Suda H, Asami Y, Murata E et al: Immuno-histochemical expression of $\alpha 1$, $\alpha 2$ and $\alpha 3$ integrin subunits during angiogenesis *in vitro*. *Histol Histopathol*, 2004, 19: 735–742.
- 9) Nagatoro T, Fujita K, Murata E et al: Angiogenesis and fibroblast growth factors (FGFs) in a three-dimensional collagen gel culture. *Okajimas Folia Anat Jpn*, 2003, 80: 7–14.
- 10) Basilico C, Moscatelli D: The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res*, 1992, 59: 115–165.
- 11) Schwartz SM, Liaw L: Growth control and morphogenesis in the development and pathology of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993, 21 [Suppl]: S31–49.
- 12) Fahmy RG, Dass CR, Sun LQ et al: Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth. *Nat Med*, 2003, 9: 1026–1032.
- 13) van Aalst JA, Burmeister W, Fox PL et al: Alpha-tocopherol preserves endothelial cell migration in the presence of cell-oxidized low-density lipoprotein by inhibiting changes in cell membrane fluidity. *J Vasc Surg*, 2004, 39: 229–237.

- 14 Knighton D, Ausprunk D, Tapper D et al: Avascular and vascular phases of tumour growth in the chick embryo. *Br J Cancer*, 1977, **35**: 347–356.
- 15 Farrell CL, Megyesi J, Del Maestro RF: Effect of ibuprofen on tumor growth in the C6 spheroid implantation glioma model. *J Neurosurg*, 1988, **68**: 925–930.
- 16 Shweiki D, Neeman M, Itin A et al: Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, **92**: 768–772.
- 17 Pendurthi UR, Rao LV: Suppression of transcription factor Egr-1 by curcumin. *Thromb Res*, 2000, **97**: 179–189.
- 18 Khachigian LM, Collins T: Inducible expression of Egr-1-dependent genes. A paradigm of transcriptional activation in vascular endothelium. *Circ Res*, 1997, **81**: 457–461.
- 19 Fahmy RG, Khachigian LM: Antisense Egr-1 RNA driven by the CMV promoter is an inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation and regrowth after injury. *J Cell Biochem*, 2002, **84**: 575–582.
- 20 Biesiada E, Razandi M, Levin ER: Egr-1 activates basic fibroblast growth factor transcription. Mechanistic implications for astrocyte proliferation. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 18576–18581.
- 21 Houston P, Campbell CJ, Svaren J et al: The transcriptional corepressor NAB2 blocks Egr-1-mediated growth factor activation and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **283**: 480–486.
- 22 Neuhaus T, Stier S, Totzke G et al: Stromal cell-derived factor 1alpha (SDF-1alpha) induces gene-expression of early growth response-1 (Egr-1) and VEGF in human arterial endothelial cells and enhances VEGF induced cell proliferation. *Cell Prolif*, 2003, **36**: 75–86.
- 23 Santiago FS, Lowe HC, Day FL et al: Early growth response factor-1 induction by injury is triggered by release and paracrine activation by fibroblast growth factor-2. *Am J Pathol*, 1999, **154**: 937–944.
- 24 Vincent T, Hermansson M, Bolton M et al: Basic FGF mediates an immediate response of articular cartilage to mechanical injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, **99**: 8259–8264.
- 25 Silverman ES, Collins T: Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology. *Am J Pathol*, 1999, **154**: 665–670.

An *In Vitro* Model for Studying Micro-vascular Injury Using a Three-dimensional Collagen Gel Culture

Keiko Fujita¹ and Masumi Akita²

¹Department of Anatomy, ²Division of Morphological Science, Biomedical Research Center, Saitama Medical School, Saitama, Japan

Key words: vascular injury, angiogenesis, FGF-2, Egr-1, collagen gel culture

When a mouse aortic explant is cultured in collagen gels, capillary-like tubes are formed from the aortic explant in the gel. After a newly formed capillary-like tube was cut with a razor, expression of angiogenic factor FGF-2 and transcription factor Egr-1 was examined. Expression of Egr-1 increased 90 minutes post-operation. While the expression of Egr-1 decreased, the expression of FGF-2 was still observed. Our study suggests that this model may become useful in analysing gene expression after micro-vascular injury. (J Jpn Coll Angiol, 2005, **45**: 637–641)