

血管形成のスクリーニング業務一覧

In vitro 解析

- ・内皮細胞のチューブ形成
- ・大動脈リングアッセイ
- ・P-Sp培養
- ・内皮細胞運動能解析
- ・Tie2受容体のリン酸化解析 **new line up**
(ウェスタンブロッティングによる)
- ・電気抵抗性を用いた血管バリア機能のテスト **new line up**

疾患関連

- ・腫瘍血管新生
- ・大腿動脈結紮虚血モデル

In vivo 解析

血管新生実験 :

- ・マトリゲルプレークアッセイ
- ・角膜法

透過性実験

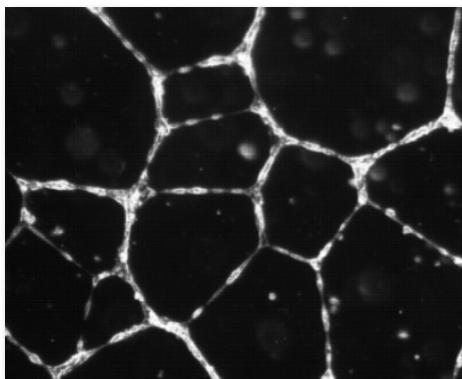
- ・マイルスアッセイ
- ・マスタードオイル法

その他

- ・鶏卵を用いたCAM解析
- ・血管・リンパ管組織解析
- ・内皮細胞増殖テスト

内皮細胞のマトリゲルを用いたチューブ形成解析

In vitro tube formation analysis of endothelial cells using matrigel



マトリゲルという基底膜成分が豊富に含まれるゲルあるいはコラーゲンゲルに、血管形成を誘導する成長因子などを添加して血管内皮細胞（臍帯静脈内皮細胞など）をゲル内で培養すると、内皮細胞同士が連結して、索状の構造物（一部管腔を形成する）が観察される。ネットワークを形成する血管内皮細胞の長さ、索状構造の大きさ、あるいは分岐ポイントを計測して、血管新生における管腔形成の評価を行うアッセイである。

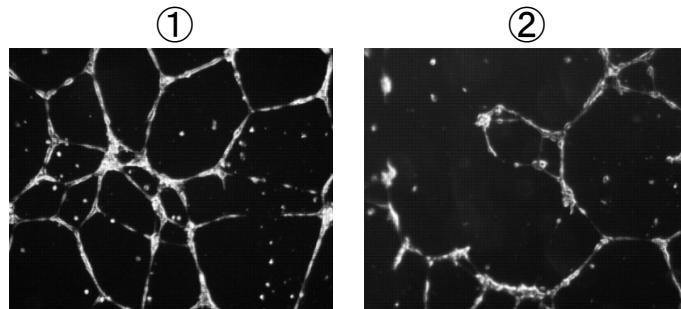
参考文献

Kidoya H, et al. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. EMBO J 2008; 27:522-34.

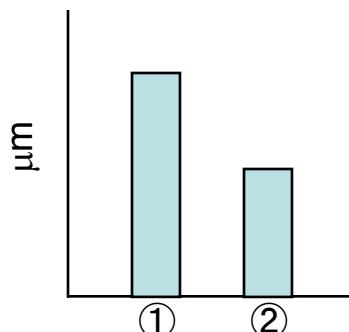
解析レポートの例



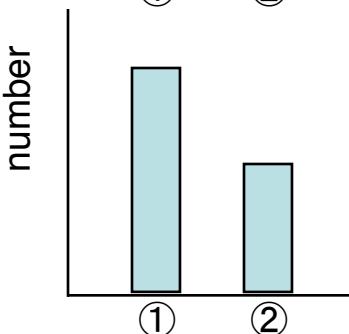
- ①VEGF(管腔形成を誘導するコントロールとして)
- ②委託を受けた物質



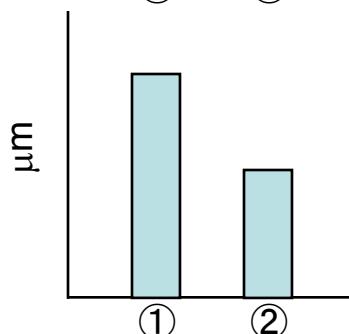
1) 血管長



2) 分岐数



3) 管腔径



総合評価: VEGFに比較した場合、あるいはVEGFなど血管新生促進物質により誘導される管腔形成における、依頼物質の血管形成におよぼす影響を観察する。

大動脈リングアッセイ

Aorta ring assay



マウスの大動脈を輪切りにして、マトリゲルやコラーゲンゲルの中で輪切りの大動脈の器官培養を行う。切断面から、内皮細胞による毛細血管の形成が観察できる。加える分子によって、発芽血管数、血管長、血管径に変化が観察される。

参考文献

Kidoya H, et al. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. EMBO J 2008; 27:522-34.

解析レポートの例

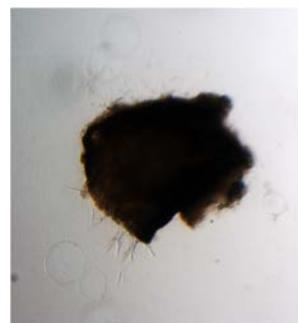
①VEGF(管腔形成を誘導するコントロールとして)

②委託を受けた物質

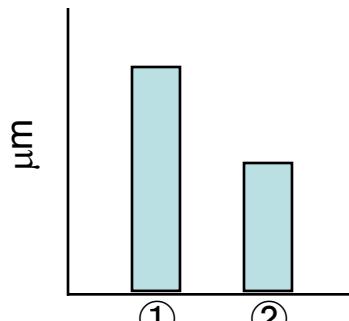
①



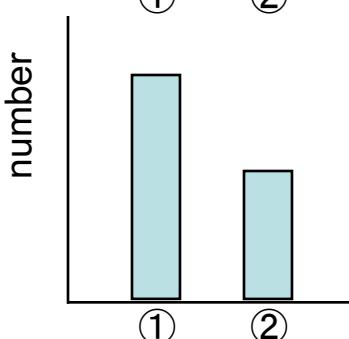
②



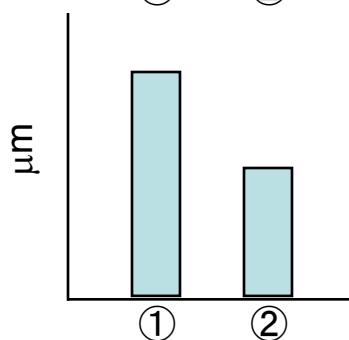
1) 血管長



2) 発芽数



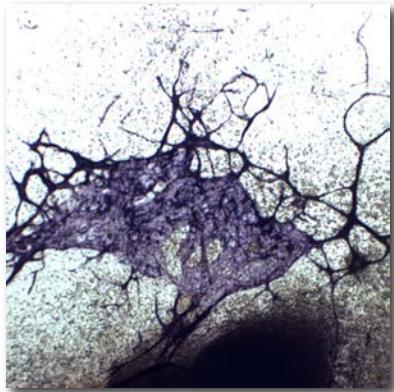
3) 管腔径



総合評価: VEGFに比較した場合、あるいはVEGFなど血管新生促進物質により誘導される管腔形成における、依頼物質の血管形成におよぼす影響を観察する。

P-Sp 培養

P-Sp culture



青紫に染まっているのが内皮細胞(CD31抗体染色)

9.5日目の未分化な血管系前駆細胞を豊富に含む傍大動脈臓側板中胚葉(Para-aortic splanchnopleural mesoderm)をOP9ストロマ細胞上で器官培養することにより、VEGFに依存して形成される脈管形成と、Ang1依存性の血管網の形成、つまり血管新生を同時に観察できる培養系を開発した。この培養系では、まず組織片から同心円上に移動してきた内皮前駆細胞がシート形成を営み、そこから内皮細胞が発芽して網状構造を形成する。内皮細胞の発生から分化までを包括的に解析できる培養系であり、細胞株とは違って、生理的な内皮細胞の増殖程度、血管網形成などを観察できる。また、この培養系では、壁細胞も同時に発生することから、内皮細胞と壁細胞の細胞間相互作用が観察できる。

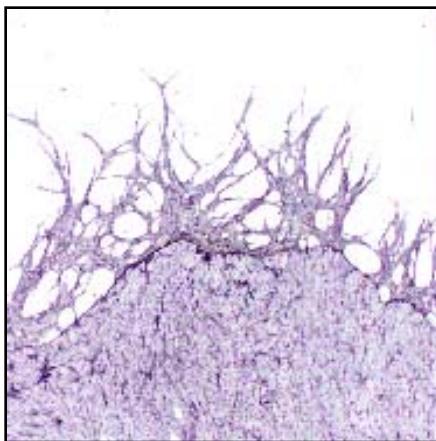
参考文献

- 1) Takakura N, Watanabe T, Suenobu S, Yamada Y, Noda T, Ito Y, Satake M, and Suda T. A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell* 102, 2, 199-209, 2000.
- 2) Takakura N, Huang XL, Naruse T, Hamaguchi I, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Suda T. Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis. *Immunity* 9 : 677-86, 1998

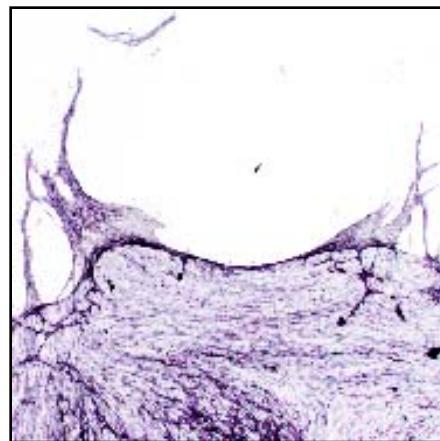
解析レポートの例

- ①VEGF(管腔形成を誘導するコントロールとして)
- ②委託を受けた物質

①



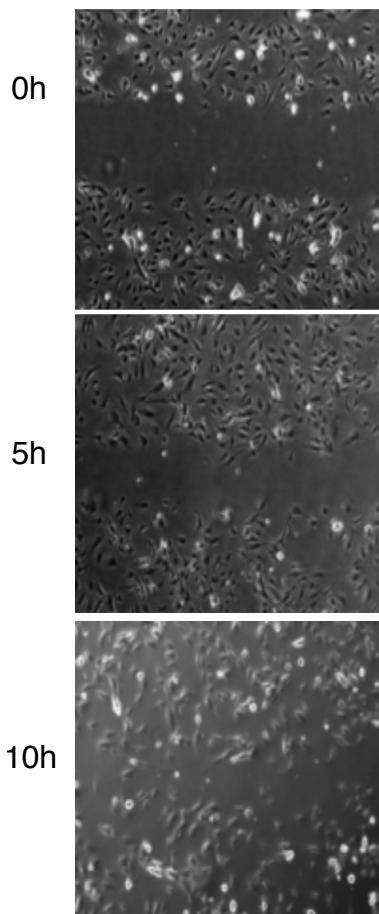
②



総合評価: シート形成に与える影響、血管網に与える影響、また壁細胞の発生頻度など総合的に判断して、依頼物質の血管形成に与える影響を報告する。

内皮細胞運動能解析

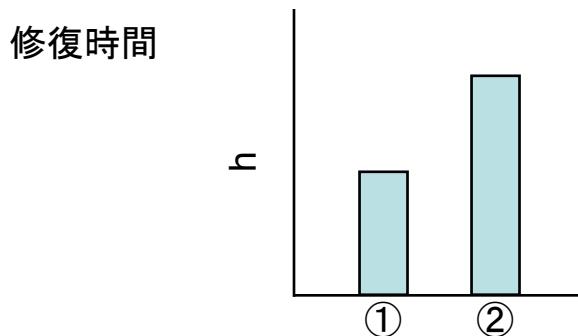
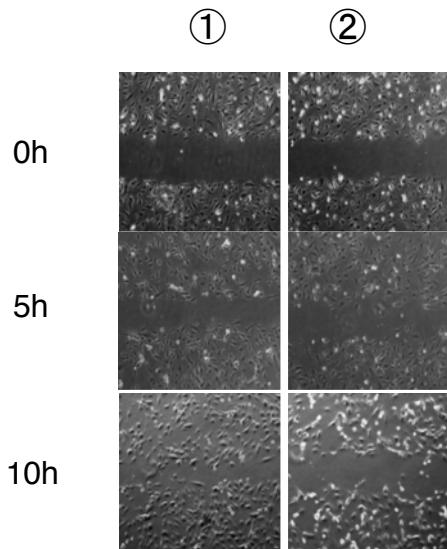
wound healing assay



培養皿一面にコンフレントな状態に内皮細胞を培養し、100-200μmほどの傷をつけることで、傷つけられた内皮細胞の部分に新たに内皮細胞が伸展して、傷の領域に内皮細胞が覆うのを観察する方法。内皮細胞の運動能を主に観察する。

解析レポートの例

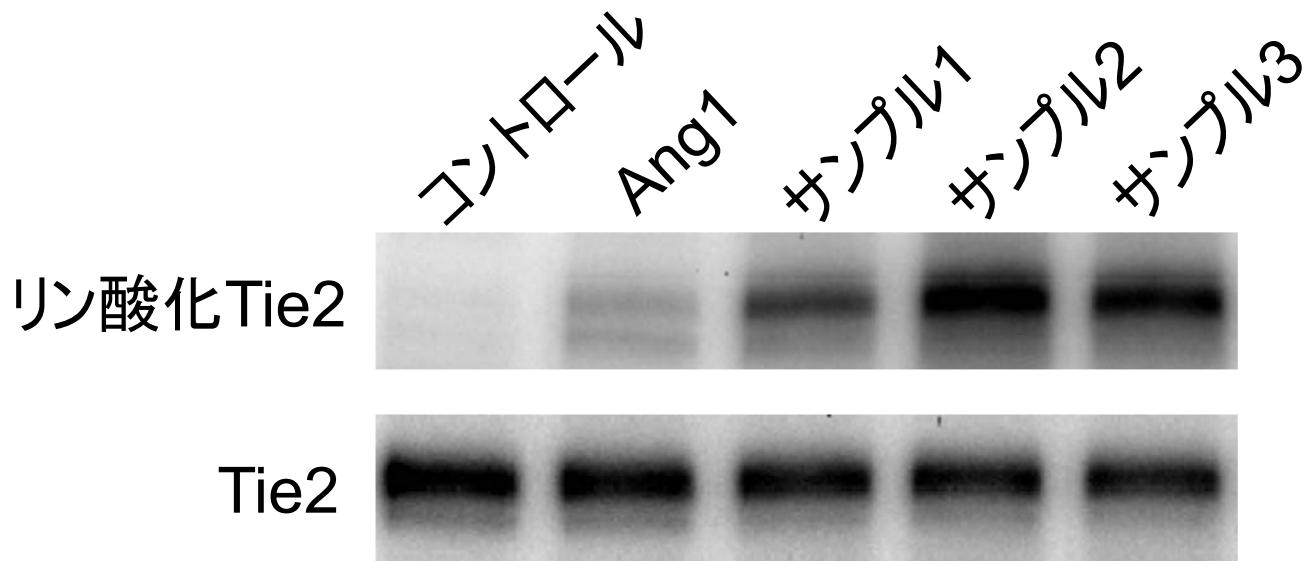
- ①VEGF(管腔形成を誘導するコントロールとして)
- ②委託を受けた物質



総合評価：運動能における評価を行う。

Tie2受容体のリン酸化解析

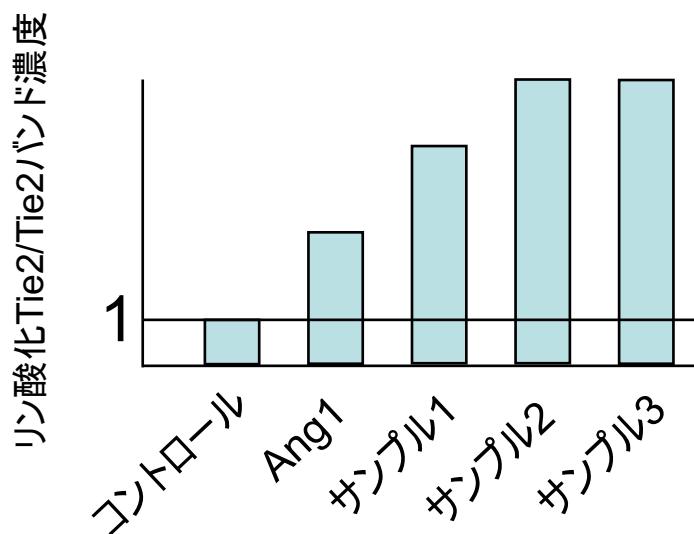
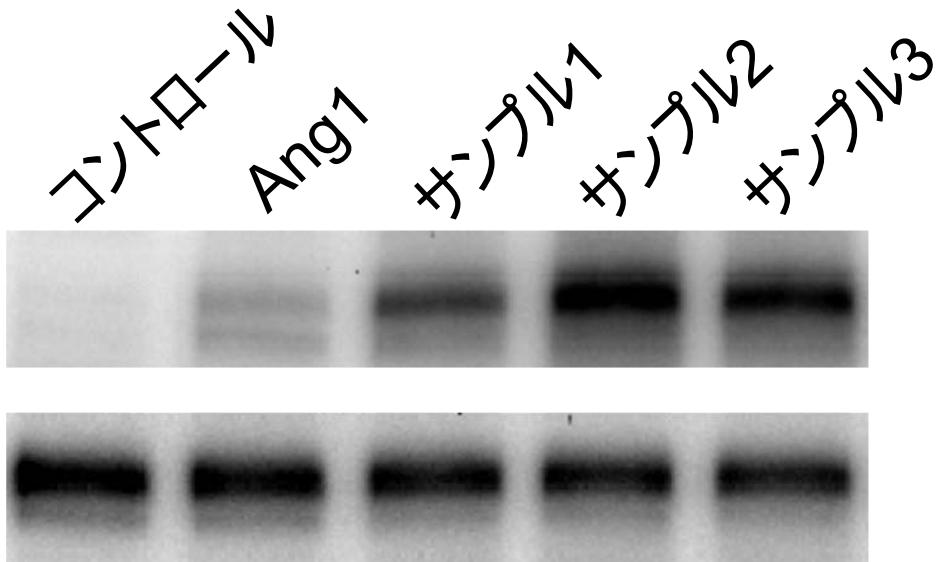
Western blotting



ヒトTie2受容体を発現させたBリンパ球細胞株に対して、
Tie2の生理的リガンド(Angiopoietin-1; Ang1)を添加した際の
Tie2の活性化(リン酸化Tie2)に比べ、比較したいサンプル
を添加した際のTie2リン酸化の程度を解析する。

Tie2受容体は血管内皮細胞同士の接着を促して、血管透過性を抑制する。
炎症や老化に伴う、血管の劣化を抑制する効果が期待されている。

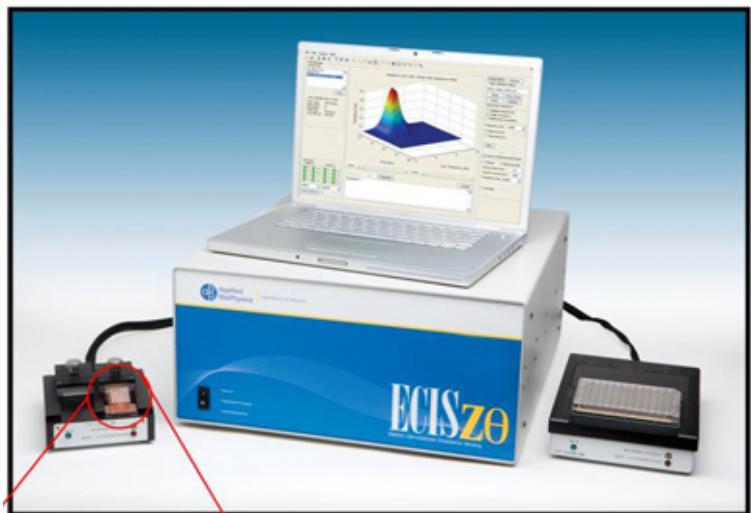
解析レポートの例



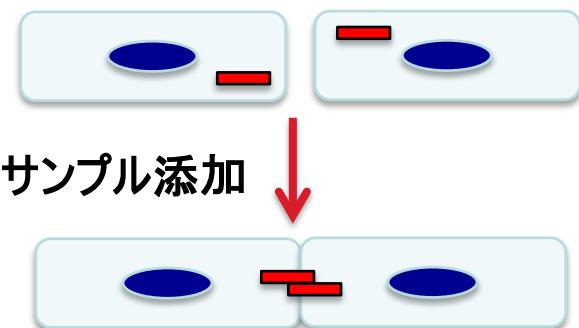
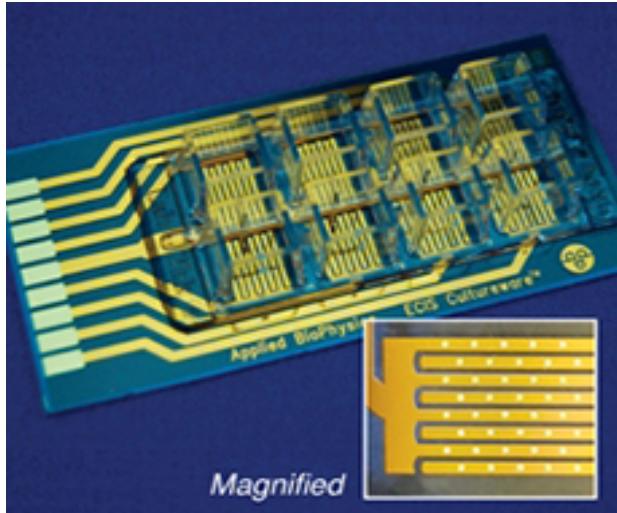
総合評価: リン酸化 Tie2 / Tie2 をコントロールで 1 とした時の比較

電気抵抗性を用いた血管バリア機能のテスト

ECIS-Z θ real time cell analyzer



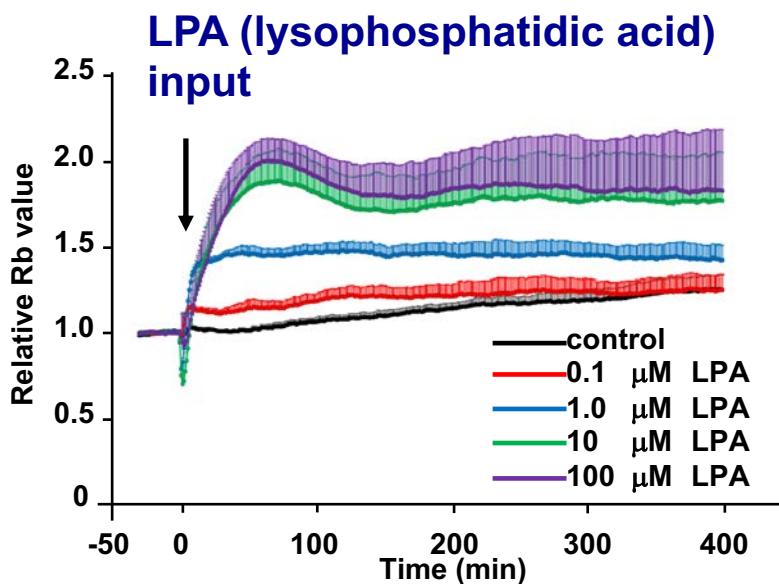
Culture plate with electrode



電気抵抗性↑

底部に電極を張り巡らせた培養皿の上で、血管内皮細胞を培養しサンプル添加後、低周波を用いて電気抵抗性を観察し、内皮細胞間のバリア機能を解析する。

解析レポートの例

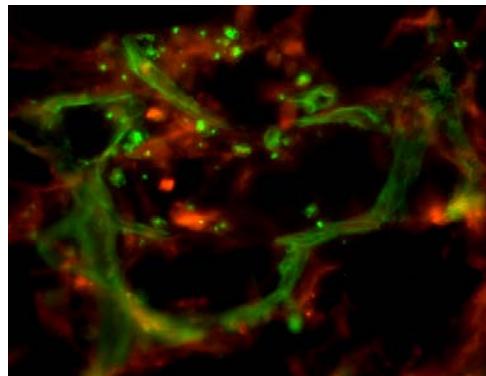


LPAの添加後に、LPAの用量依存的に電気抵抗性が上昇する
(Takara et al. Cell Report 2017参照)

電気抵抗性が強ければ、血管の安定化を誘導する物質と判断する。

マトリゲルプラグアッセイ

Matrigel plug assay



緑の蛍光色に染まっているのが内皮細胞(CD31抗体染色)

matrigel plug assayと一般的に呼ばれている方法である。マトリジエルという基底膜成分が豊富に含まれるジェルにヘパリンを添加し、さらに血管形成を誘導する成長因子や細胞を添加し成体マウスの皮下に注入する。4°Cではジェルは液化しており、皮下に注入することで即座にジェルは固形化する。添加する成分にも依存するが、注入後4日目にはジェル内に血管形成が誘導されており、血管形成の程度を1) 蛍光色素を尾静脈から投与して、ジェル内に取り込まれた量を測定する2) ジェルに含まれるヘモグロビン量を測定することにより、測定する。ジェルの組織切片を作成し、実際に血管形成の様子をPECAM-1/CD31に対する抗体で免疫染色して観察することも可能である。添加する成分によって脈管形成、血管新生の両方の解析が可能である

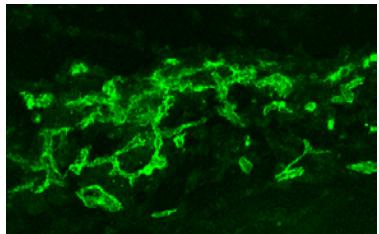
参考文献

- Takakura N, Watanabe T, Suenobu S, Yamada Y, Noda T, Ito Y, Satake M, and Suda T. A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell* 102, 2, 199-209, 2000.
- Passaniti A, Taylor RM, Pili R, Guo Y, Long PV, Haney JA, Pauly RR, Grant DS, Martin GR. : A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab. Invest.*, 67: 519-528, 1992.

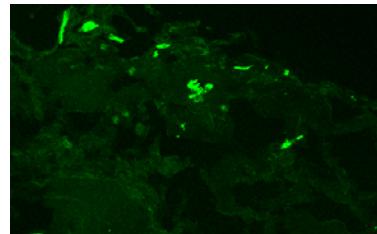
解析レポートの例

- ①VEGF(管腔形成を誘導するコントロールとして)
- ②委託を受けた物質

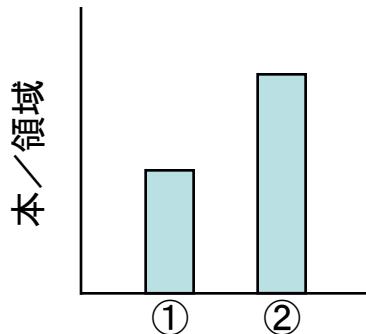
①



②



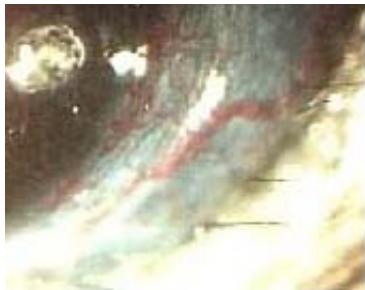
血管密度



総合評価: 血管密度などについて報告する

角膜法

Cornea assay



Cornea Assayと呼ばれる。角膜は元来無血管で透明な組織であることを利用するものである。ポリアクリルアミドなどを支持体として、成長因子をこれにしみ込ませペレットとして角膜実質に挿入し、数日後、角膜辺縁部からペレットに向かう新生血管を肉眼的にあるいは実体顕微鏡下で観察する。一般的にウサギを用いることが多いが、マウスでも十分可能である。本法では血管新生の過程を観察するのに有効である。

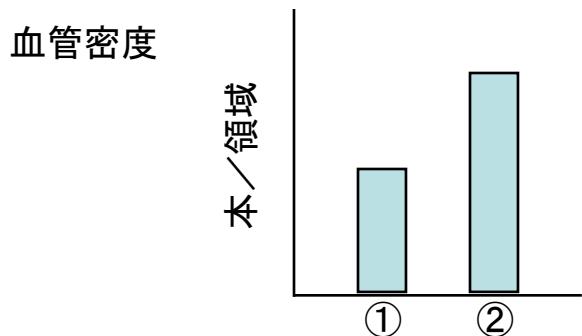
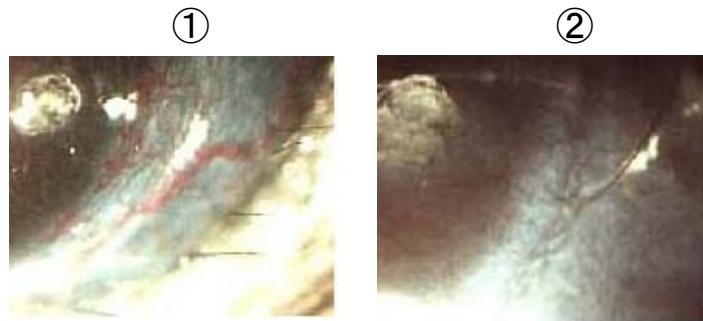
参考文献

Kidoya H, et al. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. EMBO J 2008; 27:522-34.

Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J.: Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. Dev. Biol., 38: 237-248, 1974.

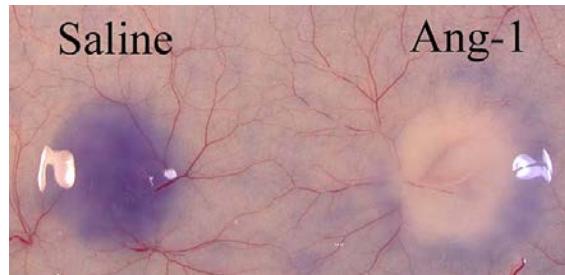
解析レポートの例

- ①VEGF(管腔形成を誘導するコントロールとして)
- ②委託を受けた物質



総合評価：血管密度などについて報告する

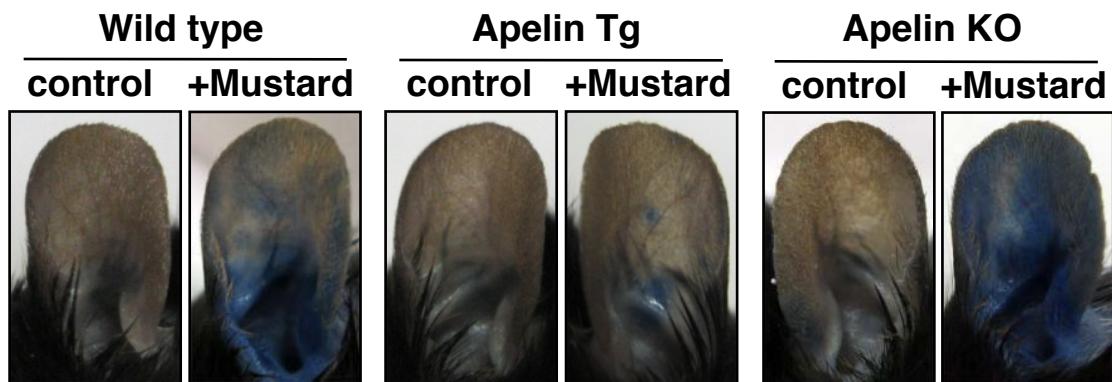
Miles assay



血管形成の過程では、血管内皮細胞同士のadherent junctionを介した接着、あるいは内皮細胞と壁細胞との接着により、血管構造は安定化し、さらに血管内の細胞及び液成分を組織内に漏らさないよう透過性を維持するシステムが発達してくる。しかし、炎症などが組織で発生すると、血液成分の組織内への透過性が高まる。このような透過性の亢進は浮腫などの病態に密接に関わっており、この透過性に関する分子の解析は動物実験を用いて行なうことができる。一般的にマイルスアッセイと呼ばれるが、尾静脈よりエバンスブルーという青色の色素を注射しておき、実験動物の皮下に試験する分子を注射する。透過性を亢進する分子であれば、皮下に色素が滲出してくるのを肉眼的に観察する方法である。実測としては、漏出した色素量を分光光度計を用いて測定して、評価する。

Murohara T., Horowitz J. R., Silver M., Tsurumi Y., Chen D., Sullivan A., Isner J. M. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation*, 97: 99-107, 1998.

マスター ドオイル法



遺伝子改変マウスを用いた透過性実験では、エバンスブルーを投与後、耳の皮膚にマスター ドオイル塗布による類炎症反応を誘導し、血管透過性を解析する方法も用いられる。

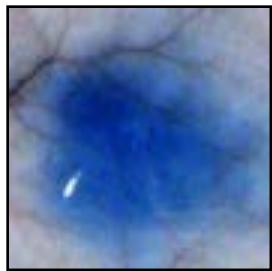
参考文献

Kidoya H, Naito H, and Takakura N. Apelin induces enlarged and non-leaky blood vessels for functional recovery from ischemia. *Blood* 115, 3166-3174, 2010.

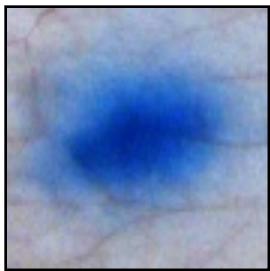
解析レポートの例

- ①VEGF(管腔形成を誘導するコントロールとして)
- ②委託を受けた物質(濃度a, b)

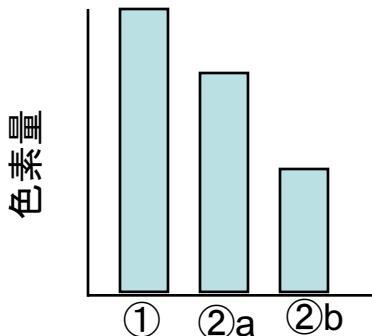
①



②a



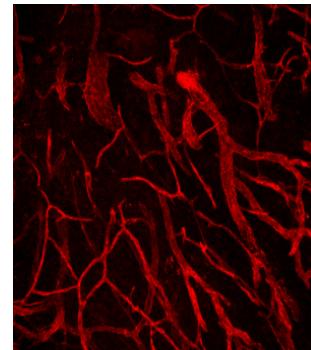
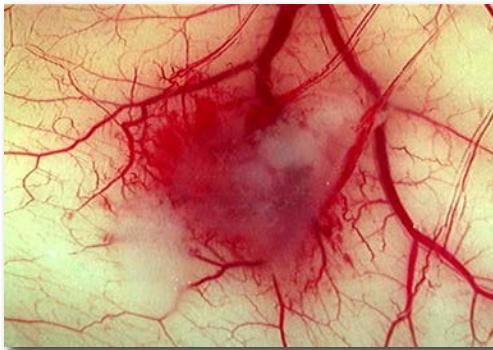
②b



総合評価:写真データおよび色素量のデータを報告する

腫瘍血管新生

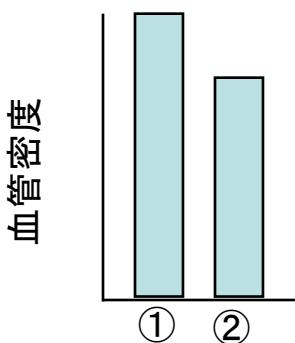
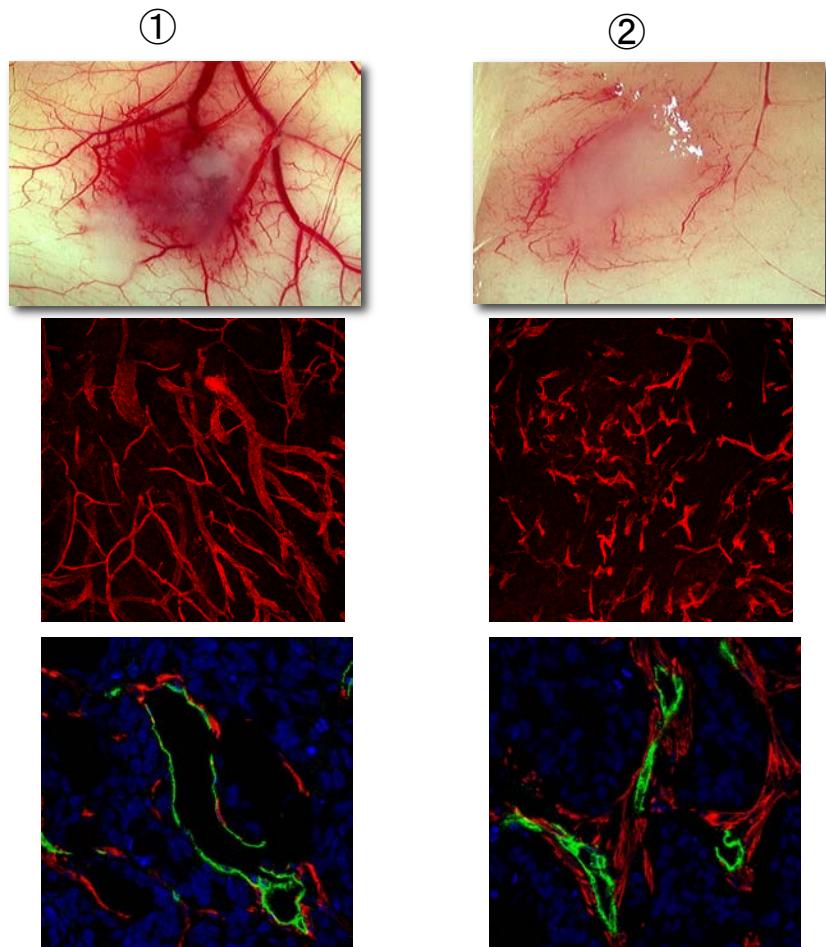
tumor angiogenesis



腫瘍の増大には腫瘍内に伸長する栄養血管の形成が必要である。この腫瘍内の血管形成は主に既存の血管から腫瘍内に新生血管が伸長する血管新生の過程で営まれる。そこで^{in vivo} に腫瘍細胞を移植して経時的に血管の形成を観察する手段が用いられる。本法ではおもに、腫瘍細胞を実験動物の皮下、皮内、腹腔内に注入して血管新生を観察する方法が一般的である。マウスの背部皮下組織が腫瘍の増大の経時的観察が容易であり繁用される。

解析レポートの例

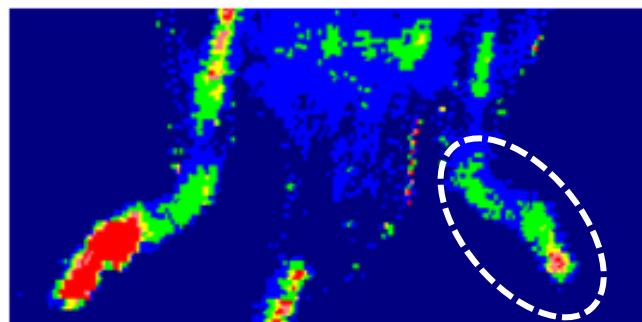
- ①コントロール
- ②委託を受けた物質



総合評価：写真データおよび新生血管領域のデータを報告する

大腿動脈結紮虚血モデル

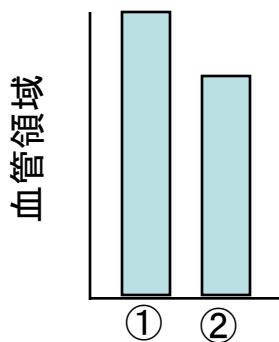
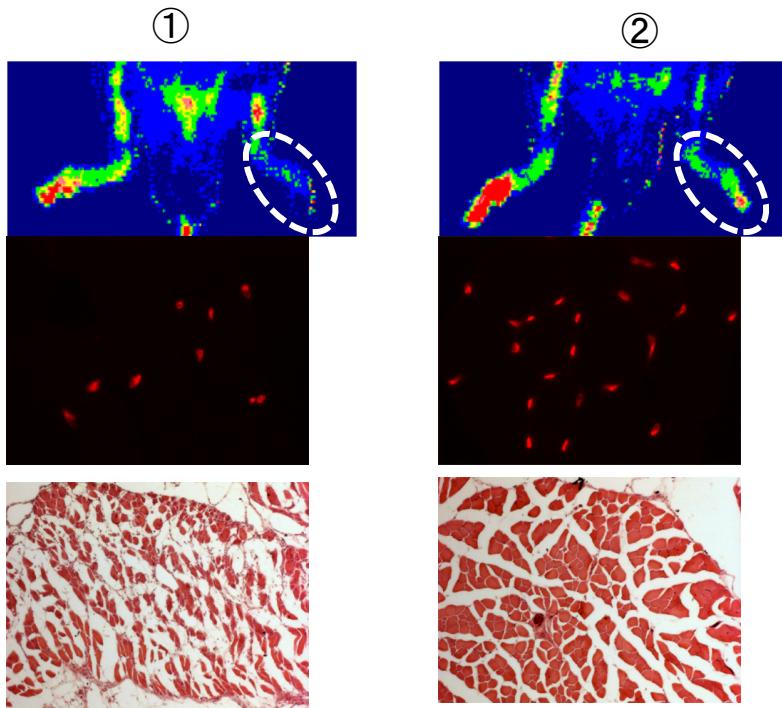
Hindlimb ischemia model



バージャー病や慢性閉塞性動脈硬化症(ASO)における血管障害をマウスを用いて片側の大腿動脈を結紮あるいは結紮除去して、その後に誘導される側副血管の形成を、細胞、遺伝子、成長因子を投与してその促進あるいは抑制効果を判定するモデルが開発されている。本法の利点は、新生血管形成の程度を下肢の虚血に伴う体温の低下を指標にレーザードップラーで経時的に観察したり、血管造影により血管形成を可視化できる点である。

解析レポートの例

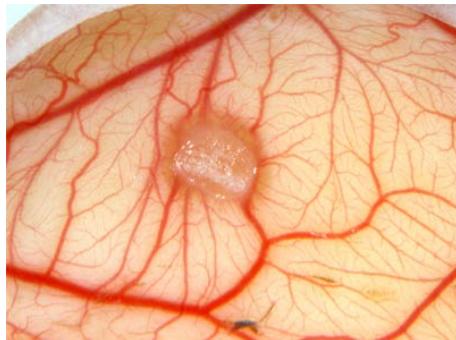
- ①コントロール
- ②委託を受けた物質



総合評価: 写真データおよび新生血管領域のデータを報告する

鶏卵を用いたCAM解析

Chick chorioallantois method



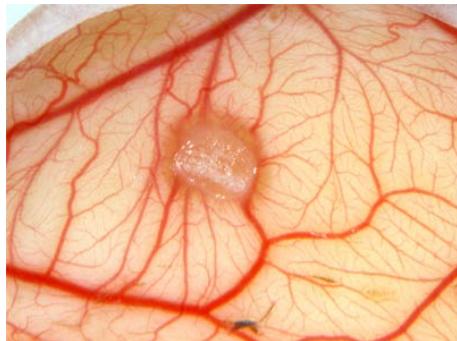
CAM法と呼ばれる。ニワトリの卵殻に小孔をあけ、漿膜の上に成長因子を混合した半固体培地であるメチルセルロースに添加したものを配置する。数日後にペレットに向かって伸長する新生血管の形成を観察する。逆に、血管形成を抑制する分子の解析にも使用でき、本法は簡便に行えることから、腫瘍血管形成の抑制分子のスクリーニングにおいて繁用される。

Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J.: Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. Dev. Biol., 38: 237-248, 1974.

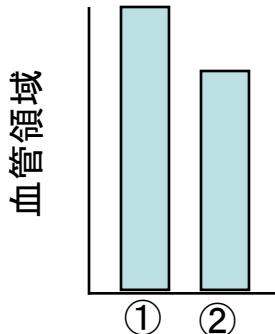
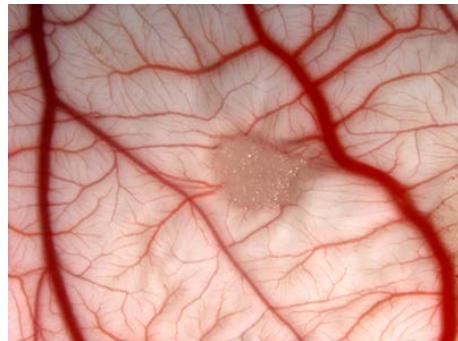
解析レポートの例

- ①コントロール
- ②委託を受けた物質

①



②



総合評価:写真データおよび新生血管領域のデータを報告する

- ・血管・リンパ管組織解析
- ・内皮細胞増殖テスト

