



癌の微小循環系を 三次元イメージングする

東京女子医科大学医学部 解剖学・発生生物学講座 北原 秀治

■私ども東京女子医科大学解剖学・発生生物学講座では、江崎太一主任教授が2001年に就任して以来、微小循環系にスポットをあてた研究を行っている。生体内に三次元的に広がる微小循環系ネットワークの変化を正確に把握することは、炎症や腫瘍をはじめ、さまざまな病態における診断や治療に極めて重要である。そのメカニズムを解明するためには、できるだけ生理的条件下で自然のままの三次元像を簡便に入手する方法が必要となってくる。そこで、最近特に注目を集めているのがレクチンを用いた血管網の描出法である。筆者も、このレクチンによる血管描出法に加え、さらに独自に多重免疫染色法や電子顕微鏡を併用して、腫瘍内の血管やリンパ管を同時に三次元的にイメージングする手法で研究を行っている。この方法は、自然な血流を利用して血管を標識できるだけでなく、初心者でも手軽に信頼性の高い血管網の構築イメージが得られる点で今後も研究応用が期待される。

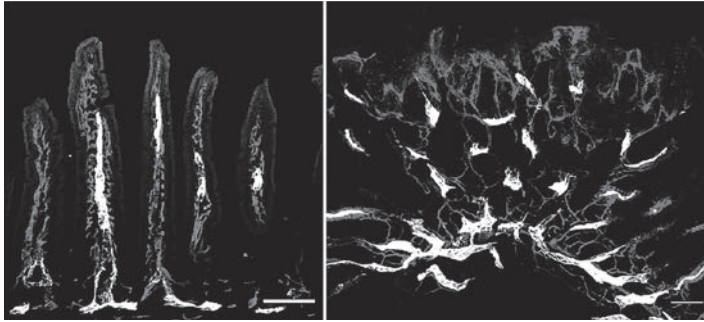
本稿では、筆者が最近使用している、大腸癌の実験動物モデルに使用されている APC^{Min/+} マウス（大腸癌の原因である APC 遺伝子を不活化させたマウスで、小腸にポリープを自然発症する）を用いた例を中心に、腫瘍の微小循環系の描出方法ならびに多重免疫染色法を併用した三次元イメージング法を紹介したい。

■これまで腫瘍の血管網の観察には、樹脂を血管内に注入後重合させ、周囲の軟部組織を漂白剤などで除去したものを走査型電子顕微鏡で観察するという手段などが用いられてきた。これらの手

法は特殊な技能が必要であり、一般の研究者や、臨床から研究に来る若い研究者たちにとっては技能の取得に非常に時間がかかり、難しく、成功率も低い。そこで開発されたのが、レクチンを使った血管のイメージング法^{1,2)}である。これは、ある種のレクチンが血管内皮表面に存在する特定の糖鎖に結合するという性質を利用して、血管の内面を標識して可視化しようというものである。蛍光色素やビオチンなどで標識された特定のレクチンを動物の血管内に注入し、血流とともにしばらく循環させるだけで全身の血管系が標識されることになるので、特殊な技術や装置などは必要ない。つまり、血流のあるところであれば、全身のすべての血管系が自然のままの状態で観察が可能となる。そこで、100 μm 前後の厚切りの切片標本を作り、それを共焦点レーザー走査顕微鏡で三次元的に解析することにより、組織内の複雑なネットワークが一目瞭然となる。

基本的には、高脂肪食や、硫酸デキストランナトリウムを一定期間摂取させ、悪性腫瘍の発症を促進させた APC^{Min/+} マウスの尾静脈から、FITC を標識したトマトレクチンを、ゆっくり時間をかけて静注する。その後灌流固定を行い、目的の腫瘍（小腸）を切り出し、切片を作製する。必要に応じて、多重免疫染色を併用し、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて観察する。これ以外に、筆者は腫瘍の全体像を把握するために、通常の蛍光顕微鏡とモニタージュ作製ソフトを使用し、数十枚～数百枚の写真を組み合わせた腫瘍全体の微小循環のモニタージュ写真も作製している。

では、腫瘍の血管、リンパ管がどのように観察



図：左図はマウスの正常小腸、右図は高脂肪食を与えた APC^{Min/+} マウス小腸に発症した adenocarcinoma。まず、FITC 標識トマトレクチンを静脈注射して、全身の血管網を緑色に蛍光標識した後、厚さ 100 μ m の凍結切片を作製し、リンパ管マーカーである LYVE-1 を用いて蛍光抗体法で免疫染色したもの。(写真では暗い方がトマトレクチン陽性の血管網、明るい方が LYVE-1 陽性のリンパ管；モニター写真) Scale bar: 100 μ m

できるのか？ どのような血管構築においても、組織切片で血管を二次元的に観察する限り、単に大きさの違う管の切口が見えるに過ぎない。これに対して、今回のレクチン標識法を用いることによってほぼ生理的状态で、つまり自然のままの血管ネットワーク像を得ることで局所での微小循環系の構築を正確にとらえることができる。われわれは、これにさらに多重免疫染色法を併用している。これによって、完成した腫瘍における新生血管とリンパ管との相互の位置関係は図の通りである (図)。このように、正常組織と比較することで、いかに腫瘍血管、リンパ管が異常な形態に変化しているかが正確に把握できる。筆者の APC^{Min/+} マウスを用いた研究では、このようにして描出された微小循環系を、正常組織から、腺腫、腺癌へと変化する adenoma-carcinoma sequence にあてはめて解析を行った。すると、上皮が腫瘍化していく段階で、良性腫瘍 (腺腫) においては、新生血管は著しく形態的变化し、密度を増し、基底膜の不安定化が起こっていた。これらの血管形態の異常のみならず、標識レクチンを用いることによって、血管透過性の亢進や、出血などの機能異常を視覚的にとらえることも可能となった。また、電子顕微鏡を用いて微細構造を見てみると、血管の内腔表面にも変化が認められた。腫瘍が悪性化するにつれて、新生血管は形態的变化が著しく異型性を伴っていた。このように、レクチンを用いた三次元解析やモニター写真に電子顕微鏡を併用することで、上皮の悪性化に伴う微小循環系の変化を、可視化することに成功した。

ところで、レクチンによる血管標識のみでは、血管壁構造に関する情報、つまり血管やリンパ管の外側の情報が分からない。そこでこの欠点を補う意味でも、同じ血管内皮細胞のマーカーに対する抗体で、外側から免疫染色することによって、血管の内と外を同時に観察することができる。これは、腫瘍血管新生において、まだ血流の完成していない出芽部の新生血管や、退縮しつつある血管を捕まえるのにも極めて有効な方法である^{3,4)}。さらには、今回の多重免疫染色法のほかに、動物にレクチンを投与し血管を標識する前に、例えば BrdU などの DNA 前駆物質を注射して前もって生体内での増殖細胞をラベルしておいたり、あるいはあらかじめ色素や異物を取り込ませた細胞を生体内に投与することによるトレーサー追跡などの前処置をすることで、立体像解析での情報量を追加することも可能である。

■ 以上のように、レクチンによる血管標識法と多重免疫染色法を併用することにより、血管系の内面構造と外面構造の両面を同時に観察し、より完璧な血管網の実体を把握できることになる。腫瘍などさまざまな病態の研究領域において、今後も局所の微小循環系のネットワークの三次元イメージングの用途はますます広がると思われる。微小循環系ネットワークの変化を三次元的に正確に把握することがその病態を正しく理解することになり、その診断や治療にも役立つことは言うまでもない。現在筆者は、消化管腫瘍の微小循環系の形態を明らかにすることで、血管やリンパ管を指標にした新しい診断法、治療法への応用を模索して

いる。当研究室は他研究室との交流を重視して非常にオープンなので、われわれのアプローチに興味のある方はいつでも連絡をいただきたい。

(参考文献)

- 1) Thurston, G., Baluk, P., Hirata, A. et al. : Permeability - related changes revealed at endothelial cell borders in inflamed venules by lectin binding. *Am J Physiol* 271 : H2547 - H2562, 1996.
- 2) Ezaki, T., Kuwahara, K., Morikawa, S. et al. :

Production of two novel monoclonal antibodies that distinguish mouse lymphatic and blood vascular endothelial cells. *Anat Embryol* 211 : 379-393, 2006.

- 3) Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T. et al. : Abnormalities in Pericytes on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors. *Am J Pathol* 163(3) : 985-1000, 2002.
- 4) Kitahara, S., Morikawa, S., Shimizu, K. et al. : Alteration of angiogenic patterns on B16BL6 melanoma development promoted in Matrigel. *Med Mol Morphol* 43(1) : 26-36, 2010.

Topics



NOVARTIS
ONCOLOGY

効能・効果、用法・用量、禁忌、使用上の注意等については、製品添付文書をご参照ください。

持続性ゾマトスタチンアナログ製剤 薬価基準収載

サンドスタチン[®]皮下注用 50 μ g / 100 μ g

創薬 | 処方せん医薬品 | 注意-医師等の処方せんにより使用すること

Sandostatin[®] for s.c. injection | オクトレオチド酢酸塩注射液

製造販売 (資料請求先)
ノバルティス ファーマ株式会社
東京都港区西麻布4-17-30 〒106-8618

NOVARTIS DIRECT
☎ 0120-003-293
受付時間 月-金 9:00-18:00
www.novartis.co.jp