

学位論文題名

# ラット副腎自家移植再生における血管増生に関する検討

## 学位論文内容の要旨

**緒言:** 両側副腎腫瘍の治療は両側摘除が標準的であり、術後は終生ステロイド補充が必要である。現在までに副腎自家移植はごく一部の症例に行われているにすぎず、一般的な治療法ではない。副腎皮質移植が可能となれば生理的日内リズムのホルモン分泌やストレスに対する適応能力の回復を持つ利点がある。

げっ歯類のモデルでは副腎皮質移植は可能である。両側副腎摘除後、副腎皮質細胞の移植を腎被膜下、大網または皮下に行われている。臓器、組織移植が成功するには血管新生が必要であり、特に血管内皮細胞増生因子(VEGF)が血管新生に重要とされている。肝臓の再生、膵β細胞移植における VEGF と Flk-1、FIt-1 の発現は過去に報告されているが、副腎皮質再生における検討はいまだかつてない。本研究ではラット副腎皮質移植後の再生における VEGF、Flk-1 と FIt-1 の発現の推移を研究した。

**材料及び方法:** 1. 実験動物および処置: 週齢 8-9 週の雄 Wistar ラットを麻酔後、両側副腎摘除し、副腎被膜組織を腹直筋のポケットに移植。術後 1、2、3、4 週目で頸椎脱臼後直ちに採血、移植副腎を採取した。術後のステロイドの補充は行わなかった。12 週齢の同ラットをコントロールとした。  
2. 採血サンプルの分析: コルチコステロンは高速液体クロマトグラフィー法で測定した。  
3. RNA の抽出と RT-PCR 反応: TRI Reagent で再生副腎から RNA を抽出。12 週齢の副腎皮質をコントロールとした。VEGF、Flk-1、FIt-1 の mRNA の検出は総 RNA 0.2 μg を使用し RT-PCR 反応を行った。産物はエチジウムブロマイドを含む 1.5% のアガロースゲル上に電気泳動した。その後 Transilluminator で検出し NIH image で各々 GAPDH との比を計算した。  
4. 組織学的検討: 組織は 48 時間 亜鉛固定液に浸透後、パラフィン包埋した。5 μm の切片を Hematoxylin-Eosin (HE) 染色と免疫組織染色に使用した。0.05% サポニン で抗原賦活を行った。一次抗体を 4°C 24 時間反応させた後、avidin-biotin 反応を行い DAB で発色した。Hematoxylin で対比染色した。一次抗体はウサギ抗ラットポリクローナル VEGF、Flk-1、FIt-1 と マウス抗ラット CD31 抗体を 100 倍希釈で使用した。  
5. 統計: 各群間の統計学的処理は ANOVA 検定で解析し、 $P < 0.05$  を有意差ありとした。

**結果:** 1. コルチコステロンの測定: 血清コルチコステロンは術後経時的に増加した。[コントロール:  $256.3 \pm 47$ 、1 週目:  $19.9 \pm 5$ 、2 週目:  $75.4 \pm 47$ 、3 週目:  $104.0 \pm 61$ 、4 週目:  $190.5 \pm 56$  ng/ml,  $n=6$ 、 $P < 0.01$ : コントロール vs. 1、2、3 週目、4 週目 vs. 1、2、3 週目、3 週目 vs. 1 週目]。  
2. 再生副腎組織の検討 (HE 染色、CD31 免疫組織染色): HE 染色では、移植 1 週目で組織の生着が確認された。周囲からの毛細血管が移植片に侵入し、副腎の sinusoid と結合していた。3-4 週では 1 週に比して径の増大がみられた。CD31 染色にて再生過程中副腎細胞周囲 sinusoid の再構築が見られた。  
3. VEGF mRNA、Flk-1 mRNA、FIt-1 mRNA、の発現: VEGF は経時的に増加し、コントロールが最強であった。Flk-1 は術後早期に高い発現を示した。FIt-1 は VEGF と同様の発現傾向を示した。

[ VEGF/GAPDH の比 (コントロール:  $0.39 \pm 0.09$ , 1 週目:  $0.16 \pm 0.09$ , 2 週目:  $0.19 \pm 0.09$ , 3 週目:  $0.21 \pm 0.08$ , 4 週目:  $0.37 \pm 0.08$ ),  $n=6$ ;  $P<0.01$ : コントロール vs. 1, 2, 3 週目, 4 週目 vs. 1, 2 週目 ]。 [ Flk-1/GAPDH の比 (コントロール:  $0.17 \pm 0.08$ , 1 週目:  $0.33 \pm 0.05$ , 2 週目:  $0.28 \pm 0.03$ , 3 週目:  $0.25 \pm 0.06$ , 4 週目:  $0.18 \pm 0.05$ ),  $n=6$ ;  $P<0.01$ : 1 週目 vs. コントロール, 4 週目,  $P<0.05$ : 1 週目 vs. 3, 4 週目, 2 週目 vs. コントロール, 3 週目 vs. コントロール, 4 週目 ]。 [ Flt-1/GAPDH の比 (コントロール:  $0.49 \pm 0.07$ , 1 週目:  $0.19 \pm 0.04$ , 2 週目:  $0.24 \pm 0.03$ , 3 週目:  $0.30 \pm 0.04$ , 4 週目:  $0.33 \pm 0.05$ ,  $n=6$ ;  $P<0.01$ : コントロール vs. 1, 2, 3, 4 週目, 4 週目 vs. 1, 2 週目, 3 週目 vs. 1 週目 ]。

4. VEGF, Flk-1, Flt-1 の免疫組織化学: VEGF は副腎皮質細胞の細胞質に発現し、術後経時的に増加した。4wとコントロールが同等のレベルであった。Flk-1 は副腎 sinusoid 血管と栄養血管の内皮細胞に発現し術後早期に強く発現した。また術後早期の副腎周囲には多数の Flt-1 陽性の細胞が観察された。Flt-1 は副腎の細胞質に発現し、VEGF 同様の推移を示した。

**考察および結論:** 我々の結果では副腎再生過程で副腎皮質細胞の VEGF の発現が徐々に増加、さらには血管内皮細胞においては Flk-1 の発現が一過性に亢進することを示した。さらには VEGF の除去に必要な decoy 受容体である Flt-1 の発現を副腎皮質細胞に認めた。

移植後、コルチコステロンの有意な上昇および組織の増大がみられ、副腎皮質再生が確認された。4 週では副腎移植後、球状層および束状層は同定されたが 網状層は確認できなかったが 6 ヶ月まで観察した再生副腎には網状層を観察できた。被膜移植に含まれる幹細胞より三層に分化増殖したものと考えられた。毛細血管が周辺より侵入、sinusoid 内皮に結合、さらには血管の増大を認めた。この結果と VEGF の副腎皮質での発現の増加、Flk-1 の一過性の発現の亢進を考えると以下のメカニズムが推測された。つまり副腎皮質細胞が産生する VEGF、一過性に発現の亢進した Flk-1 が 血管の新生、内皮細胞の増殖、さらには栄養血管の新生を起こす細胞を遊走させる、paracrine の作用によって、VEGF-Flk-1 システムが働くというものである。VEGF-Flk-1 の発現は術後早期の低酸素状態による刺激を受けたものと考えら得る。過去に ACTH が副腎皮質細胞における VEGF 発現を上昇させると報告されている。通常副腎摘出後のコルチコステロン減少による ACTH の上昇が予想され、それによる影響が推測される。他臓器において再生や移植早期に VEGF の一過性の発現増強が見られるが 正常成人ラット副腎でも VEGF の発現は認められる。副腎は、各種ストレスに反応してステロイドホルモンを即座に分泌するため、常に血管の維持が必要である。そのため VEGF の発現が重要であると推測される。

今回我々の実験では、Flt-1 が副腎皮質細胞に発現していた。Flt-1 は VEGF の作用をブロックする decoy 受容体と考えられており、副腎皮質細胞に発現し、再生過程で誘導された VEGF の作用が過剰に働くことを阻害し、VEGF-Flk-1 の作用を調節しているのではないかと推測した。過去の報告では Flt-1 の発現は副腎血管内皮細胞とする報告が多い。我々の副腎皮質における Flt-1 の発現理由として、肝臓同様に再生過程で増加し、VEGF による autocrine 作用により副腎皮質細胞と sinusoid 内皮細胞の移動性を高め、組織の再構築を調整していることが推測された。今後 Flt-1 の副腎皮質の役割について検討する必要がある。

今回、副腎皮質再生過程における血管新生、sinusoid 形成において VEGF, Flk-1, Flt-1 の経時的变化を観察しその重要性を示唆した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 本 間 研 一

副 査 教 授 野々村 克也

## 学位論文題名

### ラット副腎自家移植再生における血管増生に関する検討

この論文はラット副腎自家移植モデルを用いて副腎皮質再生過程における VEGF および VEGF レセプター Flk-1、Flt-1 の発現の推移を観察したものである。過去の報告では VEGF は定常状態の副腎皮質細胞に発現し、Flk-1、Flt-1 は副腎血管内皮細胞に発現するとされる。しかし、本研究と同様の検討は過去にみられない。主として免疫組織化学および RT-PCR を用いて検討を行った。移植後、副腎皮質の増殖、栄養血管の増大および副腎 sinusoid 内皮細胞の再配列が観察された。また、コルチコステロンの上昇も認められ副腎皮質の再生が確認された。その過程で VEGF、Flt-1 は副腎皮質細胞に発現し、経時的に増加した。Flk-1 は副腎 sinusoid 内皮細胞に発現し、再生初期に一過性に発現増強を示した。更に過去の報告と異なり Flt-1 は副腎皮質細胞に発現したことを報告した。以上より、副腎自家移植再生における血管増生に VEGF・Flk-1・Flt-1 の関与があることを示唆した。質疑応答では副査の本間研一教授から、今回示したコルチコステロン濃度はやや高く採血手法による影響が無かったかどうか、副腎皮質再生過程における副腎皮質内皮細胞の Flk-1 の誘導因子として低酸素と VEGF どちらの関与が強いのかとの質問、Flt-1 局在の確認は免疫組織染色のみでは偽陽性の可能性もあり in situ hybridization が有効との助言があった。これらの質問に対し申請者は、採血時のストレスは注意したが皆無だったとは言えないと回答した。コルチコステロンの値は文献によって様々であり、今回発表した値と同様な報告もあったと説明した。加えて、採血時のストレスを一定にするため ACTH を投与後に採血している論文が多く、測定法は今回用いた HPLC 法より RIA での報告が多いと回答した。副腎血管内皮の Flk-1 の誘導は指摘されたとおり VEGF より低酸素が強く関与していた可能性が推測されると回答した。副腎の Flt-1 の局在については、免疫組織染色による検討は過去に無いと説明した。また、指摘されたとおり Flt-1 の in situ hybridization が必要であると回答した。次いで、主査の小池隆夫教授から、副腎幹細胞移植の可能性とそれによる細胞の分化がどこまで解明されているのか、副腎における VEGF の血管新生以外の役割、副腎被膜組織を腎

被膜下に移植した際 VEGF の発現に差がでるかどうかが質問があった。これらの質問に対し申請者は、文献では牛の副腎皮質クローン細胞の SCID マウスへの移植で副腎皮質が再生することを説明した。しかし、副腎皮質クローン細胞の継代培養で徐々にステロイド合成酵素の遺伝子が失われるとの報告があることを述べた。副腎皮質の VEGF は従来の報告では、副腎 Sinusoid 内皮細胞の維持、アポトーシス抑制、ホルモン分泌のための Fenestration の役割があることを述べた。今回の副腎移植は個体差を減らすため腹直筋内に副腎被膜組織をシート状に移植した。腎被膜下への副腎皮質移植における VEGF の発現に関する報告は無く、本研究でも技術的に困難であると回答した。最後に副査の野々村克也教授からステロイド補充による ACTH 抑制環境における副腎移植組織の VEGF とそのレセプターの発現を検討したかどうか、ヒトでの応用方法についての質問があった。これらの質問に対して申請者は、ステロイド補充下の副腎自家移植は施行し、副腎再生が抑制されていたと説明した。しかし、VEGF とそのレセプターの発現については検討しなかったと回答した。また、文献上ステロイド投与にて副腎皮質が萎縮し、その際 VEGF と Flk-1 が低下すると述べた。ヒトの副腎移植はステロイド補充が必要であり、副腎皮質再生を抑制する可能性がある。本研究結果から、何らかの VEGF・Flk-1・Flt-1 の発現を増強させる方法にてステロイドの影響を回避できる可能性を期待していると説明した。

この論文は、副腎自家移植再生における血管増生に VEGF とそのレセプターの関与を示唆したものとして高く評価され、今後の発展によりヒトにおける副腎自家移植法の確立が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の単位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。