OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	血管新生におけるミクログリアの機能とその役割
Author(s)	竹下, 航平
Citation	平成29年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2018
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/68104
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式６

申請先学部　　学部　採択番号　No.

平成２９年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏　　名	たけした こうへい 竹下 航平	学部 学科	医学部保健学科	学年	４年
ふりがな 共　同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	稲垣 忍	所属	医学部保健学科		
研究課題名	血管新生におけるミクログリアの機能とその役割				
研究成果の概要	血管新生におけるミクログリアの機能と役割を検証するため，ミクログリアの分布に着目し，血管の各視野のミクログリアの数を比較した．その際，ミクログリアのマーカーである Iba1 と活性化ミクログリアのマーカーである F4/80 を用いて免疫染色を行い，ミクログリアの存在数を計測した．その結果，各マーカーでの血管のエリアによる存在数の違いに有意差は認められなかった．ミクログリアの分布に数的な差は認められなかったため，形状・存在位置などを指標した更なる検討が必要である．				

－Introduction－

ミクログリアは新生血管最先端部において，血管同士の吻合に関与している[1]．実際の網膜組織を観察していると退縮血管付近や新生血管最先端部に限らず，ミクログリアは広範囲に分布していた．そこで，ミクログリアが血管新生において吻合以外にも重要な働きをしているのではないかと仮定し，新生血管でのミクログリアの分布を形態学的観点より検討した．

－Methods－

Summary

血管新生モデルとして，マウスの網膜を使用し， 免疫蛍光染色によりミクログリアと血管を同定した．

Animals

Wild type のマウス(Postnatal day 6)および，その網膜

Immunostaining

使用した 1st Antibodies: rabbit anti-Iba1, rat anti-F4/80, DAPI, Lectin. 一部の実験では ERG や PECAM, GFAP も使用した．

使用した 2nd antibodies: 647 anti-rabbit (Iba1), anti-rat Biotin, Streptavidin Texas Red(F4/80), 647 anti-rat (PECAM), cy-3 anti-rabbit (GFAP)

Nonspecific Reaction を防ぐために F4/80 を使用する際は M.O.M kit で Blocking を行った．1st Antibody を 4℃ Overnight で反応させた後，2nd Antibody を同じく 4℃ Overnight で反応させ，スライドガラスに封入してから観察を行った．

Statistic Analysis

統計学的処理には, Student t 検定を用い，有意水準は $p<0.05$ とした．

－Results－

1. 網膜内におけるミクログリア(Iba1- positive)の分布

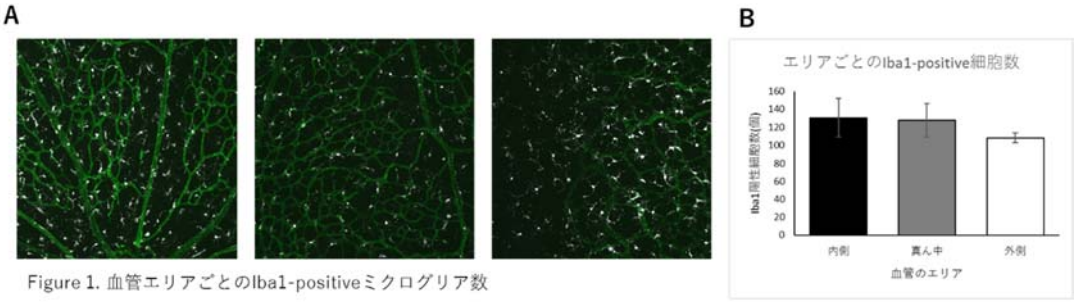

Figure 1. 血管エリアごとのIba1-positiveミクログリア数

まず，新生血管の部位ごとのミクログリアの分布を検証するために，Iba1 をミクログリアのマーカーとして免疫蛍光染色を行った．Iba1 陽性ミクログリア数を計測し，血管のエリアごとにその分布に

[1] Alessandro Fantin, Joaquim M. Vieira, Gaia Gestri et al. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. Blood. 2010

有意差があるのかを検討した結果，有意差は認められなかった. (Figure 1A, B)

2. 網膜内におけるミクログリア(F4/80- positive)の分布

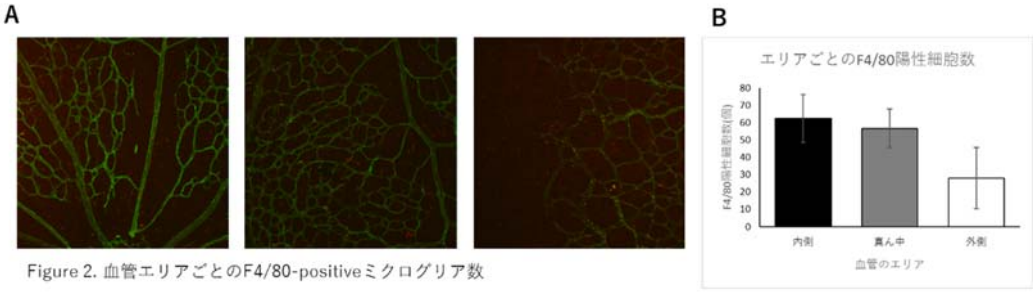

Figure 2. 血管エリアごとのF4/80-positiveミクログリア数

次に，新生血管の部位ごとの活性化ミクログリアの分布を検証するため，F4/80 を活性化したミクログリアのマーカーとして免疫蛍光染色を行い，有意差の有無を判定した．その結果，血管のそれぞれのエリアごとに有意差は認められなかった. (Figure 2A, B)

3. 網膜内におけるミクログリア(F4/80- and Iba1- positive)の割合

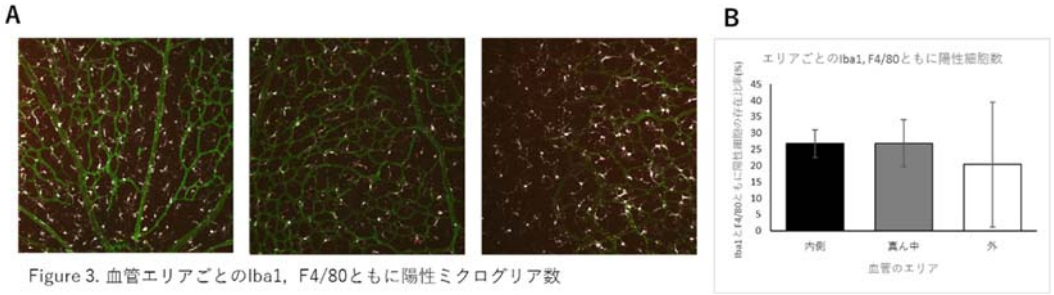

Figure 3. 血管エリアごとのIba1，F4/80ともに陽性ミクログリア数

Iba1-positive なミクログリアのうち，活性化しているミクログリアの存在比率を検証するため，F4/80 と Iba1，どちらも陽性となるようなミクログリアの割合を計測し，その割合に血管のエリアごとの有意差が認められるのかを検証した結果，有意な差は認められなかった. (Figure 3A, B)

－Discussion－

血管新生とは血管内皮細胞から tip cell が出芽することから始まる，その tip cell が誘導され伸展した後に隣り合う血管の分枝と吻合することで新しい血管網が形成される．また，これに続いて血管の退縮も行われ，不必要な血管網は取り除かれる．生後の網膜では，血管新生が二次元的に行われており，また同一組織内で出芽と退縮が観察できるため，本研究では血管新生のモデルとして網膜を用いた．

今回，血管新生におけるミクログリアの働きとその分布の関係性についての検証をし，その際ミクログリアのマーカーである Iba1 と F4/80 を用いて免疫蛍光染色を行い，ミクログリアを同定した．陽性細胞数を計測する際に用いた画像は，視神経乳頭を画面の端に見切れるように配置したものを「内側」とし，その画像と視野が被ることのないようにしたものを「真ん中」，その「真ん中」と視野が被らないようにしたものを「外側」とした．また，F4/80-positive ミクログリアは，Iba1-positive ミクログリアを参照して，陽性かどうかの判断を行った．その結果，Iba1-positive ミクログリア数も F4/80-positive ミクログリア数も血管のエリアによる有意差は認められなかった．

まず，Iba1-positive ミクログリア数に関して， 血管エリアによる分布の有意差は認められなかった．「外側」に存在するミクログリアの絶対数は減少傾向にあるものの， 有意な差とは言えない結果

になった.

また F4/80-positive ミクログリア数に関して, 血管のエリアごとの分布に有意な差は認められなかったものの, 血管エリアの外側の細胞数の誤差が極めて大きいことから, 陽性細胞の計測方法や判断方法, 計測に用いた血管エリア中の血管の走行面積の差などが考えられるため, これらの誤差を補正するため, 血管の走行面積で除する方法やより精確な計測方法の導入が必要であると考えられる. このことは F4/80- and Iba1-positive ミクログリアの存在比に関しても言える. どちらも血管エリアの外側の誤差が大きいため, 再度精確な計測を行うことが必要であると考えられる

また血管新生に関連するミクログリアの働きとして, 今回 F4/80 がミクログリアの分枝に発現する傾向がみられたこと, 退縮血管付近に存在していること(データは載せていない)から, ミクログリアの分枝が血管の退縮に重要なのではないかと考えられ, それに関する検証が必要である. 具体的にその方法として, 今回の研究ではミクログリアの数を指標に分類したが, ミクログリアの形(分枝状, 球状など)や存在している位置(血管内皮と重なったように存在しているなど)を指標に分類し, 検討を行ってみる必要がある. それらの検討で, 血管同士の吻合以外のミクログリアの重要性が示唆された場合、ノックアウトマウスを使用した研究を行う必要がある.

以上のことから, ミクログリアの分布に数的な差は認められなかったため, 形状・存在位置などを指標した更なる検討が必要である.

様式６

申請先学部　　学部　採択番号　No.