

ラット一過性局所脳虚血モデルにおける血管新生阻害因子
VEGF_{165b}の発現と血管新生抑制作用の検討

石川 正典

新潟大学医歯学総合研究科分子細胞医学専攻

分子情報医学講座神経内科学分野専攻

(主任:西澤正豊教授)

An anti-angiogenic factor VEGF_{165b} expression and inhibitory effect on
angiogenesis after focal cerebral ischemia in rats

Masanori Ishikawa

Niigata University Graduate School of Medicine and Dental Science/

Course for Molecular and Cellular Medicine/

Molecular Neuroscience and Brain Disease/ Neurology

(Director: Prof. Masatoyo Nishizawa)

別刷請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町通1-757

新潟大学脳研究所神経内科学教室 石川正典

Reprint requests to: Masanori Ishikawa

Department of Neurology, Brain Research Institute Niigata University,

1-757 Asahimachi-dori, Chuoku, Niigata 951 - 8585 Japan

要旨

背景

脳梗塞後の回復期において、機能回復を促進させる治療法の確立が望まれているが、未だ臨床応用はなされていない。血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor; VEGF）は、血管新生を強力に促進する血管リモデリング因子であり、脳梗塞超急性期において血液脳関門を破綻させ、さらに血栓溶解療法後の脳出血合併症に関与する。一方、VEGFのスプライシングバリエーションである VEGF_{165b} は、VEGF と VEGF 受容体の結合を競合的に阻害し、内因性の VEGF 阻害因子として作用する。しかし、脳虚血後の VEGF_{165b} の発現や局在の変化、血管新生への影響については不明である。

目的

VEGF_{165b} が脳虚血後の血管新生を阻害する可能性を検討すること。このため一過性局所脳虚血後の VEGF_{165b} の発現および局在の変化と、VEGF_{165b} が血管新生に及ぼす影響について検討すること。

方法

雄 Sprague- Dawley ラットを用いた一過性局所脳虚血モデルを用い、虚血後 1 日、3 日、7 日、14 日、および対照（非虚血群）の大脳皮質を脳試料として採取した。VEGF_{165b} の経時的変化と局在を、抗 VEGF_{165b} 抗体を用いたウェスタンブロットと免疫組織化学、蛍光 2 重染色により評価した。血管内皮細胞の増殖を検出するため

Ki-67 (細胞増殖マーカー), および endothelial barrier antigen (EBA ; 血管内皮マーカー) の蛍光二重染色を行った. さらに VEGF-VEGF 受容体シグナリングを介した血管新生のマーカーである endocan に対する抗体を用いたウェスタンブロットと免疫組織化学を行い, VEGF_{165b} と血管内皮細胞増殖, VEGF-VEGF 受容体シグナリングを介した血管新生の関係を検討した.

結果

VEGF_{165b} は虚血後 3 日目をピークとして増加し, 虚血中心部の血管内皮細胞に発現した. 一方, VEGF は虚血辺縁部に発現し, 両者は共局在しなかった. Ki-67 で評価した血管内皮細胞の増殖は, 虚血後 3 日目をピークとして虚血中心部において増加した. しかし endocan は虚血後 7 日目以降に増加するものの, 虚血中心部には認めず, 虚血周辺部の血管のみに発現していた.

考察

虚血中心部の血管内皮細胞は増殖するものの, VEGF_{165b} の発現により, VEGF-VEGF 受容体シグナリングを介した血管新生が阻害されているものと考えられた.

結論

VEGF_{165b} は脳梗塞の回復期における血管新生を促進する新規治療標的分子として有望である.

キーワード

一過性局所脳虚血, VEGF_{165b}, 血管新生, 虚血中心部, ラット

Key words

Transient focal cerebral ischemia, VEGF_{165b}, Angiogenesis, Ischemic core, Rat

緒言

脳卒中は、日本における死因の第4位であるとともに、新規要介護者の原因疾患の第1位でもある。脳梗塞に対する根本療法として、組織プラスミノゲンアクチベーター (tissue plasminogen activator; tPA) を用いた血栓溶解療法が行われているが、いまだ発症から4.5時間以内の患者にしか使用できず、恩恵に浴する患者は発症者の5%程度にすぎない¹⁾。従って、超急性期における血栓溶解療法を行えなかった症例に対しても、回復期に機能回復を図る治療法の開発が望まれている。しかし、今日までそうした治療は確立されていない。

脳虚血後の機能回復を促進する重要な戦略の一つに、血管新生の促進がある。血管新生と神経再生は相互に影響し、脳虚血後の機能回復を促進することが報告されている²⁾³⁾。血管新生は、(1)既存の血管の拡張、血管透過性亢進、細胞外マトリックスの破壊、(2)血管内皮細胞の増殖・遊走、(3)血管内皮細胞の管腔構造形成、(4)血管構

造の安定化，という段階を経て行われ，血管数が増加する⁴⁾．血管新生を強力に促進する血管リモデリング因子である血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor; VEGF）はこれらの段階のすべてに深く関わっている⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾．ラット一過性局所脳虚血モデルの検討では，超急性期より VEGF の発現が亢進し，血液脳関門の破綻を招くが，とくに tPA を用いた血栓溶解療法後は VEGF の発現の亢進が生じ，脳出血合併症の原因となる⁹⁾．一方，VEGF は回復期において，その血管新生促進作用や神経細胞保護作用により，機能回復に作用する⁶⁾⁷⁾¹⁰⁾．血管新生を評価するマーカーとしてはデルマタン硫酸プロテオグリカンである endocan が知られているが¹¹⁾，endocan は VEGF が血管内皮細胞に作用するとその発現が誘導されることから¹²⁾¹³⁾，VEGF-VEGF 受容体シグナリングの活性化を示すマーカーとも考えられている¹⁴⁾．以上のように，VEGF は脳虚血後の時期によって 2 面性を持つ分子であると言える．

また，VEGF には種々のスプライシングバリエントが存在し，そのアミノ酸数が異なる VEGF₁₆₅，VEGF₁₂₁ などのアイソフォームが知られている．近年，VEGF の働きを競合的に阻害する内因性阻害因子として，スプライシングバリエントのひとつである VEGF_{165b} が存在することが明らかとなった¹⁵⁾．これは *VEGF* 遺伝子の mRNA の 3'末端のスプライシングが異なることにより，C 末端の 6 アミノ酸が置換されたものである¹⁵⁾．VEGF_{165b} は VEGF 受容体に対し，

VEGF と競合的に結合し，その下流のシグナルを抑制することにより血管新生を抑制する¹⁶⁾．培養血管内皮細胞を用いた *in vitro* の系の検討では，培養液中に VEGF_{165b} に対する中和抗体を添加することにより，血管内皮細胞による血管様構造形成の抑制が解除されることが報告されている¹⁶⁾．すなわち，VEGF_{165b} の作用を抑制することにより脳虚血後の血管新生が促進され，さらに血管新生が神経再生を促進する可能性が期待される．しかし，脳虚血後の VEGF_{165b} の発現や局在の変化，血管新生への影響については不明である．

今回，我々は，VEGF_{165b} が脳虚血後の血管新生を阻害する可能性を検討することを目的とし，一過性局所脳虚血後の VEGF_{165b} の発現および局在の変化と，VEGF_{165b} が血管新生に及ぼす影響について検討したので報告する．

材料と方法

1. 動物モデル

本研究は新潟大学動物実験倫理委員会の承認を受け，新潟大学動物実験指針に従って実施した．

一過性局所脳虚血モデルは，Koizumi ら¹⁷⁾の方法に従った．具体的には，オス 8 週齢 Sprague-Dawley ラット（体重 280–310 g）を用い，麻酔はハロセン 1.5%，酸素 30%，笑気 70% の混合気を吸入し，

維持した。手術中，小動物用体温保持装置（BRC）を用いて，直腸温を $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に維持した。手術用顕微鏡の直視下に前頸部を正中切開し，左側の総頸動脈，外頸動脈，内頸動脈を露出した後，外頸動脈を遠位部で結紮し，切断した。その後，外頸動脈断端を切開し，同部位から左内頸動脈に向けて，先端から 8mm までを，径 0.38 mm にシリコンでコーティングしたナイロン塞栓糸を 18 mm 挿入した後，切開部の近位側を塞栓糸ごと結紮した。この塞栓糸は 90 分後に引きぬき，再灌流した。非虚血群ラットに対しては手術操作を行わなかった。

2. 脳血流測定

血管閉塞前にラット頭蓋骨を露出し，Bregma から 5 mm 後方，5 mm 左側に，直径 2 mm のバーホールを作成し，手術開始前，脳虚血 15 分後，再灌流直前，および再灌流直後に，レーザードップラー血流計（ADVANCE）により脳血流を測定した。既報と同様に，脳虚血 15 分後，および再灌流直前の血流が，虚血前血流の 50%未滿とならなかった個体は実験に用いなかった⁹⁾。

3. ウェスタンブロット

脳虚血の 1 日後，3 日後，7 日後，14 日後，および非虚血群のラットを，高濃度ハロセン吸入により安楽死させ，経心臓的に冷生食

で灌流処置を行った（各群 5 匹ずつ施行した）。虚血側の中大脳動脈領域の大脳皮質を試料として採取した。試料は既報に従い¹⁸⁾、採取した脳組織の 7 倍量の 1% Triton-X100 を含む細胞溶解バッファー（Cell Signaling Tec.）を加えホモジナイズし、10 分間 14,000 rpm にて遠心した。ビシンコニン酸法にて上清のタンパク濃度を測定した後、タンパク量 22.5 μg を用いて、Tris-Glycine SDS-PAGE を行った。その後、polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に転写し、5%スキムミルクと 0.1% Tween-20 にて 60 分間ブロッッキングした。1 次抗体はマウスモノクローナル抗 VEGF_{165b} 抗体（Abcam, 1:1000）、ウサギポリクローナル抗 VEGF 抗体（Santa Cruz, 1:200）、ウサギポリクローナル抗 VEGF_{165b} 抗体（Abcam, 1:400）、ヤギポリクローナル抗 endocan 抗体（Santa Cruz, 1:100）を用いて、4°C で一晩反応させた。PBS-T で洗浄後、horse radish peroxidase 標識マウス抗 IgG 抗体、同抗ウサギ IgG 抗体、同抗ヤギ IgG 抗体を室温にて 1 時間反応させ、chemiluminescent HRP 基質（Millipore）にて化学発光した後、目的とするタンパクバンドを、ImageQuant LAS4000（GE healthcare life sciences）で撮影した。内部コントロールとして β -actin（Santa Cruz, 1:2000）を使用し、デンシトメーター（Image J, National Institutes of Health）にて各タンパクバンドを定量した。

4. 免疫蛍光染色

脳虚血の1日後，3日後，7日後，14日後，および非虚血群のラットを，高濃度ハロセン吸入により安楽死させ（各群3匹ずつ行った），冷生食に引き続き，4%パラホルムアルデヒドで経心臓的に灌流固定した．取り出した脳は20%スクロースを溶解した4%パラホルムアルデヒドで一晩固定し，メタノール処理後，パラフィンに包埋した．サンプルはマイクロトームで4 μm 厚にスライスした．脱パラフィン後，クエン酸ナトリウムバッファー中で，121°C 10分の抗原賦活を行い，1次抗体はウサギポリクローナル抗 Ki-67 抗体（Abcam, 1:2500），マウスモノクローナル抗 EBA 抗体（Covance, 1:1000）を使用し，4°Cで一晩反応させ，2次抗体は Alexa Fluor 488 および 594 標識抗 IgG 抗体（Life technologies, 1:1000）にて染色した．

また，VEGF_{165b}の局在の検討，および VEGF_{165b} と VEGF の共局在の検討は，free - floating 法による免疫蛍光染色を既報¹⁹⁾に従い行った．具体的には，脳虚血の1日後，3日後，7日後，14日後のラットを，高濃度ハロセン吸入により安楽死させ，冷生食に引き続き，4%パラホルムアルデヒドで経心臓的に灌流固定した．取り出した脳は，20%スクロースを溶解した4%パラホルムアルデヒドで一晩固定した．その後，試料をビブラトーム（Leica Biosystems）を用いて50 μm 厚にスライスした．1次抗体はマウスモノクローナル抗 VEGF_{165b} 抗体，ウサギポリクローナル抗 von Willebrand factor (vWF) 抗体

(Dako, 1:200), ウサギポリクローナル抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (Millipore, 1:1000), ウサギポリクローナル抗 microtubule associated protein 2 (MAP2) 抗体 (Millipore, 1:250), ウサギポリクローナル抗 VEGF 抗体を用いて 4°Cで一晩反応させ, 2次抗体は Alexa Fluor 488 および 594 標識抗 IgG 抗体を用いて染色した. 血管内皮細胞の増殖は, EBA 陽性血管のうち, Ki-67 陽性核を持つ血管数で評価した. Ki-67 と EBA との共染色を行い, 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss) 下に 630 倍で観察し, 虚血中心部, 虚血辺縁部のそれぞれにおいて無作為に選んだ 7 視野を選び, 視野内の EBA 陽性血管のうち Ki-67 陽性核を持つ血管数の, 1 視野あたりの平均値を求めた. なお虚血中心部は抗 MAP2 抗体を用いた免疫染色で, 染色性の低下の見られる部位とし, 虚血辺縁部は中大脳動脈領域で MAP2 染色性が保たれている部位とした.

5. 免疫組織化学染色

脳虚血の 1 日後, 3 日後, 7 日後, 14 日後に, ラットを高濃度ハロセン吸入により安楽死させ, 冷生食に引き続き, 4%パラホルムアルデヒドで経心臓的に灌流固定した. 取り出した脳は 20%スクロースを溶解した 4%パラホルムアルデヒドで一晩固定し, メタノール処理後, パラフィンに包埋した. サンプルは 4 μm 厚にスライスした. 脱パラフィン後, マウスモノクローナル抗 VEGF_{165b} 抗体, ウ

サギポリクローナル抗 VEGF 抗体，ヤギポリクローナル抗 endocan 抗体（Santa Cruz, 1:50）を用いて 4℃で一晩反応させ，その後，Vectastain ABC キット（Vector）を用いて染色した．endocan 陽性血管数は，虚血中心部，虚血辺縁部とも，各無作為に選んだ 7 視野での陽性血管数の平均値を求めた．endocan 陽性血管を，VEGF-VEGF 受容体シグナリングを介した血管新生による血管とした．

6. 統計学的処理

すべての数値は平均±標準偏差で表記し，一元分散分析（後付試験として Bonferroni 法）を行い検定した．P 値が 0.05 未満を統計学的有意とした．

結果

1. VEGF_{165b} 発現の変動

ラット一過性局所脳虚血後 1 日，3 日，7 日，14 日後，および非虚血群の脳試料における VEGF_{165b} の変動を，ウェスタンブロットにより検討した．この結果，虚血後 3 日目をピークとする発現の増加が認められた（対非虚血群，虚血後 7 日，14 日 $p < 0.05$ ）（図 1A，1B）．免疫組織化学による評価では，虚血中心部において VEGF_{165b} の発現が見られた（図 1C）．

2. VEGF_{165b} の局在

次に、虚血中心部の VEGF_{165b} の局在について、VEGF_{165b} と、血管内皮細胞、アストロサイト、神経細胞のマーカータンパクに対する抗体を用いた蛍光 2 重染色により検討した。この結果、虚血後 3 日目の虚血中心部では、VEGF_{165b} は血管内皮細胞に発現していたが、虚血辺縁部では血管内皮細胞には発現は認められなかった(図 2A)。またアストロサイトにはいずれの部位にも発現は認められなかった(図 2B)。一方、神経細胞には虚血周辺部において発現を認めた(図 2C)。また、VEGF_{165b} と VEGF とはいずれの部位にも共局在が見られず、VEGF_{165b} は虚血中心部に、VEGF は虚血辺縁部にのみ発現していた(図 2D)。

3. Ki-67 による血管新生の評価

一過性局所脳虚血後の血管新生について検討する目的で、Ki-67 陽性血管内皮細胞を有する血管数の経時的変化とその局在を検討した。ラット一過性局所脳虚血後 1 日、3 日、7 日、14 日後、および非虚血群ラットにおいて、細胞増殖マーカーである Ki-67 と、血管内皮マーカーである EBA に対する抗体を用いた蛍光 2 重染色を行った(図 3A)。非虚血群では、Ki-67 陽性血管は認めなかったが、虚血中心部では虚血後 3 日目をピークとして、Ki-67 陽性血管が多数出現した(図 3B; 対非虚血群, 虚血後 1 日, 7 日, 14 日 $p < 0.05$)。

虚血辺縁部にも，虚血後 3 日目をピークとして Ki-67 陽性血管が増加したが，非虚血群に比して有意なものではなかった（図 3C）。

4. endocan による血管新生の評価

VEGF-VEGF 受容体シグナリングを介した血管新生を評価する目的で，まず脳虚血後の endocan の発現の変動を検討した．抗 endocan 抗体を用いたウェスタンブロットによる虚血側の中大脳動脈領域における評価では，虚血後 7 日目から 14 日目にかけて発現の増加が認められた（図 4A，4B）．一方，抗 endocan 抗体による免疫組織化学染色では，Ki-67 陽性血管が見られた虚血後 3 日目の虚血中心部では，endocan 陽性血管の増加は乏しく，非虚血群と比べ 14 日目に有意に増加したのに対し（図 4C， $p<0.05$ ），虚血周辺部で 7 日目をピークとして増加が認められた（図 4D， $p<0.05$ ）。

考察

今回，VEGF_{165b} が脳虚血後の血管新生を阻害する可能性について検討した．まず，VEGF_{165b} の発現の検討を行ったところ，虚血後 1 日目から増加の傾向が見られ，虚血後 3 日目，すなわち亜急性期において有意に増加することが示された．VEGF_{165b} の発現に関して，Chaitanya らはマウス一過性局所脳虚血モデルを用いた検討を行い，虚血 24 時間後に増加することを報告しているが，それ以降の

VEGF_{165b} の発現変化については検討されていない²⁰⁾。今回の検討の結果、VEGF_{165b} の長期間に及ぶ発現変化が初めて明らかにされ、とくに虚血後 3 日目をピークとする亜急性期に高発現することが示された。

また、今回の検討では、VEGF_{165b} が虚血後 3 日目において、虚血辺縁部ではなく、虚血中心部の血管内皮細胞に発現することを示した。血管内皮細胞は VEGF 受容体を発現するが、VEGF_{165b} は VEGF 受容体に対し、VEGF と競合的に結合し、その下流のシグナルを抑制することにより血管新生を抑制する¹⁶⁾。よって、虚血中心部の血管内皮細胞における VEGF_{165b} の発現は、VEGF-VEGF 受容体シグナリングを阻害し、虚血中心部における血管新生を阻害する可能性が示唆された。

次に、Ki-67 陽性血管内皮細胞を指標として、脳虚血後の血管新生の検討を行った。この結果、虚血中心部であっても、血管内皮細胞の増殖が生じていることを示し、この変化は虚血後 3 日目をピークとして認められた。虚血辺縁部においても、統計学的有意差を認めないものの、3 日目にピークを認めた。Marti らは、マウス中大脳動脈永久閉塞モデルにおいて、虚血後 3 日目の虚血中心部に Ki-67 陽性血管が出現することを報告している²¹⁾。本研究ではラット一過性局所脳虚血モデルを用いたが、同様の結果であった。血管内皮細胞増殖は、血管新生の早期に見られる反応であり⁴⁾²²⁾、虚血中心部

においても血管新生が生じていることが示唆された。

最後に虚血中心部において、VEGF-VEGF 受容体シグナリングに伴う血管新生が生じているかどうかを検討した。血管新生のマーカールとして知られる *endocan*¹¹⁾は、VEGF-VEGF 受容体シグナリングにより発現がもたらされることが知られている¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾。ウェスタンブロットによる検討では、*endocan* の発現は虚血後 7 日目以降に認められたが、免疫染色では虚血後 3 日目より *endocan* 陽性血管が認められた。しかし、Ki-67 陽性血管での評価と異なり、虚血辺縁部の 7 日目にその出現が多く認められた。一方、Ki-67 陽性血管が増加した虚血後 3 日目の虚血中心部では *endocan* 陽性血管は目立たず、14 日目に遅れて増加した。この結果から、虚血後 3 日目の虚血中心部の血管内皮細胞には VEGF_{165b} が高発現しているため、VEGF-VEGF 受容体シグナリングを介した血管新生が抑制されているものと考えられた。VEGF_{165b} は乳癌組織、強皮症において血管新生を阻害するという報告はあるものの¹⁵⁾¹⁶⁾、脳虚血後に血管新生を阻害するという報告は渉猟した限りではなく、VEGF_{165b} が一過性局所脳虚血後にも血管新生において抑制的な役割を果たすことを初めて示した。

ごく最近、末梢動脈病モデルマウスにおいて、虚血肢の筋組織に VEGF_{165b} が高発現しており、抗 VEGF_{165b} 中和抗体を投与することにより血管新生が促進され、予後が改善することが報告された²³⁾。同様に、脳梗塞回復期における抗 VEGF_{165b} 中和抗体の投与は、虚

血中心部においても VEGF-VEGF 受容体シグナリングを介した血管新生を促進させる可能性がある。血管新生を促進する方法として、VEGF を直接投与する方法も考えられるが、すでに虚血中心部に VEGF_{165b} が発現している場合には、競合阻害のため無効となる可能性があることから、抗 VEGF_{165b} 中和抗体の投与が望ましいものと考えられる。虚血中心部における血管新生の促進が、脳梗塞の予後を回復しうるかについて今後の検討が必要であるものの、VEGF_{165b} は脳梗塞回復期における血管新生を促進する新規治療標的分子として有望と考えられた。

結語

ラット一過性脳局所虚血モデルにおいて、虚血後 3 日目の虚血中心部における VEGF_{165b} の発現と血管内皮細胞増殖を示した。しかし endocan 陽性血管の発現は乏しいことから、VEGF_{165b} により、VEGF-VEGF 受容体シグナリングを介した血管新生が抑制されている可能性が示唆された。中和抗体を用いた VEGF_{165b} の抑制療法は、脳梗塞回復期において血管新生を促進させる新規治療標的として有望と考えられた。

謝辞

本研究全般にわたり、ご指導ご助言をいただきました、新潟大学脳研

究所神経内科西澤正豊教授,下畑享良准教授,高橋哲哉助教,金澤雅人助教,および,共焦点レーザー顕微鏡による検討に関し新潟大学医歯学総合研究科細胞機能講座分子細胞病理学分野内藤眞教授,大橋瑠子特任助教に深謝申し上げます.本研究は公益財団法人先進医薬研究振興財団,および一般財団法人協和会の助成によって行われました.関係各位に深謝いたします.

参考文献

- 1) Kunisawa S, Morishima T, Ukawa N, Ikai H, Otsubo T, Ishikawa KB, Yokota CM, Minematsu K, Fushimi K and Imanaka Y: Association of geographical factors with administration of tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *J Am Heart Assoc* 2: e000336, 2013
- 2) Guo S, Kim WJ, Lok J, Lee SR, Besancon E, Luo BH, Stins MF, Wang X, Dedhar S and Lo EH: Neuroprotection via matrix-trophic coupling between cerebral endothelial cells and neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7582-7587, 2008
- 3) Ohab JJ, Flemicg S, Blesch A and Carmichael ST: A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci* 26: 13007-13016, 2006
- 4) Conway EM, Collen D and Carmeliet P: Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49: 507-521, 2001
- 5) Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J and Claesson-Welsh L: VEGF receptor signalling—in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 359-371, 2006
- 6) Lee HJ, Kim KS, Park IH and Kim SU: Human neural stem cells overexpressing VEGF provide neuroprotection, angiogenesis and functional recovery in mouse stroke model. *PLoS One* 2: e156, 2007

- 7) Hansen TM, Moss AJ and Brindle NPJ: Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in neurovascular regeneration and protection following stroke. *Curr Neurovasc Res* 5: 236–245, 2008
- 8) Harmann DM and Zechariah A: Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:1620-1643, 2009
- 9) Kanazawa M, Igarashi H, Kawamura K, Takahashi T, Kakita A, Takahashi H, Nakada T, Nishizawa M and Shimohata T: Inhibition of VEGF signaling pathway attenuates hemorrhage after tPA treatment. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:1461-1474, 2011
- 10) Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logviova A and Greenberg DA: VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest* 111:1843–1851, 2003
- 11) Frahm KA, Nash CP and Tobet SA: Endocan Immunoreactivity in the Mouse Brain: Method for identifying nonfunctional blood vessels. *J Immunol Methods* 398: 27-32, 2013
- 12) Del Toro R, Prahst C, Mathivet T, Siegfried G, Kaminker JS, Larrivee B, Breant C, Duarte A, Takakura N, Fukamizu A, Penninger J and Eichmann A: Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood* 116: 4025-4033, 2010
- 13) Sarrazin S, Lyon M, Deakin JA, Guerrini M, Lassalle P, Delehedde

M and Lortat-Jacob H: Characterization and binding activity of the chondroitin/dermatan sulfate chain from endocan, a soluble endothelial proteoglycan. *Glycobiology* 20: 1380-1388, 2010

14) Rocha SF, Schiller M, Jing D, Li H, Butz S, Vestweber D, Biljes D, Drexler HC, Nieminen-Kelhä M, Vajkoczy P, Adams S, Benedito R and Adams R. Esm1 modulates endothelial tip cell behavior and vascular permeability by enhancing VEGF bioavailability. *Circ Res* 29: 581-590, 2014

15) Woolard J, Wang WY and Bevan HS: VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 64: 7822-7835, 2004

16) Manetti M, Guiducci S, Romano E, Ceccarelli C, Bellando-Randone S, Conforti ML, Ibba-Manneschi L and Matucci-Cerinic M: Overexpression of VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, leads to insufficient angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res* 109: e14-26, 2011

17) Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T and Ooneda G: Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Japan J. Stroke* 8: 1-8, 1986.

- 18) Shimohata T, Zhao H, Sung JH, Sun G, Mochly-Rosen D and Steinberg GK: Suppression of δ PKC activation after focal cerebral ischemia contributes to the protective effect of hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab* 27: 1463–1475, 2007.
- 19) Kakita A, Zerlin M, Takahashi H and Goldman JE: Some glial progenitors in the neonatal subventricular zone migrate through the corpus callosum to the contralateral cerebral hemisphere. *J Comp Neurol* 458: 381-388, 2003
- 20) Chaitanya GV, Cromer WE, Parker CP, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Michael Mathis J, Minager A and Steven Alexander J: A recombinant inhibitory isoform of vascular endothelial growth factor 165/165 aggravates ischemic brain damage in a mouse model of focal cerebral ischemia. *Am J Pathol* 183: 1010-1024, 2013
- 21) Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E and Risau W: Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol* 156: 965-976, 2000
- 22) Hayashi T, Noshita N, Sugawara T and Chan PH: Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23: 166-180, 2003
- 23) Kikuchi R, Nakamura K, MacLauchlan S, Ngo TD, Shimizu I, Fuster

JJ, Katanasawa Y, Yoshida S, Qiu Y, Yamaguchi TP, Matsushita T, Murohara T, Gokce N, Bates OD, Hamburg NM and Walsh K: An angiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease. *Nature Med* 20: 1464-1471, 2014

☒

☒ 1

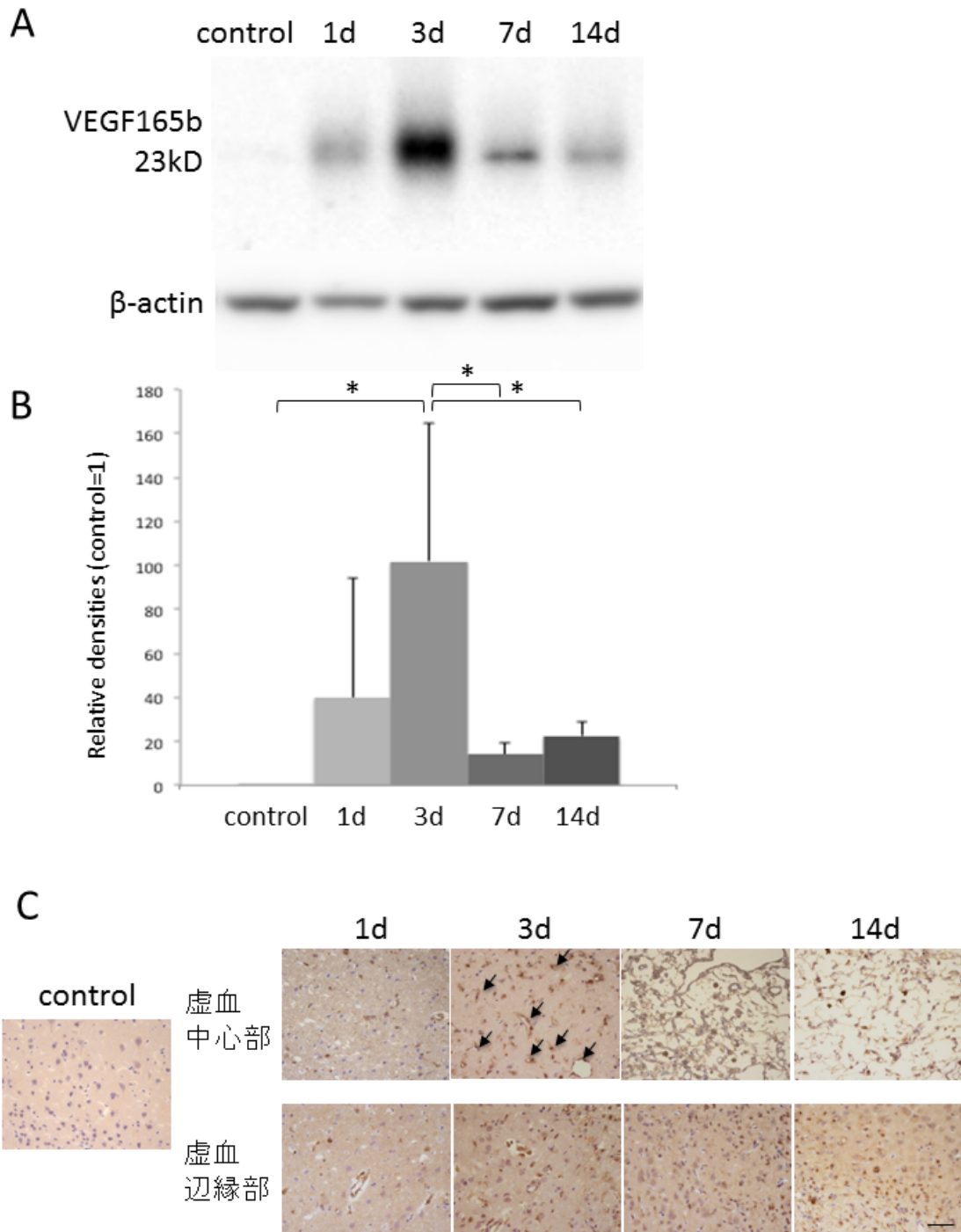


図 2

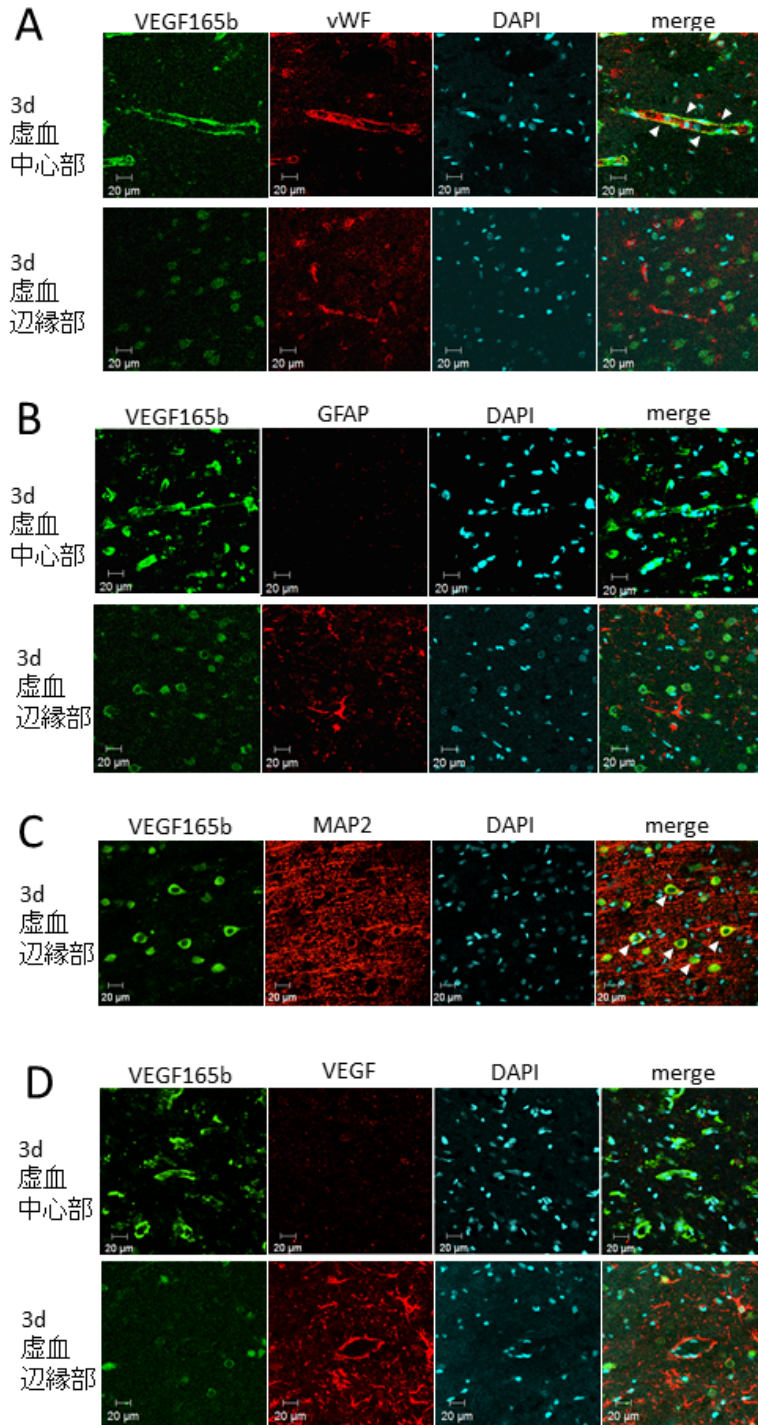


図 3

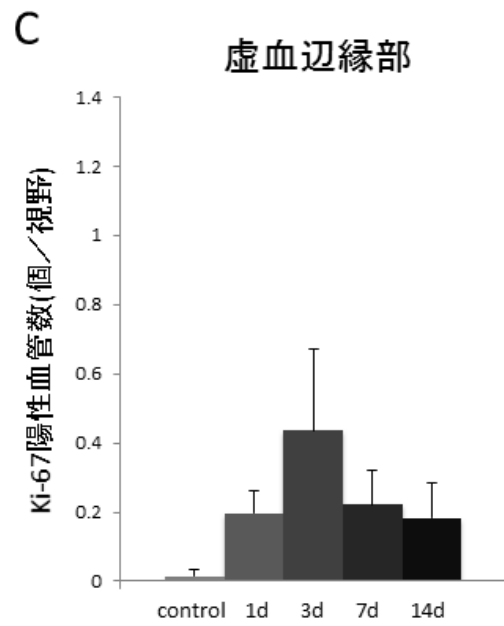
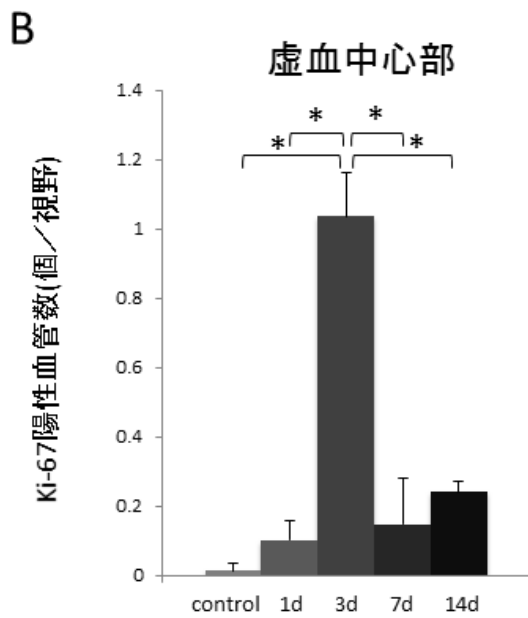
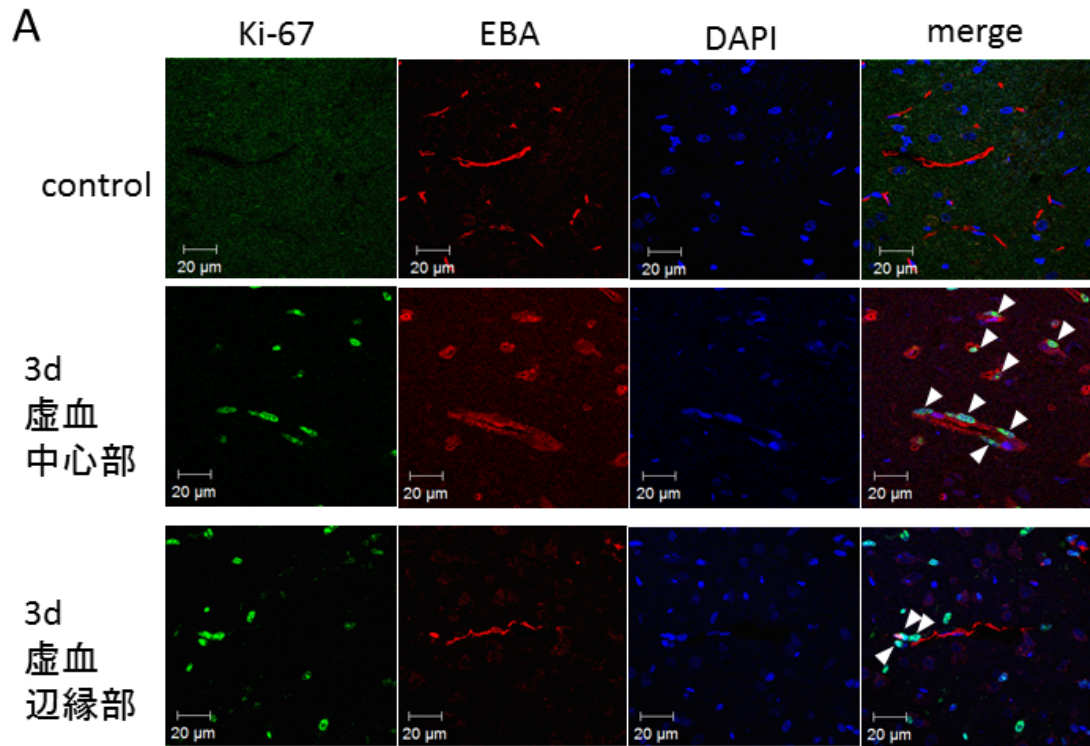
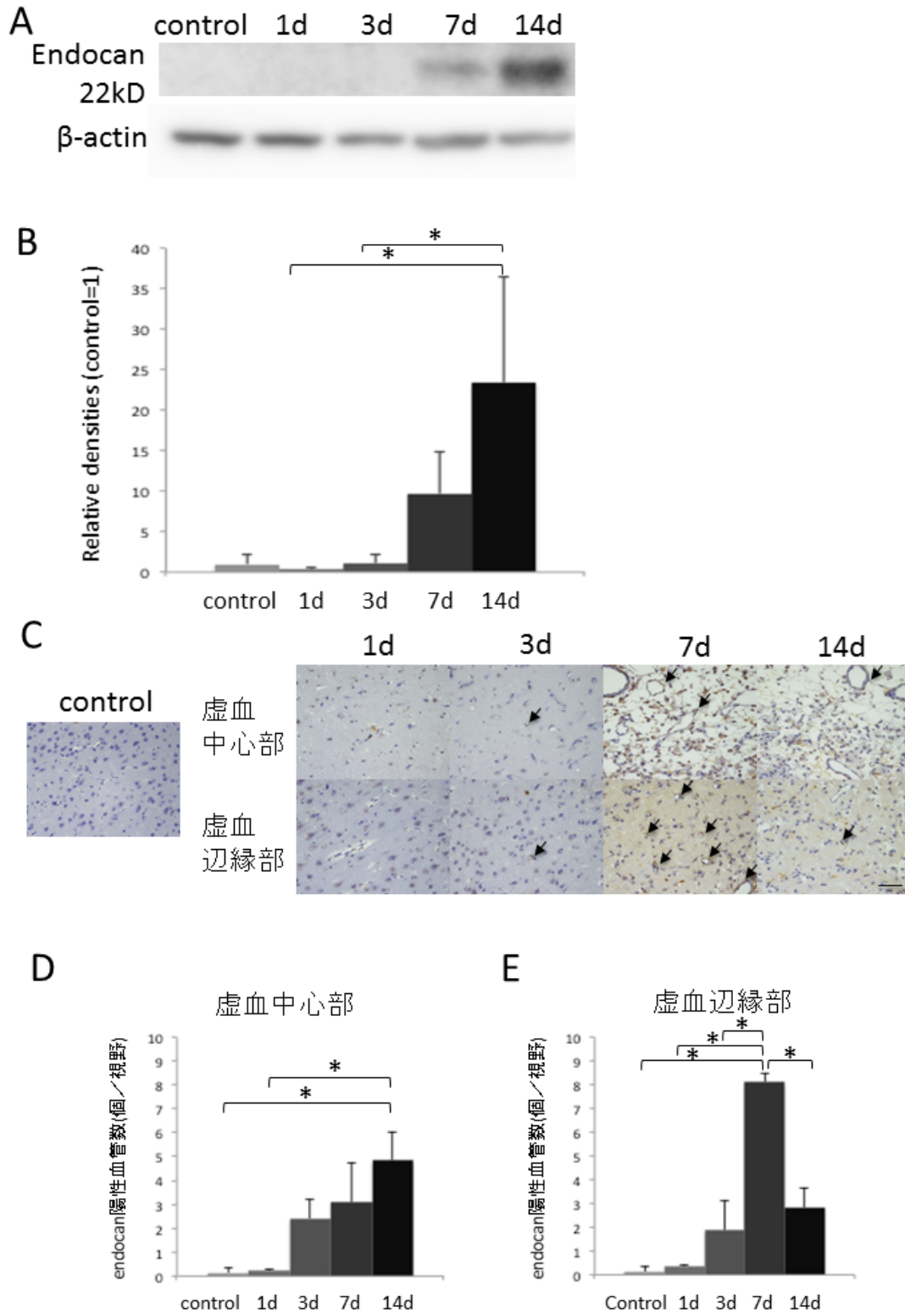


図 4



図の説明

図 1 ラット一過性局所脳虚血モデルにおける VEGF_{165b} の発現.

- (A) VEGF_{165b} 抗体を用いたウェスタンブロット. VEGF_{165b} は虚血後 3 日目をピークとする増加が認められた.
- (B) デンシトメトリーによる定量. VEGF_{165b} は虚血後 3 日目において著明に増加した. * : $p < 0.05$.
- (C) VEGF_{165b} 抗体を用いた免疫組織化学. VEGF_{165b} は虚血後 3 日目の虚血中心部において, 血管に多く発現していた (矢印).
スケールバー : 20 μm .

図 2 虚血後 3 日目における VEGF_{165b} の局在の検討.

- (A) VEGF_{165b} (緑), 血管内皮マーカー von Willebrand factor (vWF ; 赤), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI ; 青) の 3 重染色. VEGF_{165b} は虚血中心部において, vWF と共局在する (上段, 矢頭). しかし虚血辺縁部では vWF との共局在は見られない (下段). スケールバー : 20 μm .
- (B) VEGF_{165b} (緑), アストロサイトのマーカー glial fibrillary acidic protein (GFAP ; 赤), DAPI (青) の 3 重染色. VEGF_{165b} は虚血中心部 (上段), 虚血辺縁部 (下段) のいずれにおいても GFAP と共局在しない. スケールバー : 20 μm .

(C) VEGF_{165b} (緑), 神経細胞マーカー microtubule associated protein 2 (MAP2; 赤), DAPI (青) の 3 重染色. VEGF_{165b} は虚血辺縁部においては神経細胞にも発現する (矢頭). スケールバー: 20 μ m.

(D) VEGF_{165b} (緑), VEGF (赤), DAPI (青) の 3 重染色. VEGF_{165b} と VEGF とは, 虚血中心部 (上段), 辺縁部 (下段) のどちらでも共局在しない. 虚血中心部では VEGF_{165b} が, 虚血辺縁部では VEGF が発現している. スケールバー: 20 μ m.

図 3 ラット一過性局所脳虚血モデルにおいて, 虚血後に見られる Ki-67 陽性血管.

(A) 共焦点レーザー顕微鏡による虚血後 3 日目における Ki-67 陽性血管. 細胞増殖マーカー Ki-67 (緑), 血管内皮マーカー endothelial barrier antigen (EBA; 赤), DAPI (青) による 3 重染色. Ki-67 陽性血管が, 虚血後 3 日目の虚血中心部において増加している (矢頭). 3d: 虚血後 3 日目, スケールバー: 20 μ m.

(B) 虚血中心部における 400 倍 1 視野あたりの, Ki-67 陽性血管数.

虚血中心部においては, 虚血後 3 日目をピークとして Ki-67 陽性血管数が増加している. 単位: 個 / 1 視野, cont: 非虚血コントロール, 1d: 虚血後 1 日目, 3d: 虚血後 3 日目, 7d: 虚血後 7 日目, 14d: 虚血後 14 日目, *: $p < 0.05$

(C) 虚血中心部における 400 倍 1 視野あたりの, Ki-67 陽性血管数.

虚血中心部と同様に虚血後 3 日目において非虚血群よりも増加する傾向はあるものの, 有意ではなかった ($p = 0.83$). 単位: 個 / 1 視野, * : $p < 0.05$

図 4 ラット一過性局所脳虚血モデルにおける endocan の発現, および endocan 陽性血管.

(A) ウェスタンブロットによる endocan 発現の検討. 虚血後 7 日目以降, 14 日目にかけて増加が見られた. cont : 非虚血コントロール, 1d : 虚血後 1 日目, 3d : 虚血後 3 日目, 7d : 虚血後 7 日目, 14d : 虚血後 14 日目

(B) デンシトメトリーによる定量. endocan は虚血後 14 日目において有意に増加した. * : $p < 0.05$.

(C) 抗 endocan 抗体を用いた免疫組織化学. endocan は虚血後 7 日目の虚血辺縁部において血管に多く発現した. 一方, 虚血後 3 日目の虚血中心での発現は乏しかった. 矢印 : endocan 陽性血管, スケールバー : $20\mu\text{m}$.

(D) 虚血中心部における 400 倍 1 視野あたりの endocan 陽性血管数. 単位 : 個 / 1 視野. Ki-67 陽性血管が多く見られた虚血後 3 日目の虚血中心部における有意な増加は認めなかった (対非虚血群, $p = 0.60$).

(E)虚血辺縁部における400倍1視野あたりのendocan陽性血管数.

単位：個/1視野．虚血辺縁部では虚血後7日目に増加が認められた．