

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21580366

研究課題名（和文）：VEGFとそのレセプターの発現動態が乳腺及び新生仔消化管の分化増殖に及ぼす影響

研究課題名（英文）：Effects of VEGF and its receptors on differentiation and proliferation of mammary gland and new born digestive tract.

研究代表者：松元 光春（MATSUMOTO MITSUHARU）鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：30157383

研究成果の概要（和文）：

マウスの正常乳腺における VEGF と eNOS および nNOS の発現動態、ならびに VEGFR-2 の局在を明らかにした。また、ネコの乳腺腫瘍における VEGF と iNOS の局在を解析し、グレードとの相関を明らかにした。一方、マウスの消化管では、VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 の局在と、生後日齢に伴う発現の変化を明らかにした。乳汁中および胃内乳汁凝固物から VEGF を検出し、VEGF 投与による VEGFR-1 の局在の変化を明らかにした。以上のことから、これらの蛋白質が乳腺と新生仔消化管の分化増殖および血管新生に密接に関与していることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：

The effects of VEGF and its receptors on the differentiation and proliferation of mammary gland and new born digestive tract were investigated by immunohistochemistry, histometry and biochemistry. In mouse mammary gland during reproductive cycle, VEGF and NOS (eNOS and bNOS) which generate a free radical gas, NO, expressed strongly in late pregnancy and early lactation. VEGFR-2, one of VEGF receptors, was localized to blood vessel endothelia. In feline mammary tumors, the expressions of VEGF and iNOS were positively correlated with tumor grades. On the other hands, in mouse digestive tract, VEGF was localized to absorptive and glandular epithelium, VEGFR-1 to striated border, VEGFR-2 to blood vessel epithelium. The expressions of these proteins became strongly in advance with dating. After administration of VEGF in the digestive tract, immunoreaction of VEGFR-1 was significantly decreased. Thus, it is suggested that these proteins mentioned above were intimately correlated with the differentiation and proliferation, and angiogenesis in mammary gland and new born digestive tract.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学，基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：VEGF, VEGF 受容体, NOS, 免疫組織化学，乳腺，新生仔消化管，分化増殖，マウス

## 1. 研究開始当初の背景

血管内皮増殖因子（以下 VEGF）は、腹水型腫瘍細胞から発見された血管透過性を増大させる蛋白質として Senger ら（1983）により報告され、その後ウシ下垂体前葉細胞由来の細胞株の上清から血管内皮細胞増殖作用を示す因子として Ferrara and Henzel（1989）により報告されたものが同一の蛋白質であったことから名付けられた蛋白質である。VEGF は、血管内皮細胞は勿論のこと様々な上皮系細胞でも産生されており、乳腺においてもヒト（Nishimura ら，2002）や齧歯類（Pepper ら，2000）で発現していることが報告されている。しかし、乳汁中の VEGF の存在は、我々の知る限り他には報告されていない。

一方、VEGF に高い親和性を示す受容体として Flt-1 (VEGFR-1) および Flk-1/KDR (VEGFR-2) の 2 つのチロシンキナーゼ型がよく知られている（Shibuya, 1995, Ferrara and Davis-Smyth, 1997）。VEGF は Flk-1/KDR よりも Flt-1 に約 10 倍高い親和性を示すことが知られている。VEGF の生物学的活性はこれらの受容体を介して発揮されるが、マウス乳腺における両受容体の局在は不明のままである。

VEGF の発現はメディエーターである一酸化窒素（NO）によって調節されている。NO は一酸化窒素合成酵素（NOS）によって産生され、3 種類の同位体（eNOS, nNOS, iNOS）が知られているが、生殖周期に伴う乳腺でのこれらの発現動態は不明のままである。一方、人の乳腺腫瘍では VEGF と NOS の発現動態の関連について多角的に研究が進められているが、動物の乳腺腫瘍ではそのような解析はほとんどみられない。

我々は前回科学研究費の助成を受けて、乳

腺と PSP の関係について研究を行った際に、PSP と VEGF の関連性も免疫組織化学的に検索したところ、泌乳期の乳腺で VEGF の免疫陽性反応が強いこと、その反応は腺胞内に充満した乳汁中にも強く発現することに気付いた。そこで乳汁を摂取した新生仔の十二指腸を免疫組織化学的に検索したところ、十二指腸の管腔および上皮に VEGF の免疫陽性反応が見られたこと、また、搾乳した乳汁中に VEGF を western blotting 法でヒト以外で初めて検出することに成功した（松元ら，2007）。これらのことから、乳汁と共に摂取された VEGF は、消化管から取込まれて新生仔の未熟な組織器官の血管新生に直接あるいは誘導に関与しているのではないかということが考えられた。

さらに、VEGF の受容体の局在を新生仔マウスの十二指腸で検索したところ、Flt-1 が腸絨毛の線条縁に、Flk-1/KDR が腸絨毛固有層の血管内皮細胞に見られたことから、乳汁中の VEGF がこれらの受容体を介して血管新生と消化管機能の調節に関与していることが推察された。このように新生仔の器官の血管新生に乳汁を介して移行した VEGF が受容体を介してどのように関与しているかを明らかにすることは、乳汁の機能を考える上でも意義深い。

## 2. 研究の目的

本研究は、乳腺の VEGF とその受容体の発現動態が乳腺の分化増殖にどのような影響を及ぼすかを正常乳腺および腫瘍乳腺で解析すること、次に新生仔の消化管の分化増殖にこれらが果たす機能を解明すること、さらに乳汁中の VEGF が新生仔の消化管の分化増殖にどのような影響を及ぼしているのかを明らかにすることを目的として行

った。

### 3. 研究の方法

正常乳腺の分化増殖に及ぼす VEGF とその受容体の発現動態を解析するために、マウスの生殖周期の各ステージにおける乳腺組織を用い、免疫組織化学的、組織計測学および生化学的に検索した。

VEGF 発現のメディエーターとして機能する NO を産生する NOS の発現動態について、生殖周期の各ステージのマウスの乳腺組織を用い、3 種類の同位体 (eNOS, nNOS, iNOS) の局在を免疫組織化学的および組織計測学的に解析した。

腫瘍組織における VEGF と NOS の発現動態について、ネコの乳腺腫瘍組織を用いて免疫組織化学的および組織計測学的に検索し、腫瘍のグレードと VEGF や NOS の発現の関連を解析した。

乳汁中の VEGF を検出するために、泌乳期母マウスからは搾乳により、生後 1, 5, 10, 15, 20 日齢の新生仔マウスからは胃内で凝固した乳汁をそれぞれ採取し、western blotting により検出を試みた。

一方、消化管における VEGF とその受容体の発現動態を解析するために、胎齢 18 日および生後 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 日齢のマウスを用い、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸におけるこれらの局在を免疫組織化学的および組織計測学的に解析した。

さらに、外因性 VEGF が内在性の受容体と結合することによりその局在に変化がみられるかを明らかにするために、生後 1, 5, 10, 20, 30 日齢のマウスを用い、十二指腸内に VEGF 蛋白を投与し、受容体との結合動態を免疫組織化学的および組織計測学的に解析した。

### 4. 研究成果

生殖周期における乳腺組織の VEGF の局在をマウスを用いて検索したところ、乳腺上皮細胞あるいは毛細血管内皮細胞の細胞質に発現がみられ、その反応強度は妊娠末期から泌乳前期にかけて最大となる有意な変化を示した。VEGF の発現量を western blotting で検索したところ、45kDa の VEGF-A に相当する蛋白質が、処女期から妊娠末期まで増加し、その後泌乳期で漸減し、離乳期では処女期と同じくらいに減少するという有意な変化を示した。また、VEGFR-1 の局在は全ステージを通してみられなかったが、VEGFR-2 は全ステージとも毛細血管内皮細胞の細胞質に局在していた。これらのことから VEGF は乳腺上皮や血管内皮の細

胞増殖および血管透過性と密接に関連し、その調節はオートクラインまたはパラクラインによって行われていることが示唆された。

VEGF 発現のメディエーターとして機能する NO を産生する NOS の発現動態をマウスの生殖周期で検索したところ、eNOS と nNOS は乳腺上皮の細胞質に局在がみられたが、iNOS は認められなかった。eNOS、nNOS とともに妊娠期に最も高く、泌乳中期に最も低く、以後再び高くなったことから、生殖周期における NO は eNOS と nNOS により産生されること、NO が血管新生誘導と乳腺の分化増殖に関与していることが示唆された。

上記のように正常乳腺の分化増殖に VEGF と NO を産生する eNOS と nNOS の発現動態が関与することが明らかになったことから、次にネコの乳腺腫瘍組織を用いて VEGF と NOS の発現動態と腫瘍のグレードとの関係を免疫組織化学的および組織計測学的に解析した。その結果、腫瘍のグレードが進むにつれて血管密度も上昇し、VEGF と iNOS の発現は正の有意な相関を示したが、eNOS は負の相関を示した。これらのことから、腫瘍の増殖と血管新生に VEGF と NO が関与すること、腫瘍の予後判定に iNOS の発現量が役立つことが示唆された。

次に、マウスの胎仔および生後 1~60 日齢の消化管における VEGF の発現動態を検索したところ、胃・十二指腸・空腸・盲腸・結腸の粘膜上皮細胞および腺細胞の細胞質に陽性反応が観察された。生後 1 日目から反応強度が高くなり、日齢に伴い、胃では主細胞に、十二指腸および空腸ではパネート細胞に強い発現がみられるようになった。VEGFR-1 の局在は、胃を除く消化管の線条縁および腸腺腔縁にのみ観察され、小腸では日齢に伴い陽性細胞の割合と反応強度の低下がみられた。VEGFR-2 は消化管各部位の粘膜の血管内皮細胞に局在していたが、日齢による変化は認められなかった。

生後 1~30 日齢のマウス十二指腸に VEGF を投与し、受容体との結合動態を免疫組織化学的に解析したところ、VEGF と VEGFR-2 の発現には変化が見られなかったが、線条縁に見られる VEGFR-1 の発現が 20 日齢以降有意に減少した。このことから過剰な VEGF は VEGFR-1 にトラップされ、その機能が抑制されることが示唆された。

乳汁中の VEGF の存在を western blotting で検索したところ、VEGF-A に相当する 45kDa のバンドが検出され、泌乳期間中は搾乳乳汁および胃内乳汁凝固物中にその存在が確認された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (3)

1. Islam MS, Matsumoto M, Hidaka R, Miyoshi N, Yasuda N. Expression of NOS and VEGF in feline mammary tumors and their correlation with angiogenesis. *Vet J* (査読有り), doi: 10.1016/j.tvjl.2011.08.032, in press
2. Islam MS, Matsumoto M, Ishida R, Oka T, Kanouchi H. Change in VEGF expression in mouse mammary gland during reproductive cycle. *J Vet Med Sci* (査読有り), 72, 1159-1163 (2010)
3. Islam MS, Matsumoto M, Tsutida K, Oka T, Kanouchi H, Suzuki S. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase (NOS) in mouse mammary gland during reproductive cycle. *J Vet Med Sci* (査読有り), 71, 945-949 (2009)

[学会発表] (9)

1. 森本優, 松隈知子, 辻尾祐志, 叶内宏明, 松元光春. マウス乳腺の生殖周期における二核細胞の動態と微細形態. 第 152 回日本獣医学会学術集会, 2011 年 9 月 19 日, 大阪府立大学, 堺市
2. 高桑舞, 辻尾祐志, 松元光春. マウス乳腺におけるレクチン組織化学. 第 150 回日本獣医学会学術集会, 2010 年 9 月 18 日, 帯広畜産大学, 帯広市
3. 阿部和己, 辻尾祐志, 松元光春. マウス乳腺におけるグレリンと細胞動態に関する免疫組織化学的解析. 第 150 回日本獣医学会学術集会, 2010 年 9 月 18 日, 帯広畜産大学, 帯広市
4. Islam MS, 松元光春, 辻尾祐志. Expression and localization of VEGFR-2 in mouse mammary gland during reproductive cycle. 第 150 回日本獣医学会学術集会, 2010 年 9 月 18 日, 帯広畜産大学, 帯広市
5. Islam MS, 松元光春, 日高遼太郎, 三好宣彰, 安田宣紘. Immunohistochemical localization of NOS and VEGF in feline mammary carcinoma. 第 149 回日本獣医学会学術集会, 2010 年 3 月 28 日, 日本獣医生命科学大学, 武蔵野市
6. Islam MS, Matsumoto M, Ishida R, Oka T, Kanouchi H. Changes in the expression of VEGF in the mouse mammary gland during reproductive cycle. The 3<sup>rd</sup> Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists, 2009 年 11 月 5

日, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

7. 石田理奈, 松元光春, 藤田あゆみ, 叶内宏明, 岡達三. 乳汁中の VEGF と新生仔消化管における VEGF 受容体の局在. 第 148 回日本獣医学会学術集会, 2009 年 9 月 25 日, 鳥取県立図書館, 鳥取市
8. 日高遼太郎, 松元光春, 三好宣彰, 安田宣紘. 猫の乳腺腫瘍における筋線維芽細胞の形態学的解析. 第 148 回日本獣医学会学術集会, 2009 年 9 月 25 日, 鳥取県立図書館, 鳥取市
9. 貝塚左希子, 松元光春, 三好宣彰, 安田宣紘. イヌの正常乳腺組織におけるレクチン組織化学的研究. 第 148 回日本獣医学会学術集会, 2009 年 9 月 25 日, 鳥取県立図書館, 鳥取市

[その他]

ホームページ等

<http://kuris.cc.kagoshima-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松元 光春 (MATSUMOTO MITSU HARU)

研究者番号: 30157383

(2) 研究分担者

岡 達三 (OKA TATSUZO)

研究者番号: 50116795

叶内 宏明 (KANOUCHI HIROAKI)

研究者番号: 10351884