

# Corning® マトリゲル 基底膜マトリックスを用いた *in vivo* / *ex vivo* 血管新生定量法

東京大学先端科学技術研究センター システム生物医学分野  
未弘 淳一、南 敬

## イントロダクション

血管新生 (angiogenesis) は腫瘍進展や糖尿病網膜症といった生活習慣病と深く関わっており、抗血管新生療法がそれらに対する効果的な治療法として近年広く選択されるようになってきた。血管新生を引き起こす機序は血管内皮細胞増殖因子 (VEGF: vascular endothelial growth factor) をはじめとして多くのシグナル経路が同定されているが未だ不明な点も多く、マウスなど動物モデルを用いた血管新生定量アッセイを通して詳細に解析していくことが求められている。今回はマウスやラットなど小動物を対象とした血管新生定量法として知られている Matrigel plug アッセイ、Aortic ring アッセイを Corning マトリゲル 基底膜マトリックスを用いて行う方法を紹介する。

## 1. Matrigel plug アッセイ

### 準備

#### —マウス—

C57BL/6J マウス (6 週齢から 10 週齢くらいの若いマウス)

#### —試薬・器具—

Corning マトリゲル 基底膜マトリックス (Cat# 356230) (Corning Incorporated, USA)、Avertin (2, 2, 2-tribromoethanol, 2-methyl-2butanol)、1 mL シリンジ (TERUMO, Japan)、26G/ 27G ニードル (TERUMO, Japan)、O.C.T Compound TissueTek (Sakura FineTek, USA)、パラホルムアルデヒド (WAKO, Japan)、スクロース (WAKO, Japan)、PBS (Sigma Aldrich, USA)、ヘマトキシリン溶液 (WAKO, Japan)、エオジン溶液 (WAKO, Japan)、ホルムアミド (WAKO, Japan)、1.5 mL マイクロチューブ、エバンスブルー (Sigma Aldrich, USA)、Falcon® 100 mm セルカルチャーディッシュ (Cat# 353003) (Corning Incorporated, USA)、Falcon® セルカルチャー 6 ウェル マルチウェルプレート (Cat# 353046) (Corning Incorporated, USA)、マイジェクター注射針付シリンジ (TERUMO, Japan)、動物用バリカン、anti-mouse CD34 (PECAM1) 抗体 (Cat# 550274) (BD Biosciences, USA)、Alexa Fluor® 488 goat anti-rat IgG (H+L) (Cat# A-11006) (Molecular Probe, USA)

#### —実験装置—

DM LS 正立顕微鏡 (Leica, Germany)、CM3050S クライオスタット (Leica, Germany)、Ultrospec 2000 分光光度計 (Pharmacia Biotech, USA)

CORNING

## 方法と結果

Matrigel plug アッセイのフローチャートを示す (Fig.1)。今回は、抽出した Corning マトリゲル 基底膜マトリックスで凍結切片を作成してヘマトキシリンエオジン染色、または内皮マーカである CD31 (PECAM-1) 特異的抗体を用いた免疫組織化学により観察する方法、及びマウスにエバンスブルーを静注し、吸光度計により血管密度を定量する方法を以下で紹介する。

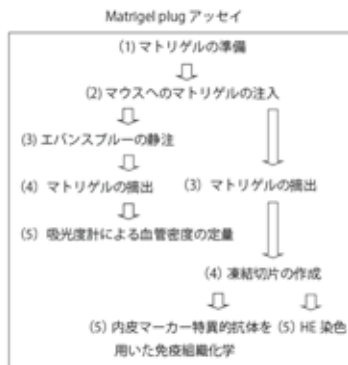


Fig.1 Matrigel plug アッセイのフローチャート

### －Corning マトリゲル 基底膜マトリックスの準備－

Corning マトリゲル 基底膜マトリックスは使用する前日から 4℃ にし解凍しておく。当日は 1.5 mL チューブに 500 µL のマトリゲルを分注し、氷上に置いたままマウス室へ持ち込む。

### －マウスへのCorning マトリゲル 基底膜マトリックスの注入－

C57BL/6J マウスに Avertin を用いて麻酔をかけてマトリゲルを注入するわき腹（もしくは足の付け根）の毛を動物用バリカンで剃る。27 G ニードルを用いてマトリゲル 500 µL を皮下に注入する (Fig.2 A)。この際、すぐにニードルを抜くと固まる前に Corning マトリゲル 基底膜マトリックスが出てくる場合があるので、注入後落ち着くまでしばらくニードルはそのままにしておく。

### －Corning マトリゲル 基底膜マトリックスの抽出－

Corning マトリゲル 基底膜マトリックスを埋め込んで 10 日後、マウスに Avertin で麻酔をかけて Corning マトリゲル 基底膜マトリックスを抽出する。周囲組織をまとめて抽出すると、凍結切片を作成する際にカットしやすくなる (Fig.2 B)。Corning マトリゲル 基底膜マトリックスを抽出する前にエバンスブルーを静注しておく、Corning マトリゲル 基底膜マトリックス内に漏出してくるエバンスブルーの量により血管密度を定量することができる。

### －凍結切片の作成－

4% パラホルムアルデヒド溶液に浸して室温で 4 時間固定し、20% スクロース溶液に浸して室温で 18 時間放置した後 (Fig.2 C、D)、OCT compound TissueTek に包埋する (Fig.2 E)。以上の作業は、低温で行うと Corning マトリゲル 基底膜マトリックスが溶けてしまうので室温で行う。凍結はメタノールをドライアイスで冷やしたものを (Fig.2 F)、凍結後 - 80℃ で保存する。

切片を作成する 1 時間ほど前に - 80℃ 冷凍庫からクライオスタット内 (Object Temperature : - 20℃、Chamber Temperature : - 12℃) に入れておく。その後、クライオスタットにサンプルを設置し、厚さ 14 µm で凍結切片を作成し、スライドガラスに貼りつける。マトリゲルはやわらかく切片が作りづらいのでサンプルと刃の温度管理をしっかり行うことに注意する。スライドガラス上のサンプルは - 80℃ で保存可能である。

この後、ヘマトキシリンエオジン染色を行い血管の様子を正立顕微鏡で観察する (Fig.2 G)。ヘマトキシリンエオジン染色を行わず内皮細胞のマーカ-を用いた免疫組織化学を行うことで蛍光顕微鏡を用いた画像解析で定量を行うことも可能である。

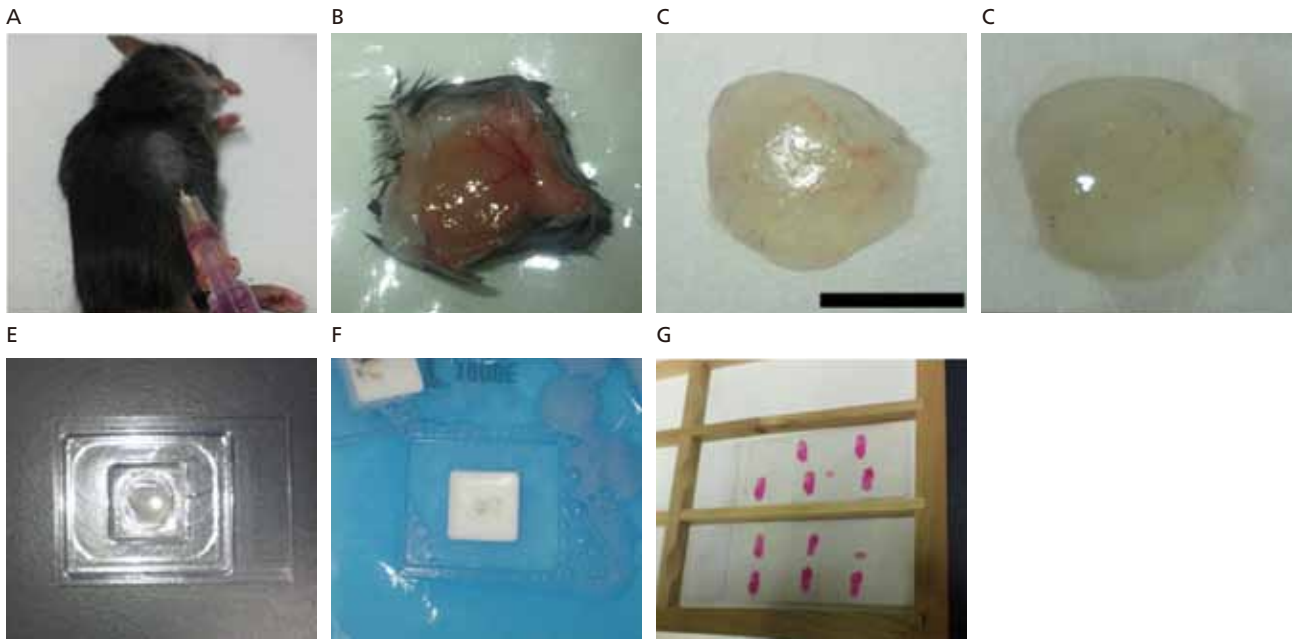


Fig.2 A. マトリゲルをマウスのわき腹に注入する様子、B. 周辺組織とともにマトリゲルを摘出したもの、C. 摘出直後のマトリゲル、1目盛り0.5 cm、D. ホルマリン固定後に20%スクロースで置き換えたマトリゲル、E. O.C.T. compoundに包埋したもの、F. ドライアイスで冷やしたメタノールを用いた凍結、G. HE染色後の切片、サイズを示すbarはいずれも0.5 cm

### ーヘマトキシリンエオジン染色による血管観察(Fig.3 A)ー

スライドガラス上のサンプルを室温に戻し、4% パラホルムアルデヒド溶液で室温、10分間再度固定を行う。PBSで洗浄した後に以下の方法で、ヘマトキシリン溶液とエオジン溶液で染色を行う。ヘマトキシリンエオジン染色による新生血管の観察像を示す (Fig.3 A)

- ① PBSで1分洗浄。
- ② ヘマトキシリン溶液に10～30秒浸す。
- ③ 青色がきれいに表れてくるまで流水で洗う。
- ④ エオジン溶液に30～60秒浸す。
- ⑤ 70% エタノールに1分浸す。
- ⑥ 80% エタノールに1分浸す。
- ⑦ 90% エタノールに1分浸す。
- ⑧ 95% エタノールに1分浸す。
- ⑨ 100% エタノールに1分浸す。
- ⑩ キシレンに3分×3回浸す。
- ⑪ マリノール液を用いて、カバーガラスで封入する。
- ⑫ 乾燥した後、正立顕微鏡で観察する。

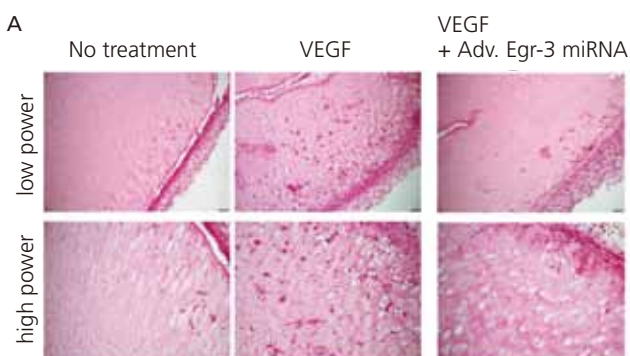


Fig.3 A. 内皮活性化に関わる転写因子をmiRNA発現アデノウイルスで抑制した際の新生血管の観察

### ー内皮細胞マーカーを用いた免疫組織化学による血管新生の定量(Fig.3 B)ー

スライドガラス上のサンプルを室温に戻し、4% パラホルムアルデヒドで室温、10 分間再度固定を行う。PBS で洗浄した後以下の方法で内皮細胞マーカーである PECAM1 (CD31) の特異的抗体を用いて免疫組織化学により血管新生を定量する (Fig.3 B)。

- ① PBS で 3 分× 3 回洗浄する。
- ② 1%BSA を含む PBS を適量たらし室温で 60 分間静置し、ブロッッキングを行う。以下の作業では、スライドガラスに液を加えた後はパラフィルムを乗せて乾燥を防ぐようにする。
- ③ 1%BSA を含む PBS に anti-mouse CD34 (PECAM1) 抗体を 100 ~ 200 倍希釈して、スライドガラス上に載せ、室温で 45 ~ 60 分間静置する。
- ④ キムタオルなどを用いて液を吸い取ってから PBS で室温、10 分間× 3 回洗浄する。
- ⑤ 1%BSA を含む PBS に Alexa Fluor® 488 goat anti-rat IgG (H+L) を 100 ~ 500 倍希釈してガラス上に載せ、室温で 45 ~ 60 分間静置する。
- ⑥ キムタオルなどを用いて液を吸い取ってから PBS で室温、10 分間× 3 回洗浄する。
- ⑦ PBS を入れ、シェイカーで室温、10 分間洗浄する (計 3 回行う)。
- ⑧ マウント液を垂らし、空気が入らないようにカバーガラスを載せる。
- ⑨ スライドガラスをマッペに載せて、暗所 4°C で 1 日間乾燥させる。

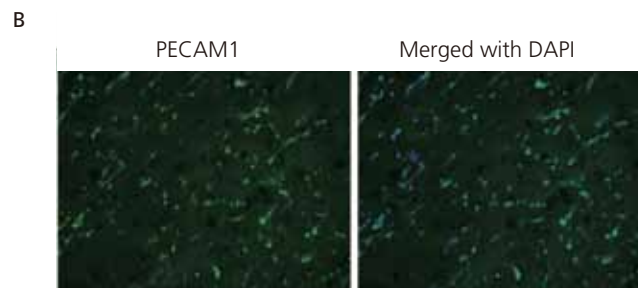


Fig.3 B. C57BL/6J マウスで Matrigel plug assay (VEGF 有)

### ーエバンスブルーによる血管新生の定量(Fig.3 C)ー

10 日間 Corning マトリゲル 基底膜マトリックスを埋め込んだマウスに対し、PBS で 1% エバンスブルーを溶解し、マイJECTA注射針付シリンジを用いて眼底静脈、もしくは尾静脈から 100  $\mu$ L 注入する。その後、2 mM EDTA を含む PBS で心臓から灌流し血液が洗い流されたのを確認し Corning マトリゲル 基底膜マトリックスを抽出する。Corning マトリゲル 基底膜マトリックスの重さを量り、1.5 mL チューブにいれたホルムアミド 500  $\mu$ L へ Corning マトリゲル 基底膜マトリックスを浸漬して 37°C、48 時間静置する。ホルムアミド中に Corning マトリゲル 基底膜マトリックス内のエバンスブルーが溶出されたのを確認し、620 nm 吸光度にて溶出された Corning マトリゲル 基底膜マトリックス単位重量あたりのエバンスブルー(血管密度に相当)を定量する。測定するホルムアミドは吸光度計のキュベットの容量に合わせて一部を使用すればよい。VEGF 有無による新生血管の定量結果を示す。(Fig.3 C)

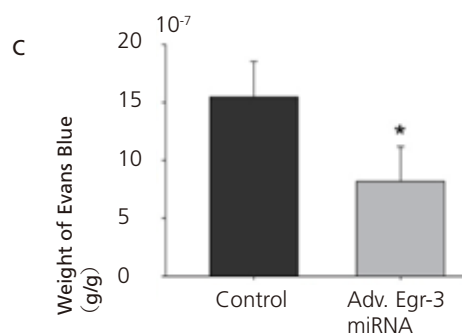


Fig.3 C. エバンスブルーによる定量結果 詳細は文献を参照

## 2. Aortic ring アッセイ

### 準備

#### —マウス—

C57BL/6J マウス (6 週齢から 10 週齢くらいの若いマウス)

#### —試薬・器具—

Corning マトリゲル 基底膜マトリックス (Cat# 356230) (Corning Incorporated, USA)、Avertin (2, 2, 2 tribromoethanol, 2-methyl-2butanol)、解剖用ナイフ、ハサミ、各種ピンセット、1 mL シリンジ (TERUMO, Japan)、26 G /27G ニードル (TERUMO, Japan)、PBS (Sigma Aldrich, USA)、アガロース Type VII (cat.# A9045, Sigma Aldrich, USA)、MCDB131 (Sigma Aldrich, USA)、Glutamine (Sigma Aldrich, USA)、penicillin-streptomycin (Sigma Aldrich, USA)、FBS (GIBCO, USA)、17 mm · 10 mm 径の金属型

#### —実験装置—

MZ 125 実体顕微鏡 (Leica, Germany)、DM LS 正立顕微鏡 (Leica, Germany)、画像解析ソフトウェア (Photoshop, Image J)、血管新生定量ソフトウェア (KURABO, Japan)

### 方法と結果

Aortic ring アッセイのフローチャートを示す (Fig.4 A)。ドーナツ状のアガロースカルチャーウェルを作成して中心の穴に Corning マトリゲル 基底膜マトリックスを流し込み、摘出したマウス大動脈を入れて培養を行う。位相差顕微鏡で観察し、画像解析により新生血管を定量する。

#### —アガロース カルチャーウェルの作成—

超純水にて 1.5% (w/v) Type IV アガロースを調製しオートクレーブ滅菌する。10 cm ディッシュに流し込み、冷蔵庫で 30 分間静置し固まったのを確認し、オートクレーブ滅菌した金属型を用いて外径 17 mm、内径 10 mm ドーナツ状にアガロースを型抜きする (Fig.4 B)。

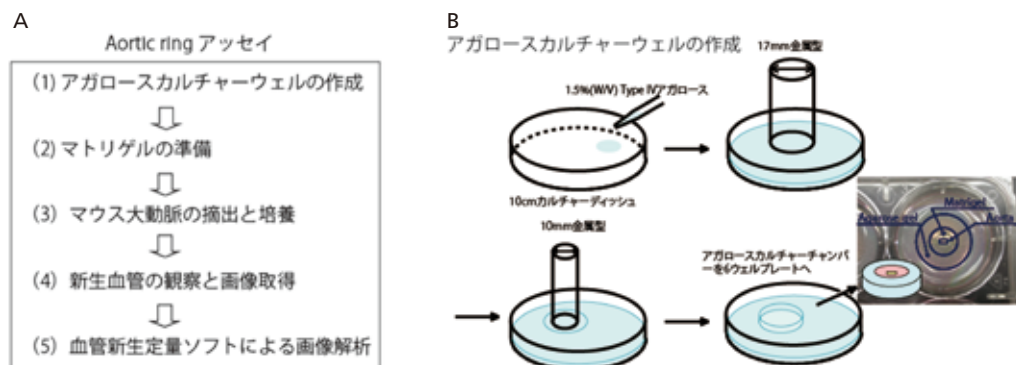


Fig.4 A. Aortic ring アッセイのフローチャート、B. アガロースカルチャーウェル作成の模式図

## –Corning マトリゲル 基底膜マトリックスの準備–

Corning マトリゲル 基底膜マトリックスは使用する前日から4℃にし解凍しておく。アガロースカルチャーウェルを6ウェルプレートに置き、リング内にマトリゲルを500 μL 注入する。37℃で30分以上静置し、Corning マトリゲル 基底膜マトリックスが重合するのを待つ。Corning マトリゲル 基底膜マトリックスはマウス大動脈摘出後も使用するため、氷上においておく。

## –マウス大動脈の摘出と培養–

Avertin 麻酔下のマウスからマウス大動脈を摘出し、冷 PBS に浸し実体顕微鏡下で脂肪組織などを剥離する。マウス大動脈のみの状態にした後、解剖用ナイフを用いて1mm 間隔にセクションする。先ほど用意したアガロースゲル内の Corning マトリゲル 基底膜マトリックス上にセクションしたマウス大動脈を置き、Corning マトリゲル 基底膜マトリックスを重層する。37℃で Corning マトリゲル 基底膜マトリックスを重合させ、アガロースリング外に MCDB131 培養液 (0.5% FBS 含、血管新生因子有無) を流し込み 10 日程度培養する。アガロースゲルリングの外に培養液があることでアガロースゲルリング内に血管誘引因子の濃度勾配ができ、その結果マウス大動脈から周辺に向けて新生血管が伸びてくる。数日たつと、新生血管が伸びてくる様子が観察できるので、位相差顕微鏡とカメラで様子を経時的に観察する。

## –新生血管の定量解析–

位相差顕微鏡で取得した画像を Photoshop によりコントラストを調節し、新生血管が見えるように加工する。定量性を損なわないため、すべての画像を同じ条件で処理することに注意する。処理後の画像を血管新生定量ソフトウェアにより解析し、新生血管の長さ・分岐数を定量する (Fig.5)。

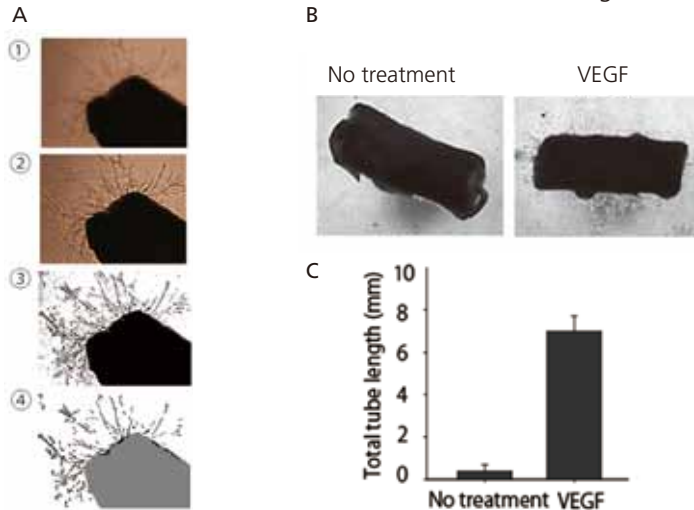


Fig.5 A. Aortic ring アッセイにおける画像解析の例、  
①位相差像、  
②新生血管のアンシャープマスクによる強調、  
③画像の2階調化、  
④血管新生解析ソフトによる新生血管の抽出  
B. 新生血管の様子  
C. 定量結果

## 参考文献

Suehiro J, et. al. *Blood*, 2010; 115 (12) : 2520-2532

Corning® は CORNING Incorporated の登録商標です。  
商品の外観・仕様は予告無しに変更することがあります。予めご了承下さい。

Corning acquired the Discovery Labware Business including the BioCoat™, FluoroBlok™, and Matrigel® brands. For information, visit [www.corning.com/discoverylabware](http://www.corning.com/discoverylabware).

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures. Not for resale.

For a listing of trademarks, visit us at [www.corning.com/lifesciences/trademarks](http://www.corning.com/lifesciences/trademarks).

All other trademarks are property of their respective owners.

Corning Incorporated, One Riverfront Plaza, Corning, NY 14831-0001

総販売元

コーニングインターナショナル株式会社  
ライフサイエンス事業部

〒107-0052 東京都港区赤坂 1-11-44 赤坂インターシティ7階  
Tel : 03-3586-1996  
[www.corning.com/lifesciences](http://www.corning.com/lifesciences)  
CLSJP@corning.com

© 2012, 2013 Corning Incorporated  
CLS-028-01