

図1: ANGがリンパ管内皮細胞の増殖能に与える影響

6wellマルチプレートに新生児および成人由来HMVEC-dLyを1wellあたり 5×10^4 個ずつ播種した。ANGおよびVEGF-Cを添加し、経時的に細胞数を測定し増殖能を検討した。培養5日目ではANG添加群で増殖能が有意に促進された。VEGF-C添加群とANG/VEGF-C添加群でも増殖能が有意に促進された。一方培養2日目では新生児由来HMVEC-dLyでANG添加群と対照群との間に有意差は認められなかった。平均値±標準偏差(n=3)を示す。*:対照群に対する統計的有意差を示す(p<0.05)。

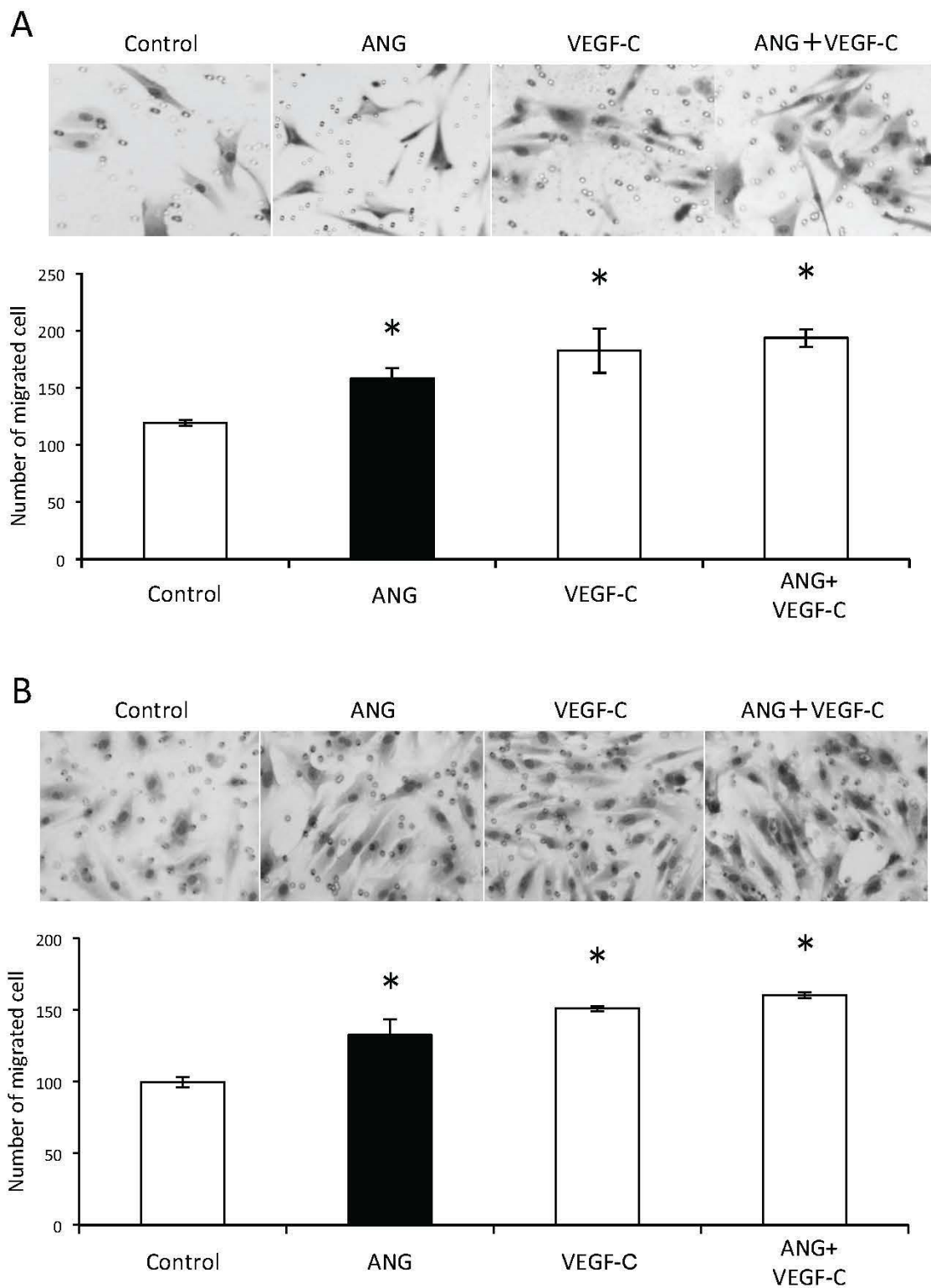


図2: ANGがリンパ管内皮細胞の遊走能に与える影響

遊走能の検討はmigration assayで評価を行った。すなわち, Matrigel Invasion Chamber 24-well®のノンコートインサートを使用した。Aは新生児由来HMVEC-dLy, Bは成人由来HMVEC-dLyの結果を示す。それぞれ上段は, インサート裏面をディフ・クイック染色したものを示す。グラフに示すようにANG添加群では遊走能が有意に促進された。平均値±標準偏差 (n=3)を示す。*: 対照群に対する統計的有意差を示す (p<0.05)。

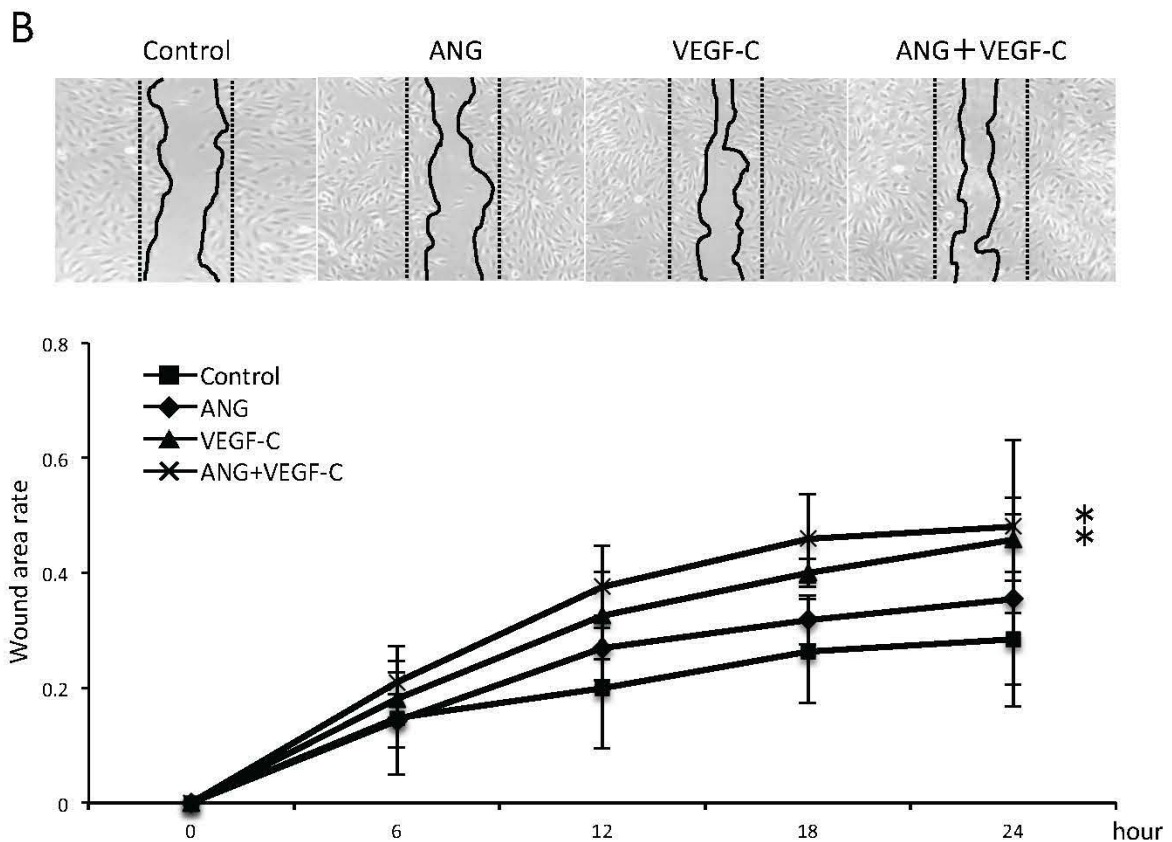
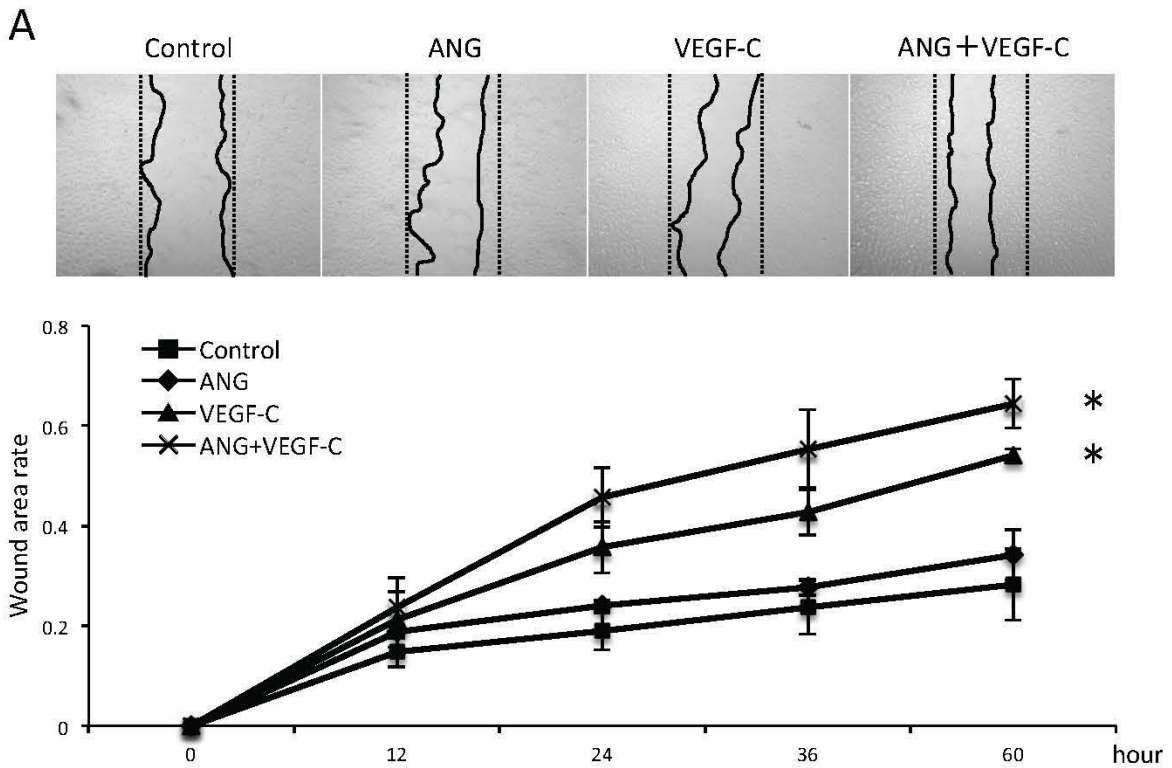


図3: ANGがリンパ管内皮細胞の運動能に与える影響

運動能の検討はwound healing assayで評価を行った。プレート上に細胞を播種し、模擬的な創傷を作製した。Aは新生児由来HMVEC-dLy, Bは成人由来HMVEC-dLyが新たに移動してきた面積の割合を示す。ANG添加群は対照群と比較して創傷面積の縮小を認めたが有意差は認められなかった。平均値±標準偏差(n=3)を示す。*:対照群に対する統計的有意差を示す(p<0.05)。

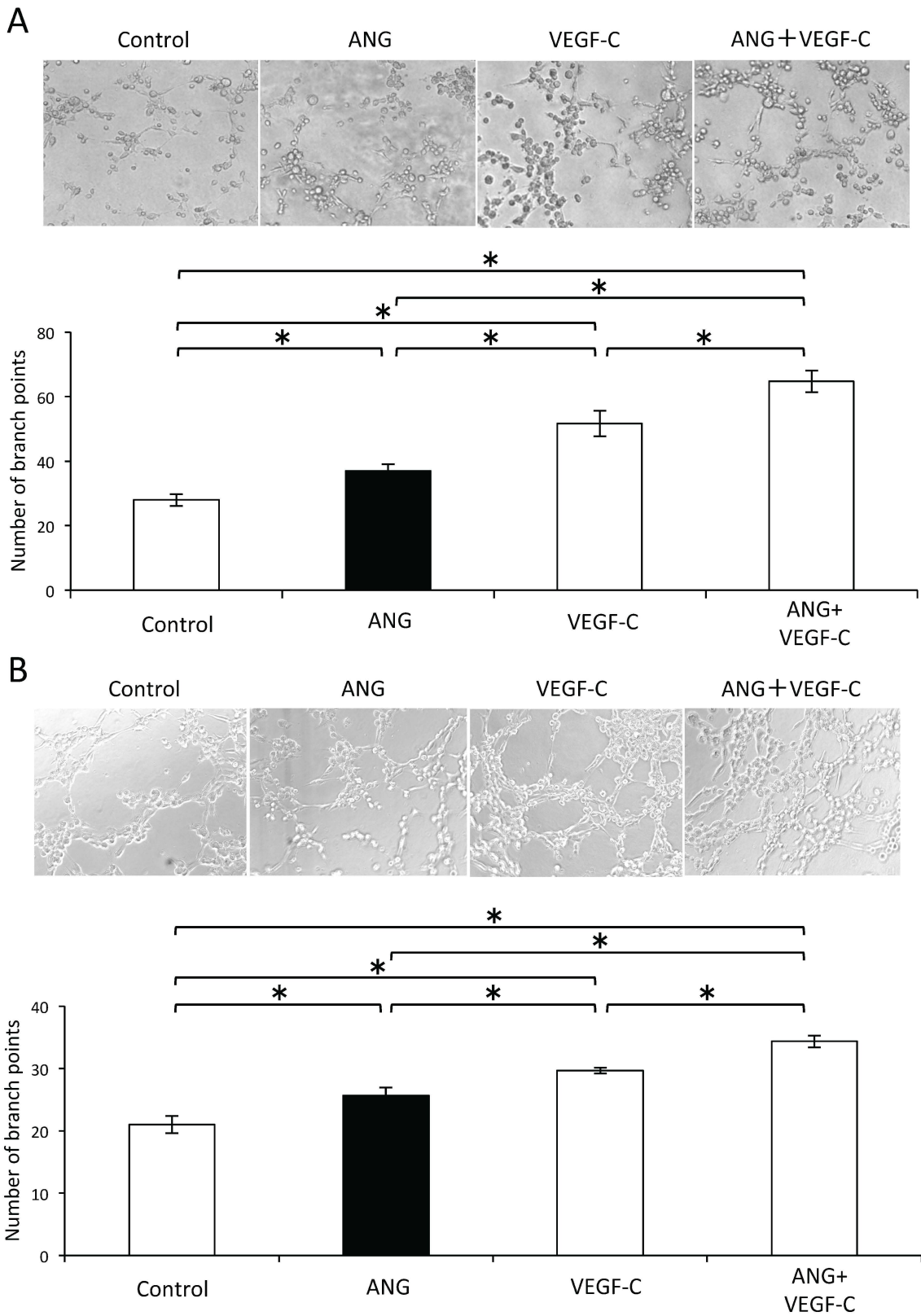


図4: ANGがリンパ管内皮細胞の管腔形成能に与える影響

管腔形成能の検討はEndothelial Tube Formation Assay[®]で評価を行った。Aは新生児由来HMVEC-dLy, Bは成人由来HMVEC-dLyの結果を示す。ANG添加群では、対照群に比べて網状の管腔様構造物がより多く観察された。平均値±標準偏差(n=3)を示す。*:各群間の統計的有意差を示す(p<0.05)。

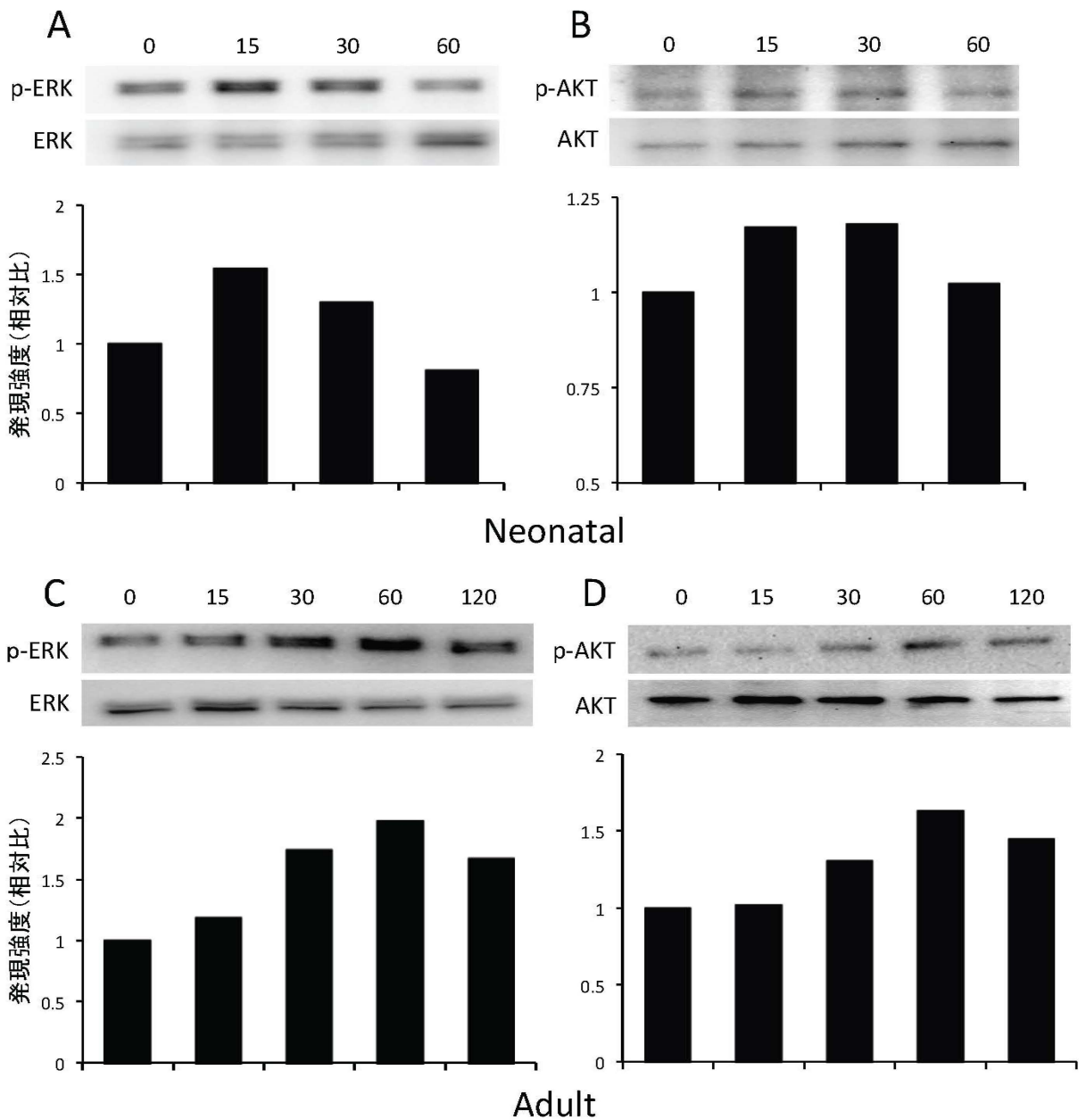


図5: ANGがリンパ管内皮細胞のシグナル伝達経路に与える影響

ウェスタンブロット法を用いて、ANGを添加したときの継時的な変化について検討した。ANGを添加して0分、15分、30分、60分、120分後の細胞を回収し、ERKとAKTのリン酸化について検討した。

A: 新生児由来HMVEC-dLyではERKは15分後にリン酸化のピークを迎え、その後低下した。

B: 新生児由来HMVEC-dLyではAKTは15分後から30分後にリン酸化のピークを迎え、その後低下した。

C: 成人由来HMVEC-dLyではERKは60分後にリン酸化のピークを迎え、その後低下した。

D: 成人由来HMVEC-dLyではAKTは60分後にリン酸化のピークを迎え、その後低下した。

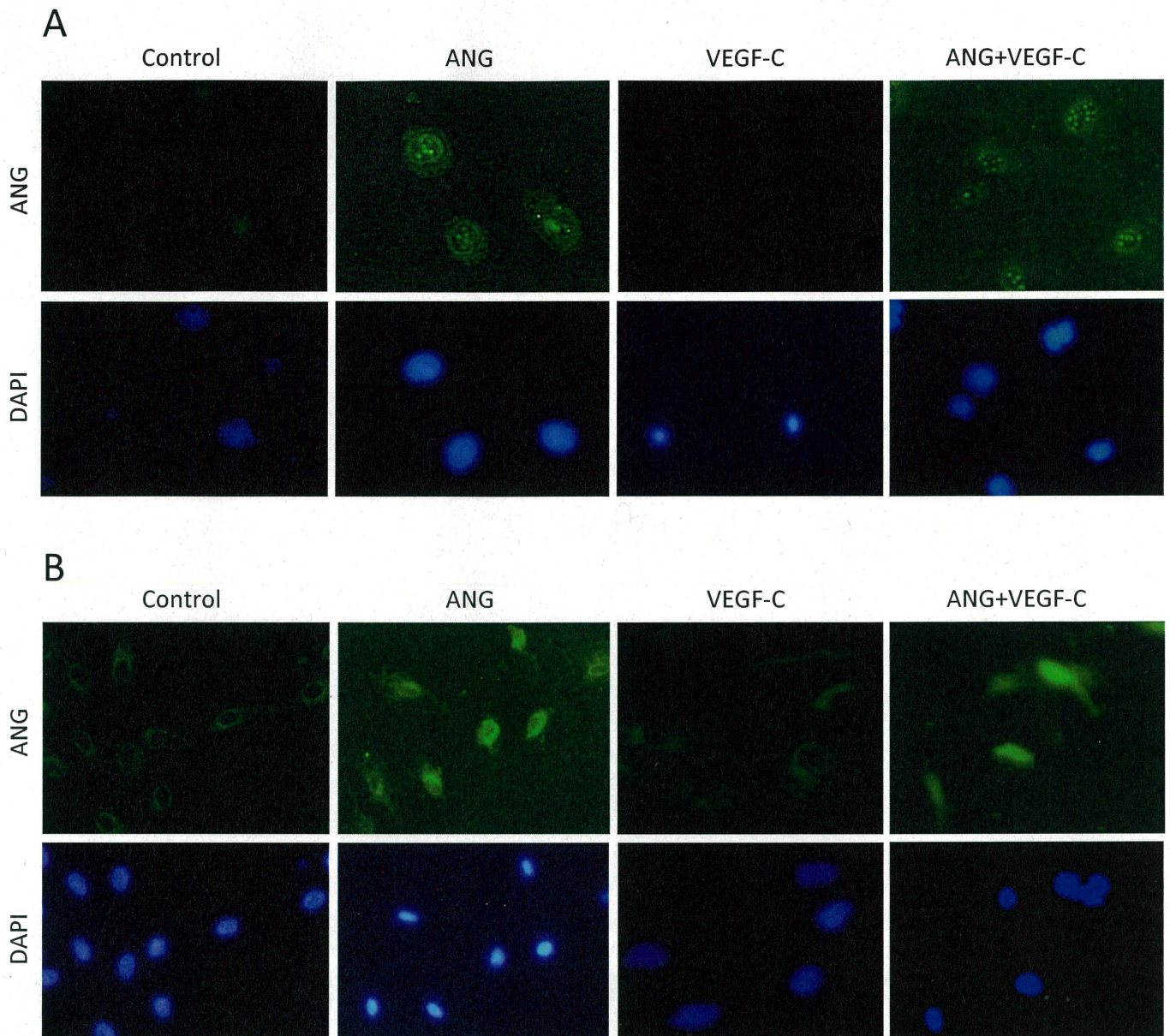


図6: ANGがリンパ管内皮細胞の細胞内局在に与える影響

ANGまたはVEGF-Cで刺激した群と、対照群を免疫蛍光抗体法を用いて比較検討した。Aは新生児由来HMVEC-dLy, Bは成人由来HMVEC-dLyの結果を示す。ANG添加群およびANG/VEGF-C添加群ではANGの核内移行を認めた。

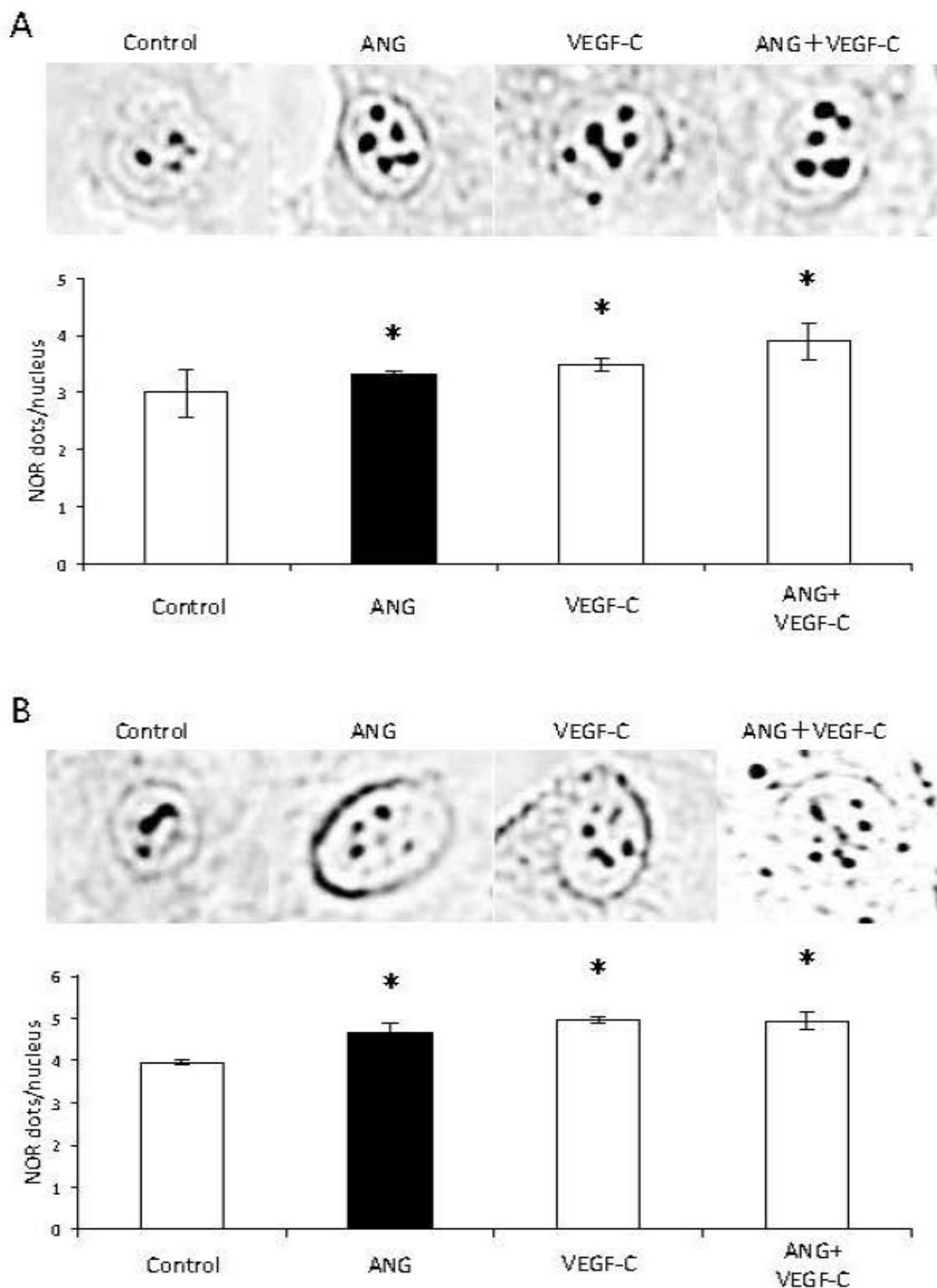


図7: ANGがリンパ管内皮細胞のリボソーム形成能に与える影響

Cultureslides®にリンパ管内皮細胞を播種し、ANGまたはVEGF-Cを添加し、24時間後にAgNOR染色法を行った。Aは新生児由来HMVEC-dLy、Bは成人由来HMVEC-dLyの結果を示す。ANG添加群では核内のAgNOR陽性数の増加を認めた。平均値±標準偏差(n=3)を示す。*:対照群に対する統計的有意差を示す(p<0.05)。

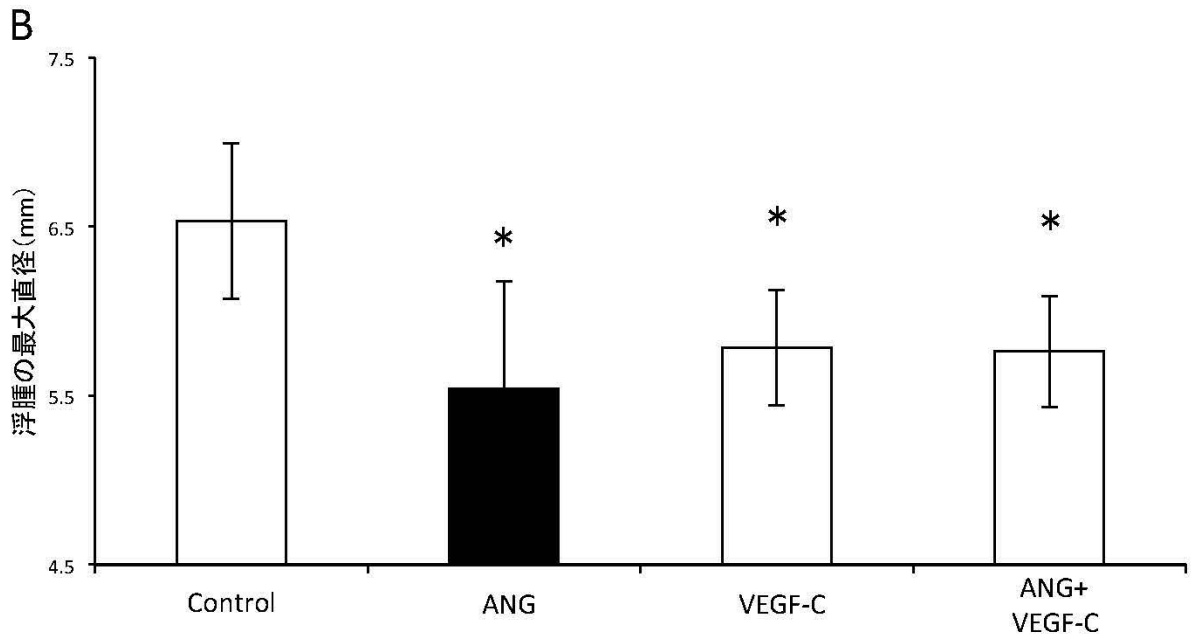
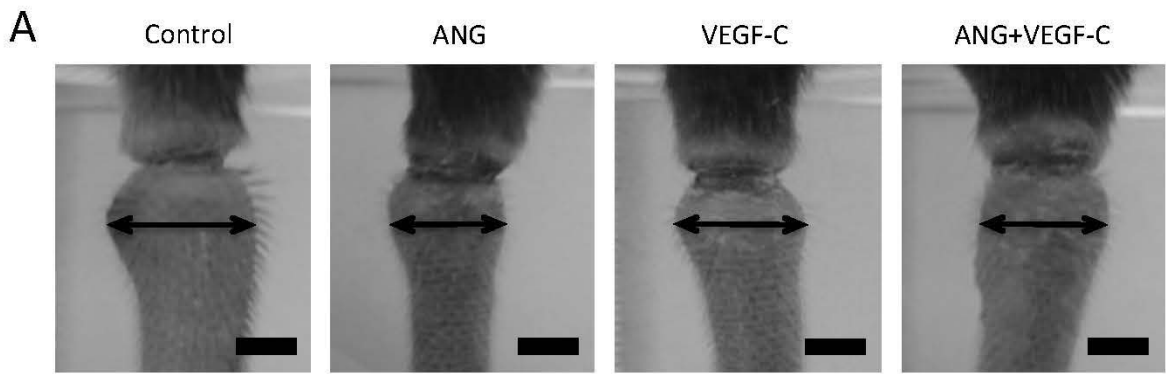


図8: ANGがマウスリンパ浮腫モデルに与える影響

8週齢雄C57BL/6マウスの尾基部から1cm遠位の表皮を2mm環状に剥離し、リンパ浮腫モデルを作製した。投与群にはANGおよびVEGF-Cを、対照群にはPBSを週3回腹腔内投与した。Aはモデル作製後12日目の尾の比較写真を示す。表皮剥離部位の遠位に浮腫が形成されている。Bは形成された浮腫の最大直径。平均値±標準偏差(n=5)を示す。*:対照群に対する統計的有意差を示す(p<0.05)。Bar: 2.0mm

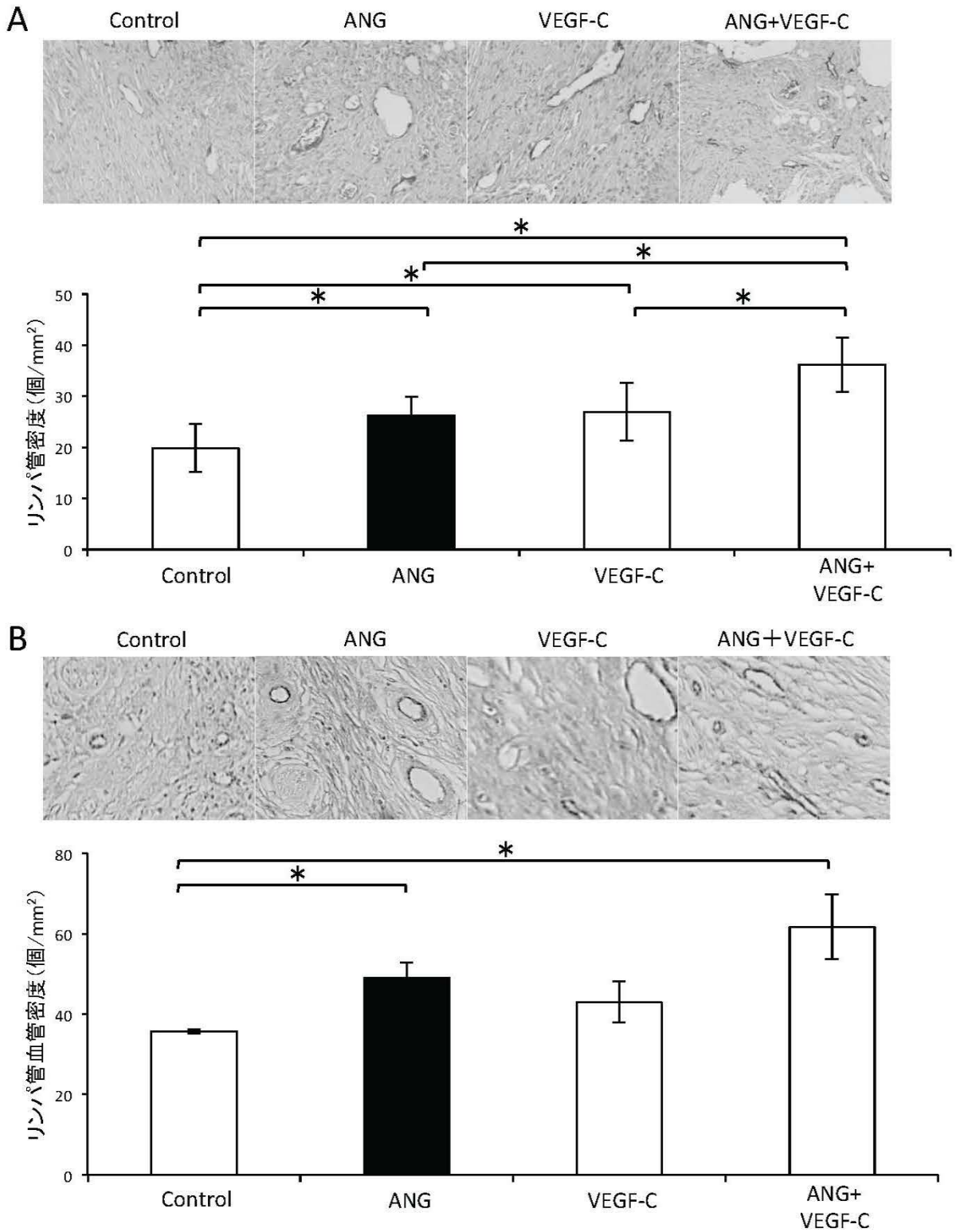


図9: ANGがマウスリンパ浮腫モデルのLYVE-1およびCD31発現に与える影響

抗LYVE-1抗体および抗CD31抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。リンパ管および血管密度の高い部位を100倍視野下で3視野選び、リンパ管数および血管数を計測し平均値を算出し評価した。Aは抗LYVE-1抗体の染色像およびリンパ管密度を示す。ANG投与群、VEGF-C投与群およびANG/VEGF-C投与群ではリンパ管新生が促進された。またANG/VEGF-C投与群ではANG投与群およびVEGF-C投与群と比較してリンパ管新生が有意に促進された。Bは抗CD31抗体の染色像およびリンパ管血管密度を示す。ANG投与群とANG/VEGF-C投与群ではリンパ管新生および血管新生が促進された。平均値±標準偏差(n=5)を示す。*:各群間の統計的有意差を示す(p<0.05)。