



Title	マウスの眼球硝子体血管の特殊性に関する研究
Author(s)	岸本, 亜由子
Description	配架番号 : 2424
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13289号
Issue Date	2018-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13289
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71883
Type	doctoral thesis
File Information	Ayuko_Kishimoto.pdf



学位論文

マウスの眼球硝子体血管の特殊性に関する研究

(Studies on characteristics of hyaloid vasculature in the eyes of murine neonates)

2018 年 9 月

北 海 道 大 学

岸本 亜由子

学位論文

マウスの眼球硝子体血管の特殊性に関する研究

(Studies on characteristics of hyaloid vasculature in the eyes of murine neonates)

2018 年 9 月

北 海 道 大 学

岸本 亜由子

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	3 頁
略語表	7 頁

第1章

緒言	8 頁
実験方法	10 頁
実験結果	12 頁
考察	21 頁

第2章

緒言	24 頁
実験方法	26 頁
実験結果	28 頁
考察	37 頁

総括および結論	41 頁
謝辞	42 頁
引用文献	43 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Ayuko Kishimoto, Hiromi Takahashi-Iwanaga, Masahiko Watanabe M, Toshihiko Iwanaga

Differential expression of endothelial nutrient transporters (MCT1 and GLUT1) in the developing eyes of mice.

Exp. Eye Res. 153: 170-177 (2016).

Impact factor: 3.332 (2016 年版)

2. Ayuko Kishimoto, Shunsuke Kimura, Junko Nio-Kobayashi, Hiromi Takahashi-Iwanaga, Ah-Mee Park, Toshihiko Iwanaga

Histochemical characteristics of regressing vessels in the hyaloid vascular system of neonatal mice: novel implication for vascular atrophy.

Exp. Eye Res. 172: 1-9 (2018)

Impact factor: 3.332 (2016 年版)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Ayuko Kishimoto, Zheng Miao, Hiromi Takahashi-Iwanaga, and Toshihiko Iwanaga

Intensified expression of monocarboxylate transporter (MCT1) in the filopodia of growing endothelial cells in the brain. XXIV International Symposium on Morphological Sciences.

2015 年 9 月 3 日～6 日, イスタンブール

2. 岸本亜由子、岩永ひろみ、渡辺雅彦、岩永敏彦
発達期の脳血管内皮に発現する栄養素トランスポーター
第 61 回日本解剖学会 東北・北海道連合支部学術集会
2015 年 8 月 29 日・30 日, 盛岡

3. 岸本亜由子、岩永ひろみ、岩永敏彦

硝子体動脈の分布様式と内皮細胞が発現する栄養素トランスポーター
第 121 回日本解剖学会 総会・全国学術集会
2016 年 3 月 28 日～30 日, 郡山

緒言

眼の血管系は伸長と退縮が組み合わさったユニークな発達過程を示し、類似の現象は他器官の血管系では確認されてない。すなわち、胎生期に水晶体を栄養するために硝子体動脈が眼球乳頭部から進入し、分岐した血管網が網膜に沿って硝子体全体に広がる固有硝子体血管(vasa hyaloidea propria, VHP)をつくる。また別の血管束は水晶体に向かい、水晶体後面をおおう水晶体血管膜(tunica vasculosa lentis, TVL)をつくる(図1)。これら2つの血管系を合わせて硝子体血管系 hyaloid vasculature と呼ぶが、この血管系が残存すると視野の邪魔になるため、生後次第に退行する。それと入れ代わりに網膜固有の血管系が網膜内の表層を広がっていく(図2)。

マウスの場合、硝子体血管系は生後7日ごろから退縮を始め、16日ごろに消滅する(Brown et al. 2005)(図3)。この硝子体血管系伸長・消退の分子機構や血管鋳型標本による研究は散見される。例えば、血管内皮細胞に対して、マクロファージは単独で隣接するウィント経路を介し硝子体血管の退縮プログラムを誘導する(Lang and Bishop 1993; Lobov et al. 2005)、あるいは VEGF を発現する水晶体上皮細胞と、その受容体である flk-1 を発現する硝子体血管内皮との物理的な距離の乖離によって退縮が引き起こされる(Mitchell et al. 1998)という報告もある。起こるはずの消退が不完全であれば、重篤な視力障害につながる。一方、眼の血管系をモデルにして血管の伸長・退行機序が解明できれば、人為的に血管系の成長や退行をコントロールでき、がんを栄養する血管を退縮させ兵糧攻めにするがん治療や脳血管傷害の治療への応用が期待される。

硝子体血管系 (TVL&VHP)

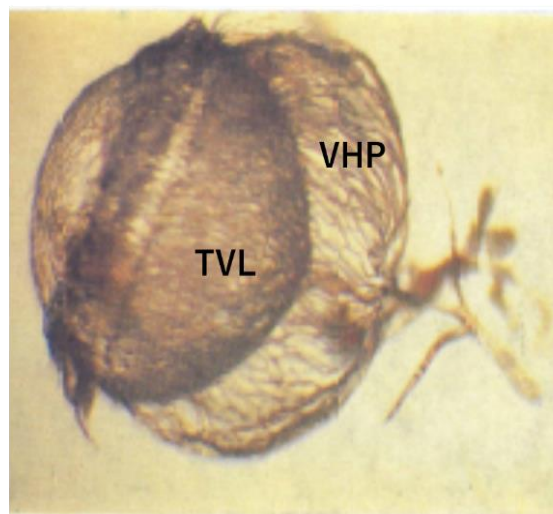


図1 樹脂鋳型標本による幼若ラット硝子体血管系の観察。日眼会誌 86(3): 61-73, 1982 から転載

眼の発生の模式図

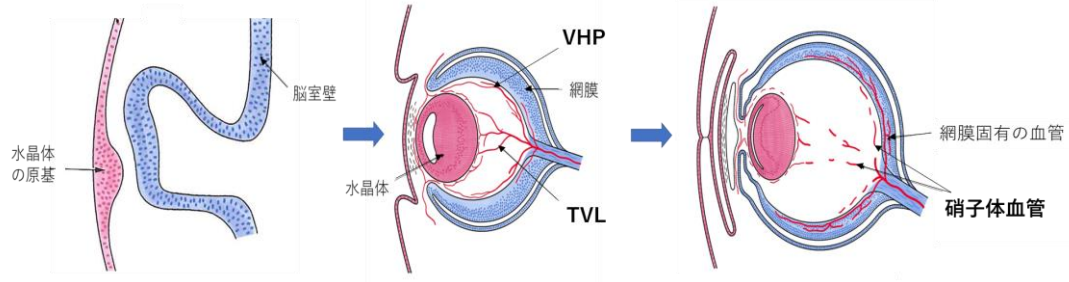


図2 硝子体血管系の発生と退行

標準組織学・各論（藤田尚男、藤田恒夫著、2017年、医学書院）から転載

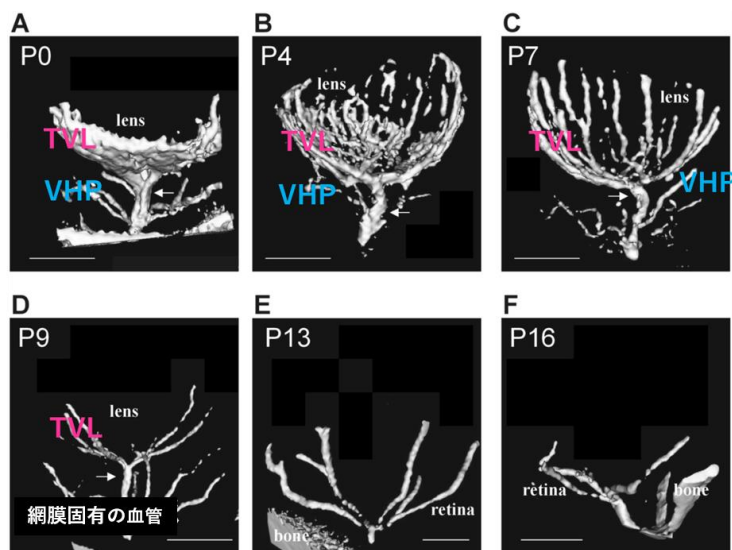


図3 シリコン鋳型標本によるマウス硝子体血管系の退縮

Quantitation of Hemodynamic Function during Developmental Vascular Regression in the Mouse Eye (Investigative Ophthalmology & Visual Science 46(7): 2231-2237, 2005) から転載

生命活動はエネルギーの授受によって維持されている。エネルギー交換の現場を担っている分子が、細胞膜に存在する栄養素のトランスポーターである。生体の主要な栄養素としてはグルコース以外にモノカルボン酸がある。モノカルボン酸とはカルボキシル基-COOHを1つもつ有機酸で、乳酸やケトン体などが含まれる。特定の細胞にとって、また通常の細胞でも特殊な状況下では、グルコースよりケトン体や乳酸が主な栄養源となることはよく知られた事実である。地球創成のころから、生物は解糖系（発酵）と呼吸による2つのエネルギー産生系をもって進化してきた。前者によって乳酸やピルビン酸が生じるが、これらは決して不要の産物ではない。したがって、細胞が生存するために必須の栄養素トランスポーターとしてグルコーストランスポーター（glucose

transporter, GLUT) とともにモノカルボン酸トランスポーター (monocarboxylate transporter, MCT) をあげてよいだろう (図 4)。GLUT ファミリーは現在までに 14 種類のサブタイプが同定されているが、最初に cDNA がクローニングされたのが GLUT1 である。GLUT1 は 12 回膜貫通型タンパク質で C 末端と N 末端が細胞質側にあり、促進拡散型の輸送体として知られている。胎児組織に広く分布するが、成体では脳の血管内皮、網膜色素上皮、胎盤の細胞性栄養膜など、血液と組織間のバリアに発現することは周知の事実である (Takata et al. 1997)。

一方、MCT 1 は 14 種類ある MCT ファミリーのサブタイプの一つで、12 回膜貫通型のプロトン共役型輸送体である。この中では、MCT1 が最も広い発現を示す (Iwanaga and Kishimoto 2015)。また、MCT1 が GLUT1 と同じ組織部位に発現する点も興味深い。

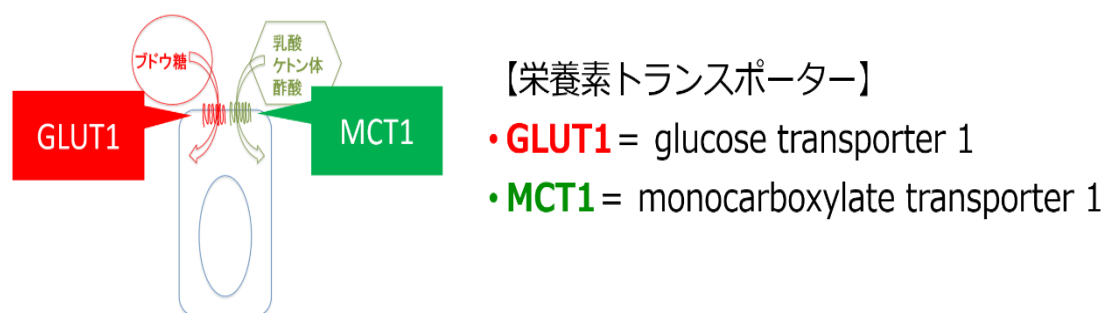


図 4 細胞が発現する 2 つの主な栄養素トランスポーター

脳では、グルコースを取り込むために、血液脳関門である血管内皮に GLUT1 が発現している。しかし、新生子期に限っては、脳の血管内皮には MCT1 がより強く発現している (Vannuci et al. 2003) (図 5)。これは新生子の血中に栄養素としてケトン体や乳酸が豊富に存在することで説明される。これらは、母乳中に高濃度含まれる脂肪に由来する。またマウスの場合、離乳は 20 日過ぎに完了する。血液脳関門、すなわち脳血管内皮での MCT1 から GLUT1 への転換は離乳前後に起こる。網膜は脳組織の一部であるので、MCT1 から GLUT1 への同様の移行が行われていることは十分想像できる。ところが第 1 章で述べるように、硝子体血管系では胎生期から新生子期にかけて GLUT1 を主に発現していた。

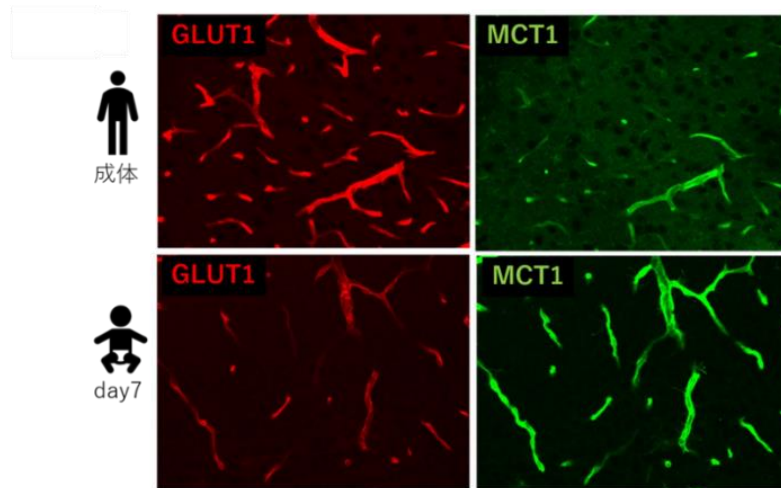


図5 マウスの脳血管内皮での GLUT1 と MCT1 の染色

成体では GLUT1 を強く発現するのに対し、新生子では MCT1 を強く発現する。

第2章では、硝子体血管壁に貼り付くマクロファージに注目した。このマクロファージは LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1) を発現する (Zheng et al. 2010)。ついで galectin-3 の免疫染色を試み、予想外の結果が得られたことからこの研究が始まった。ここで扱う galectin は β ガラクトシドを認識する動物レクチンの一種である。カイメンからヒトまで構造はよく保存されており、15 種類のサブタイプがある。分子構築的にはプロト、キメラ、直列反復型に分類され、galectin-3 はその中でも唯一キメラ型に相当する。当研究室で長年研究対象としてきた galectin-3 はさまざまな組織に普遍的に発現するが、内在性のレクチン型タンパク質として肝臓のクッパー細胞を含む一部のマクロファージにも発現が見られる。また好中球・好酸球・肥満細胞といった数種の血球にも発現することが知られている (Liu 2000, 2005; Dunic et al. 2006)。galectin-3 の機能は多岐にわたるが、特筆すべきは細胞接着や血球の内皮へのローリングにおける関与である (Sato and Hughes 1992; Inohara et al. 1996; Kuwabara and Liu 1996)。その結果、血球に発現する galectin-3 が血管内皮細胞の糖鎖を認識して接着し、血管外の炎症部位への動員に寄与することになる。

本研究では、発達ののち一定の時期に急速に消退する硝子体血管系に注目し、その特異な性状の一端を明らかにすることを目的に、第1章ではマウス発達中の眼の血管内皮に発現する栄養素トランスポーターの発現様式を解析し、第2章では硝子体血管系の組織化学的特徴について研究を行った。本研究で用いた主な材料は網膜の whole mount 標本であり、網膜血管系の全体像を把握できるという点で優れている。本研究で用いた主な研究手法は、特異抗体を用いた光顕および電顕レベルの免疫組織化学である。本章で用いる網膜の免疫染色像はすべて、展開した網膜を硝子体側から観察をしたものである。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AF angiogenic front

DAB diaminobenzidine

ECM extracellular matrix

GLUT-1 glucose transporter-1

LYVE-1 lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1

MCT-1 monocarboxylate transporter

PBS phosphate buffered saline

PM pupillary membrane

TVL tunica vasculosa lentis

VEGF vascular endothelial growth factor

VHP vasa hyaloidea propria

第1章 マウス新生子の硝子体血管と網膜血管での栄養素輸送体 (MCT1 と GLUT1) の発現様式

1. 緒言

血液脳関門において本質的な役割を担う脳血管内皮細胞は、血中からグルコースを取り込むためにグルコーストランスポーター (GLUT)-1 を発現する。一方で、新生子脳の血管内皮は GLUT1 よりもモノカルボン酸輸送体 (monocarboxylate transporter-1: MCT-1) を強く発現し、新生子がエネルギー源としてミルクに由来するケトン体や乳酸などのモノカルボン酸に大きく依存することに対応している (Gerhart et al. 1997; Pellerin et al. 1998)。実際、げっ歯類の脳循環血を調べると、ケトン体および乳酸の濃度は授乳期間中に高く、離乳後に低下する (Vannucci and Simpson 2003)。MCT1 は MCT ファミリーのメンバーの中で最初に同定されたサブタイプで (Garcia et al. 1994)、乳酸、ケトン体などのモノカルボン酸をプロトン (pH) の濃度依存性に運ぶ膜結合型チャネルである (Halestrap and Meredith 2004; Halestrap 2012, 2013)。成体では、網膜色素上皮や脳血管内皮に代表されるように、血液組織関門のすべてが GLUT1 と MCT1 の両方を発現する (Iwanaga and Kishimoto 2015)。

発達段階の眼の血管系は、のちに退行する硝子体血管系の存在を特徴とする。眼動脈の枝である硝子体動脈は、視神経円板を通して胎子期の眼の中に入り、分岐して2つのルートを水晶体に向かって走る。硝子体動脈から直進する血管束は水晶体後面に達して、水晶体血管膜 (tunica vasculosa lentis: TVL) を形成する (Cairns 1959; Hida 1982)。TVL の血管は車軸のように放射状に広がり、水晶体の後面を完全におおう。硝子体動脈の近位部で分岐する別の血管束は網膜の内面に沿って硝子体内で広がり、固有硝子体血管 (vasa hyaloidea propria: VHP) を形成する。VHP の枝の末端は硝子体赤道面で TVL と吻合する。VHP はまだ血管が発達していない網膜内層を栄養し一次性の硝子体を形成するが、硝子体血管系の中では消退の時期が比較的早い (Jack 1972; Hida 1982; Ito and Yoshioka 1999)。この硝子体血管系の退行と同時に網膜固有の血管が伸びだしてくる (Cairns 1959; Ashton 1968)。

眼の発達段階が進むと 硝子体血管系の退行の前に、網膜中心動脈が6つの動脈枝をつくり放射状に広がり、網膜内層に血液を直接供給する永久的な血管系を構築する。網膜血管系では、発芽による血管新生 angiogenesis が主な発達様式とされているが、血島の形成を伴う脈管形成 vasculogenesis の存在を唱える研究者もいる (Saint-Geniez and D'Amore 2004; McLeod et al. 2012)。網膜血管系は全体像を観察するための whole mount 標本の作製が容易にでき、血管新生 (または脈管形成) の研究に適している。

硝子体血管は血管周囲腔への物質の拡散を制限するため、タイト結合を内皮

細胞間に発達させる (Braekevelt and Hollenberg 1970; Townes-Anderson and Raviola 1982)。従って、血液脳関門のように各栄養素に特異的な輸送体を必要とする。しかしながら、眼組織の血管新生期における GLUT と MCT の発現に関しては情報が不足しており、主な栄養素トランスポーターは何か、発育中のどの時期に成体型に切り替わるかについては謎のままである。網膜の血管新生に関する研究は、血小板由来成長因子 (Fruttiger et al. 1996) や血管内皮細胞増殖因子 (Gerhardt et al. 2003) などの血管新生因子、ニューロン/グリアによる誘導 (Fruttiger et al. 1996; Zhang and Stone 1997)、カドヘリン (Dorrell et al. 2002) やケモカイン (Strasser et al. 2010) などの接着因子の関与に焦点が当てられてきた。

われわれの研究グループの予備実験により、新生子脳の毛細血管内皮においては GLUT1 よりも MCT1 を強く発現するという既報のデータをまず確認した。しかしながら、新生子の眼では脳とは異なる MCT1 と GLUT1 の発現パターンが見出された。本研究では、MCT1 および GLUT1 の発現様式から眼の血管新生を特徴づけるとともに、マウス発達段階の眼における血管構築の形態学的特徴を明らかにする。

2. 実験方法

2.1. 動物と組織標本

妊娠 ddY マウスは Japan SLC (Shizuoka, Japan) から購入した。本研究では、E16.5 および E18.5 の胎子、生後 0~3、5、7、9、11、13、15、20、25 日の新生子および成体マウスの眼球を使用した。過量のペントバルビタールナトリウム (Schering Plough Animal Health, the Netherlands) の腹腔内注射によりマウスを安楽死させた。眼球を摘出し、pH 7.4 の 0.1 M リン酸緩衝液に溶解した 4 % paraformaldehyde 液中で 2~4 時間固定した。その後 網膜および水晶体を実体顕微鏡下で眼球から分離した。固定された組織の一部は 30%シュクロース溶液に 4℃で一晩浸漬し、O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) に入れ、液体窒素中で急速凍結した。厚さ 12 μm の凍結切片を作製し poly-L-lysine でコートしたスライドグラスに貼り付けた。

すべての動物実験は「北海道大学における動物実験に関する指針」に基づいて行われた。

2.2. 免疫組織化学的染色

whole mount および切片標本を 0.3% Triton-X 100 入り 0.01 M リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline: PBS) に浸漬した後、正常ロバ血清で前処理した。二重免疫染色のために、それらをウサギ抗マウス MCT1 抗体 (469–493 amino acids of mouse MCT1; Kaji et al. 2015)、モルモット抗 GLUT1 抗体 (460–492 amino acids of mouse GLUT1; Sakai et al. 2003)、ラット抗マウス CD31 抗体 (MEC 13.3, 1:900: BD Pharmingen, Tokyo, Japan) から 2 つを選び、一晩 (切片用) または 4 日間 (whole mount 標本用) インキュベートした。抗原抗体反応は Cy3 標識抗ラットまたはモルモット IgG (1: 400; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) および AlexaFluor 488 標識抗ウサギ IgG (1: 200; Invitrogen, Carlsbad, CA) によって検出した。免疫染色した切片の一部を核観察用に SyTO13 (SYTOX, Invitrogen) で対比染色した。染色したサンプルをグリセリン/PBS で封入し、共焦点レーザー走査顕微鏡 (Fluoview; Olympus, Tokyo, Japan) 下で観察した。切片に対する免疫反応の特異性は吸収試験を含む従来の手順に従って確認された。MCT1 および GLUT1 抗体による免疫反応は、対応する抗原 (マウス MCT1 および GLUT1) であらかじめ吸収された一次抗体を用いた場合に完全に消滅することが確認された。

2.3. 電子顕微鏡観察のための金コロイド銀増感法

厚さ 10~14 μm の凍結切片を正常ロバ血清で 30 分間前処理し、ウサギ抗 MCT1 抗体 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と共に一晩反応させ、続いて 1 nm 金粒子と共有結合したヤギ抗ウサギ IgG と反応させた (1: 200; Nanoprobes, Yaphank, NY)。市販キ

ット (HQ Silver; Nanoprobes) を用いて銀増強後、切片を脱水し、Epon に直接包埋した。超薄切片を作製し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛の水溶液で二重染色して電顕 (H-7100; Hitachi, Tokyo, Japan) で観察した。

2.4. 走査型電子顕微鏡

ペントバルビタール麻酔下で、出生後 7 日目のマウスを O_2 で飽和した Lock 氏溶液に入れ、次に pH 7.4 の 0.1 M リン酸緩衝液に溶解した 2.5% glutaraldehyde と 1.0% paraformaldehyde を含む混合液で灌流固定した。眼球および大脳皮質を取り出し、約 1.5 mm の組織に細断し、同じ固定液に一晩浸漬した。固定した組織片を 60°C で約 18 分間、6N NaOH で浸軟させ (Takahashi-Iwanaga and Fujita, 1986)、0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.3) 中でガラスピペットを用いてすすぎ、穏やかに部分破壊した。破碎後、試料を 0.1 M リン酸塩 (pH 7.3) で緩衝した 1% タンニン酸、続いてリン酸塩 (0.1 M, pH 7.2) で緩衝した 1% OsO_4 に 1 時間浸漬した。オスミウム浸漬した試料を段階的にエタノールで脱水後、酢酸イソアミルに移し液体二酸化炭素で臨界点乾燥した。乾燥した試料はプラズマオスミウムコーター (Nippon Laser and Electronics Laboratory, Nagoya, Japan) で金属コーティングし、SU8010 走査型電顕 (Hitachi, Tokyo, Japan) を用いて加速電圧 5 kV で観察した。

3. 実験結果

3.1. 硝子体血管系

眼球の発達過程で、眼に特有の硝子体血管系は硝子体内で 2 種類の血管系、すなわち固有硝子体血管 (VHP) と水晶体血管膜 (TVL) を生じる。新生子の眼の whole mount 標本を、血管内皮マーカーである CD31 に対する抗体を用いて染色すると、VHP は硝子体に広がる血管網 (図 6a) であることがわかる。VHP を送り出した後、硝子体動脈は水晶体に向かって硝子体の中心をまっすぐに伸びる血管束を形成する (図 6b の TVL)。出生後これら血管系の退行と同時に、出芽による新生血管が視神経円板から起こり網膜内を伸びて、固有かつ永久的な血管系 (図 6b の赤色の血管) を構築する。これらの像は げっ歯類を用いた樹脂鑄型および色素注入試料の走査電顕や実体顕微鏡による先行研究の結果とよく一致した (Cairns 1959; Hollenberg and Dickson 1971; Hida 1982; Ito and Yoshioka 1999)。

胎子 (E16.5, E18.5) および新生子における VHP および TVL の血管内皮は本質的に GLUT1 の免疫活性を示した (図 6b, c)。生後 3 日目の新生子から作製した組織切片を観察すると、GLUT1 と CD31 二重陽性の VHP と TVL が網膜および水晶体に近接して分布していることがわかる (図 7)。VHP の近位部は分岐が少なく比較的直線的なコースをたどるが、じきに波状の走行を示し、頻繁に分岐吻合していた (図 8a)。VHP の血管は網膜内の毛細血管より 2 倍ほど太かった。VHP は全長にわたり GLUT1 を発現していたが、少数の MCT1 陽性細胞が GLUT1/CD31 陽性の血管内皮に混在していた (図 8)。MCT1 発現細胞は VHP の周辺部 (つまり下流部) においてより高い頻度で出現した。この場合、内皮細胞は GLUT1 か MCT1 のどちらか一方のみを発現し、モザイク状の相補的な発現パターンを示した (図 8b)。

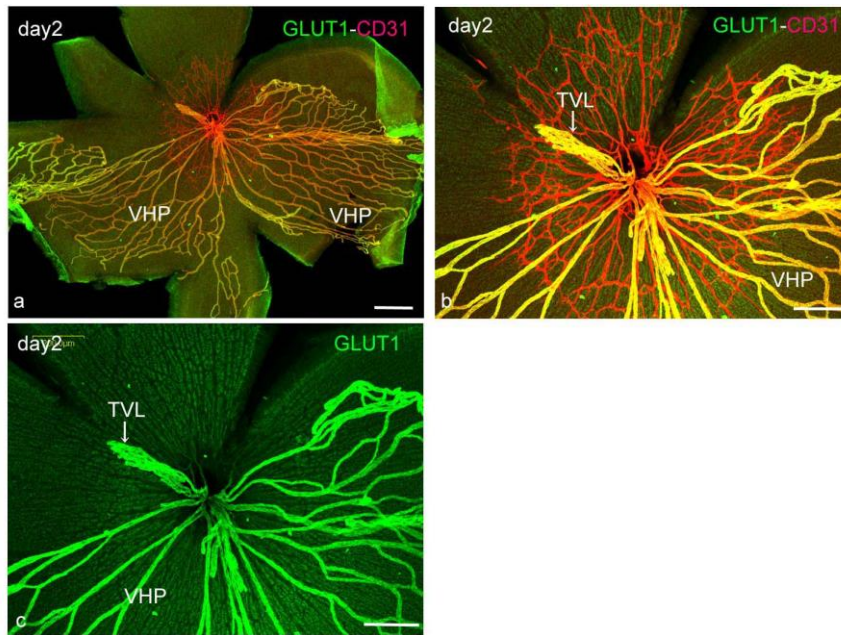


図 6 GLUT1 および CD31 で免疫染色した生後 2 日目の網膜の whole mount 標本

VHP の粗いネットワークが二重染色されている (a)。網膜中心部の拡大図を図 6b および c に示す。視神経円板周囲にある成長中の血管網は CD31 抗体でのみ赤く染色されている。VHP は全長にわたって GLUT1 抗体に陽性である。バー: 500 μm (a)、200 μm (b, c)

図 7 生後 3 日目の新生子眼球の組織切片の免疫染色

VHP と TVL は GLUT1 と CD31 の両方を発現し、黄色く見える。VHP と TVL の血管はそれぞれ 網膜と水晶体に近接している。星印は網膜内部を伸びる CD31 陽性の発芽血管を示す。バー: 200 μm

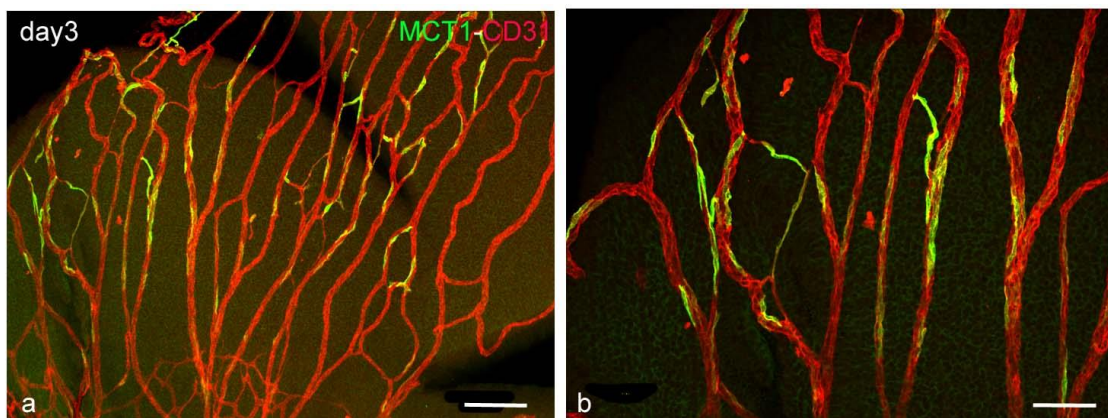
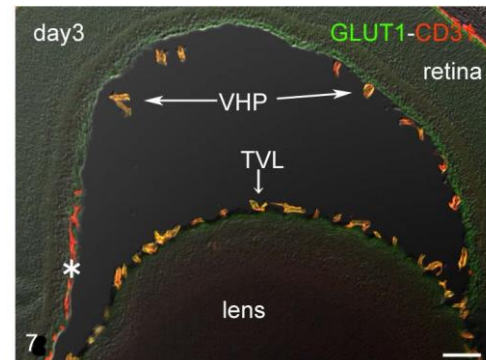


図 8 生後 3 日目の VHP の MCT1 と CD31 の二重染色

図 8b は図 8a の拡大図である。黄色または緑に見える少数の MCT1 発現細胞が CD31 陽性の血管内皮に混在している。バー: 200 μm (a)、100 μm (b)

TVL の血管も VHP と同じく基本的に GLUT1 の免疫反応が陽性であった。水晶体を後面から見ると、GLUT1 陽性の TVL は CD31 抗体で染色される血管と完全に一致する密なネットワークを形成していた（図 9a, b）。ここでも少数の MCT1 発現細胞が水晶体の後面（図 10）および側面（赤道面）（図 11）の GLUT1/CD31 陽性の内皮中に混在していた。TVL の血管は前方に走って水晶体の前面を部分的におおい、そこでは柵状の配列（図 12 の矢印）を示していた—Hollenberg and Dickson (1971) が指摘した直線的な *capsulo-pupillary network* に相当する。それらのあるものは水晶体の前面をおおう血管網である瞳孔膜の血管（図 12 の PM）と吻合していた。瞳孔膜の血管は出生後に退行し始めるが、生後 2～9 日では径が細くしばしば断片的で、依然として MCT1 ではなく GLUT1 を発現していた。したがって、硝子体血管系はその全長で GLUT1 を発現するのに対し、網膜および脳血管内皮はおもに MCT1 を発現する（後述）ことになる。

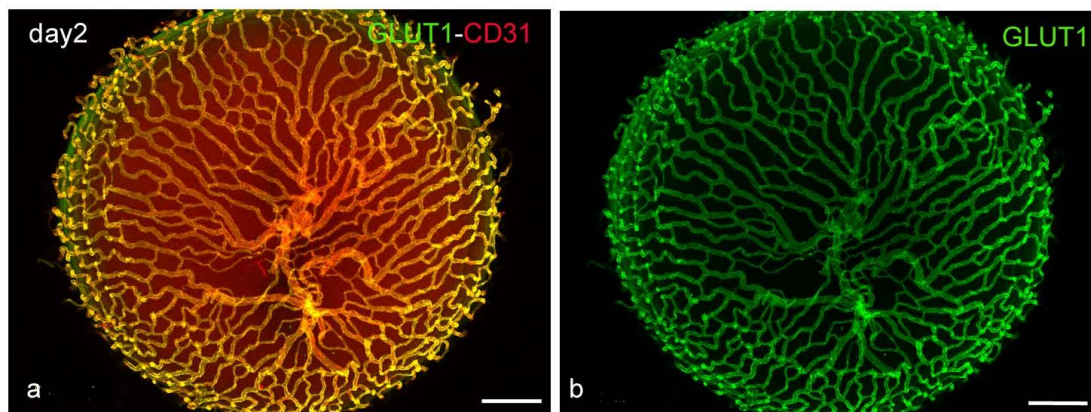


図 9 TVL を GLUT1 と CD31 抗体で免疫染色した水晶体の後面図

分岐した TVL のネットワークは全長にわたって GLUT1 を発現している。バー: 200 μm

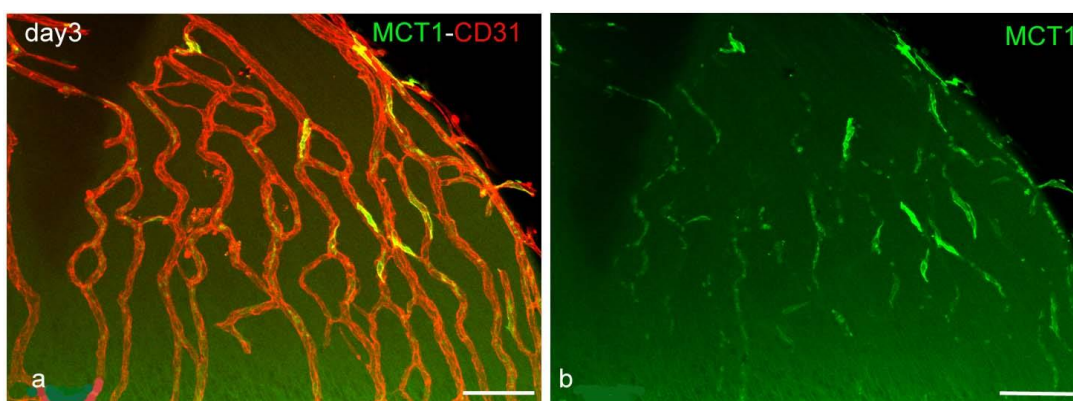


図 10 MCT1 と CD31 抗体で染色された TVL の拡大図

ここでもやはり、少数の MCT1 発現細胞が水晶体後面をおおう CD31 陽性の血管にモザイク状に存在する。バー: 100 μm

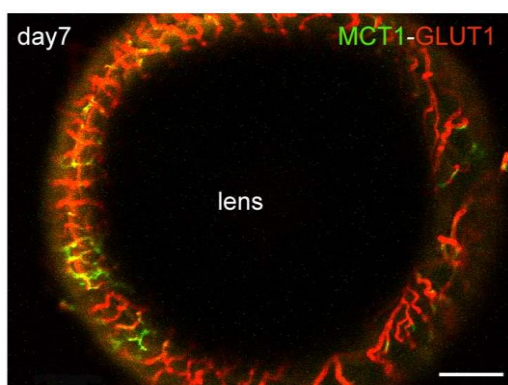


図 11 MCT1 と GLUT1 で二重染色された水晶体の赤道面

GLUT1 発現血管の中に MCT1 陽性細胞（緑色）が少数混在している。バー: 200 μm

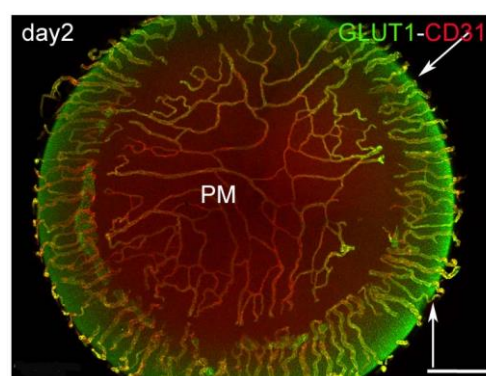


図 12 水晶体前面の GLUT1 と CD31 の二重染色

GLUT1 を発現する TVL は赤道面で平行に走り、柵状の配列（矢印）を示す。一部の枝は瞳孔膜（PM）の細い血管に接続する。バー: 200 μm

3.2. 発達中の網膜血管系

マウスでは生後に視神経乳頭から網膜固有の血管の新生 *angiogenesis* が始まり、典型的な発芽による血管新生が周辺に拡大する。CD31 抗体で染色された血管網は、未成熟のためか生後 3 日目までは MCT1 抗体にも GLUT1 抗体にも反応しなかった (図 6b)。生後 5 日目になると MCT1 の発現が視神経乳頭付近の血管網にみられ、次第に MCT1 を発現する血管網が広がっていく。つまり、CD31 抗体で描出される血管が乳頭部から次第に成熟し MCT1 を発現するようになり、7 日目には MCT1 陽性の血管網が網膜の広い範囲に認められた (図 13a, b)。

網膜中心動脈とその放射状分岐 (通常は 6 つの枝) の内皮には生後 7 日目の時点でも GLUT1 と MCT1 のいずれも発現していなかった。したがって、GLUT1 および MCT1 で染色した標本で動脈系を可視化することは困難であった (図 13a)。対照的に、静脈および毛細血管は MCT1 を発現していた (図 13a)。

MCT1 と CD31 の二重免疫染色した標本で VHP を観察すると、部位特異的にトランスポーターの発現を示す血管新生の全体像がより明確に示された (図 13b)。伸張しつつある血管成長端では、*filopodia* を備えた血管前線を明瞭に識別することができる (図 13a の AF: *angiogenic front*)。CD31 抗体によって可視化されたこの発芽領域は MCT1 と GLUT1 をまったく発現しなかった。出生後の視神経乳頭から始まった発芽は 9 日目までに網膜のほぼ全域に広がった。その後 未熟な毛細血管網は成熟し (MCT1 を発現するようになり)、それらは次第に動脈—毛細血管—静脈という循環血管系つくるようになる。MCT1 陽性の成熟毛細血管網は均一な形態を有する血管網を形成し (図 14)、そこでは発芽領域で見られる典型的な *filopodia* は観察されなかった。発芽領域と成熟毛細血管網はそれぞれ Pitulescu ら (2010) によって言及された *angiogenic front* と *central plexus* に相当する。*central plexus* は *remodeling plexus* と呼ばれるものと同一である (Gerhardt et al. 2003)。毛細血管網は静脈の周りに非常に密であったが、動脈の近くには乏しく、動脈周囲には毛細血管のない領域 *periarterial capillary-free zone* が見られた (図 13b)。

筋特異的中間径フィラメントの主要成分であるデスミンの免疫染色により、周皮細胞の分布を調べたところ、成長中の毛細血管は血管新生端 *angiogenic front* では、デスミン陽性の周皮細胞に包まれていた (Adams and Alitalo 2007) (図 15a)。成長中の網膜において、周皮細胞は MCT1 陽性の *central plexus* でも血管により沿っていた (図 15b)。したがって、周皮細胞は内皮の成熟度に関わらず血管全体に付随していると言える。

構築中の毛細血管における GLUT1 の免疫反応は生後 11 日以降に染色性が徐々に増し、生後 20 日目には MCT1 の免疫反応と同じ強度になった。さらに、生後 25 日目には毛細血管および静脈での GLUT1 の免疫反応が MCT1 のそれよりも強くなった。つまり、成体型の発現様式になったといえる。

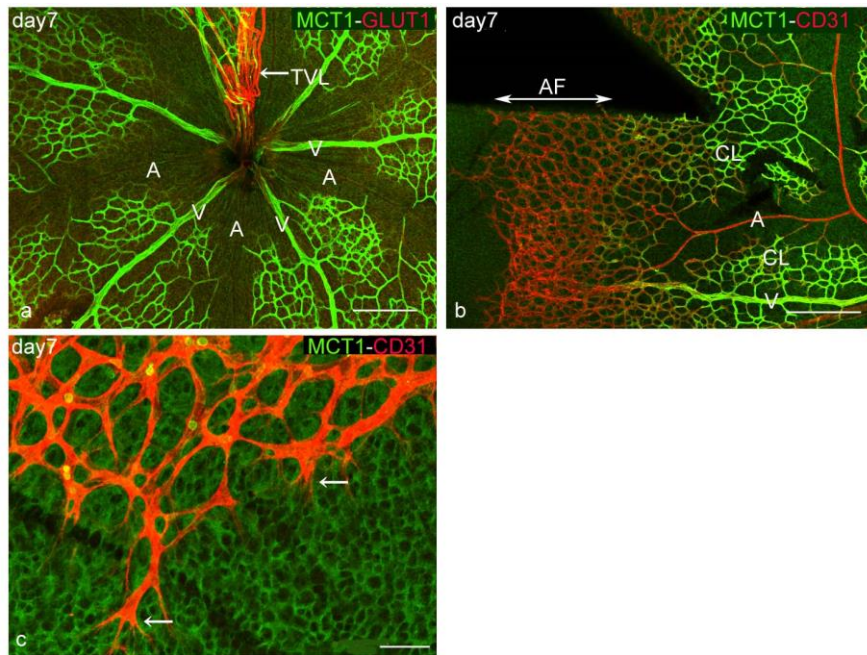


図 13 生後 7 日目網膜 whole mount 標本の二重染色

MCT1 および GLUT1 抗体で可視化した網膜血管の全容 (a)。視神経乳頭から放射状に伸びる 6 本の静脈 (V) と毛細血管網は MCT1 に免疫陽性であるが、動脈 (A) は陰性であるため ここでは見えない。TVL の束は GLUT1 抗体のみに反応している。 b: 網膜の毛細血管網は 2 つの異なる部分、すなわち angiogenic front (AF) と central plexus (CL) に分けられる。前者は CD31 に対してのみ免疫反応を示し、後者は MCT1 抗体に強く反応する。 c: CD31 抗体で可視化された filopodia (矢印) をもつ発芽先端の拡大図。これが血管新生の成長端に当たる。バー: 200 μm (a, b)、50 μm (c)

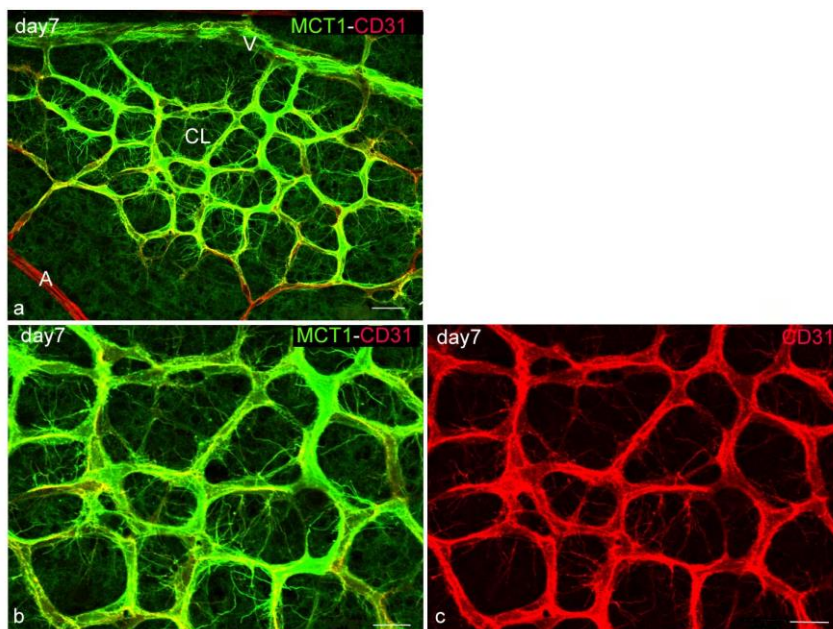


図 14 MCT1 と CD31 抗体で免疫染色した網膜血管の拡大図

静脈 (V) と動脈 (A) 間の central plexus (CL) を示す。毛細血管および静脈は MCT1 に関して免疫反応陽性である (図 a)。毛細血管の拡大図 (図 b, c) では、血管網の間にひげ状突起が観察される。バー: 50 μm (a)、20 μm (b, c)

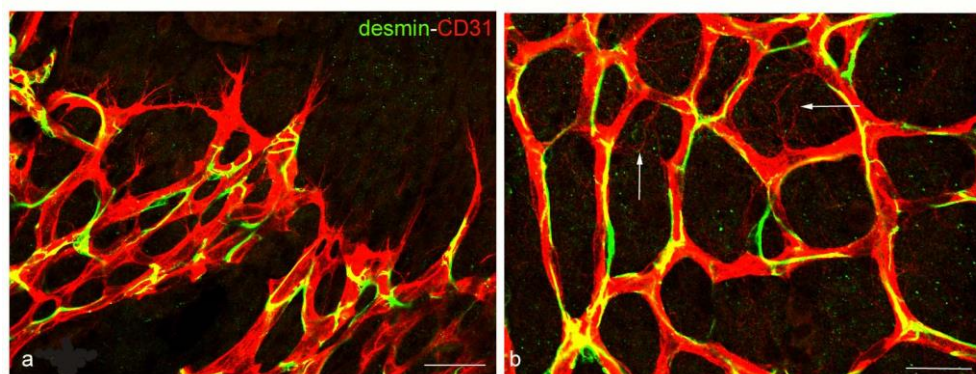


図 15 デスミンと CD31 の二重染色

出芽領域 (angiogenic front; 図 a) と成熟した毛細血管 (central plexus; 図 b) でのデスミン陽性の周皮細胞の分布を示す。周皮細胞 (緑色) は出芽血管と成熟血管の両方に付随しているが、ひげ状突起 (矢印) には関係していない。バー : 50 μm

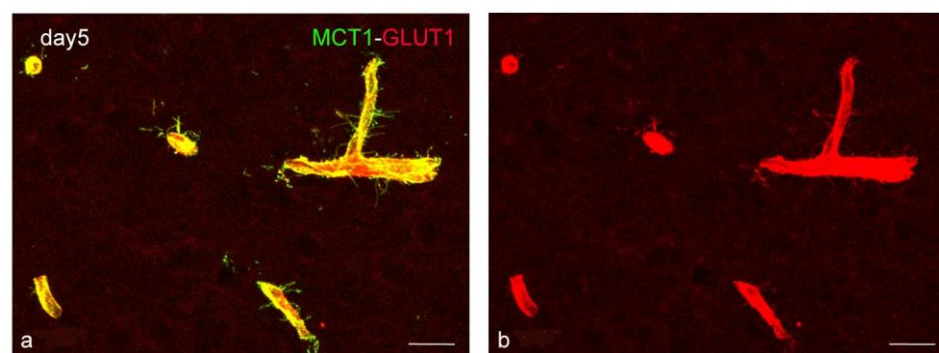


図 16 生後 5 日目の脳血管

MCT1 と GLUT1 抗体で二重染色してある。血管内皮から細い突起 (ひげ状突起) が出ている。バー : 20 μm

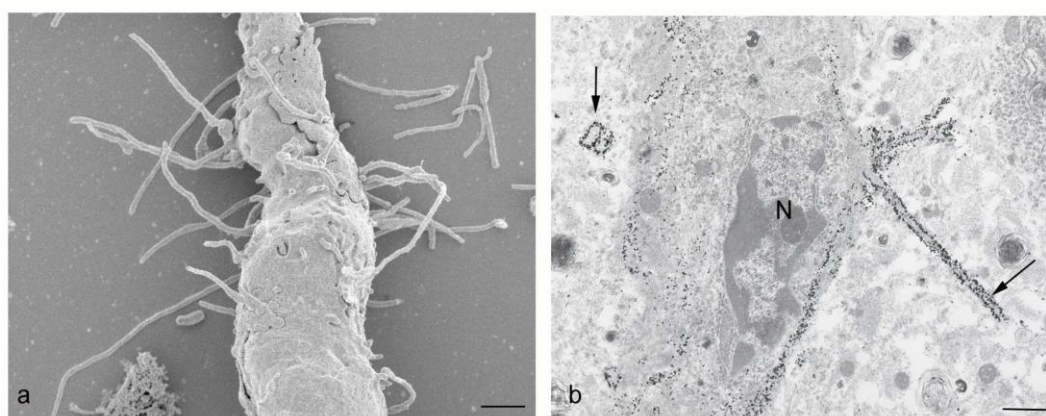


図 17 脳組織での、ひげ状突起の電顕像 (生後 7 日)

走査電顕観察では、多くの長いひげ状突起が内皮から伸びている (図 a)。金コロイド免疫電顕法では (図 b)、金粒子が内皮細胞から伸びるひげ状突起 (矢印) の表面に付着している。N は核。バー : 1 μm

3.3. MCT1 を発現する内皮に見られたひげ状突起

高倍率で生後 7 日目の血管網を観察すると、網膜内面のすぐ下にある MCT1 陽性毛細血管において多数の微細で長い突起が確認された (図 14)。それらの突起は一定の太さを示し、径は $0.5\ \mu\text{m}$ 未満と細く、樹枝状の分岐は見られなかった。対照的に、血管新生端にみられる filopodia は根元の stalk 細胞から急に細くなり、枝分かれする先端部をもつことから形状が不規則であった (図 13c)。これらの微細突起は毛細血管の全長に沿って、単独または小グループで発生し、全体的に一定の密度で周囲の網膜組織に広がっていた。これらの点で、内皮からの繊細な突起 (ここではひげ状突起と呼ぶ) は、angiogenic front に見られる filopodia とは似ておらず、むしろ、植物根の吸収毛に似ていると言える。MCT1 を発現する静脈も同様のひげ状突起をもつが、MCT1 陰性の動脈にはひげ状突起は観察されなかった (図 14a)。ひげ状突起は授乳中期 (生後 5~11 日目) に数と密度がピークに達した。それらは生後 15 日目には減少し、20 日目にはほとんど消失した。同様の MCT1 陽性のひげ状突起は同時期の脳の毛細血管においても見られた (図 16, 17)。

ひげ状突起の立体像を観察することを目的にグリア成分を機械的に破壊するとともに ECM を消化除去した後、生後 7 日目の網膜内層の毛細血管網を走査電顕下で観察した (図 18)。ひげ状突起は毛細血管内皮の基底面に沿って分散しており、免疫組織化学的所見と一致している。内皮から伸びるひげ状突起の太さは $0.2\sim0.5\ \mu\text{m}$ の範囲であり、走行中に枝分かれするものもあった。ひげ状突起の大部分は内皮細胞の境界部分から伸びだし、残りは細胞基底面の中央領域から生じていた。

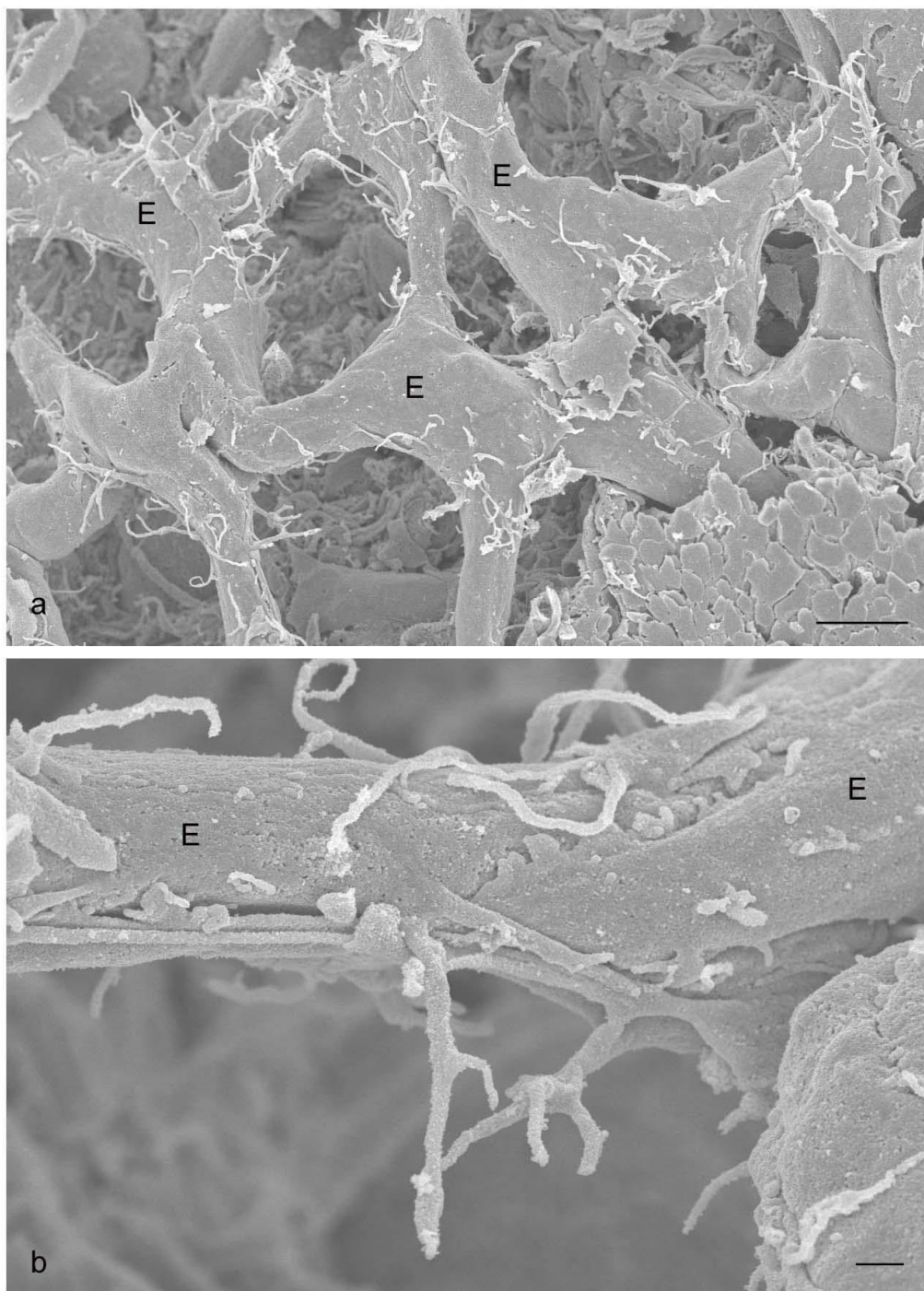


図 18 生後 7 日目の網膜における毛細血管の走査電顕写真

細胞外マトリックスはアルカリ浸軟によって完全に除去され、内皮細胞の表面が露出している。内皮細胞 (E) の外表面から多くのひげ状突起が伸びだしている。バー: 10 μm (a)、1 μm (b)

4. 考察

硝子体血管系は、発達過程で網膜固有の血管が伸長するのと入れ替わりに退行するという特徴をもつ。本研究では新生子マウスの眼を免疫組織化学的に染色し、硝子体血管系の血管内皮では予想に反し GLUT1 が強く発現していることを見出した。一方、網膜の血管新生では血管内皮において MCT1 がステージおよび部位特異的に発現した。すなわち、*angiogenic front* の出芽直後の血管では MCT1 と GLUT1 のどちらも発現せず、*central plexus* の成熟毛細血管と静脈は MCT1 を発現していた。網膜血管の主な栄養素トランスポーターは脳と同様に、離乳後に MCT1 から GLUT1 に移行した。また別の特徴として、網膜の MCT1 を発現する血管内皮には、発芽血管に特有の *filopodia* とは異なる長いひげ状突起が観察された。

4.1. GLUT1 を発現する硝子体血管系

硝子体動脈由来の VHP は、互いに吻合する多くの枝を出し硝子体全体に血管のネットワークを形成する。硝子体動脈はまた、レンズの後面および側面をおおう密な血管網からなる TVL を形成する。マウスの VHP および TVL は、主に内皮細胞のアポトーシスにより (Mitchell et al. 1998; Taniguchi et al. 1999)、生後 6 日以降に退行を開始するといわれている (Ito and Yoshioka 1999)。免疫組織化学を用いた本研究は MCT1 を発現する網膜毛細血管および静脈とは対照的に、VHP と TVL の血管内皮が発生初期から GLUT1 を発現することを明らかにした。この脳血管とは異なる GLUT1 の特徴的な発現様式は、硝子体血管系が一時的な血管であることまたは特殊な機能をもつ血管系であることに起因すると思われる。

VHP および TVL は毛細血管様の分枝吻合を示すが、走査電顕観察に基づく研究では TVL は真の毛細血管を欠き、水晶体側方の柵状脈管 *palisade-like vasculature* に至るまで動脈の特性を保持すると考えられている (Strek et al. 1993)。この考えは本研究で確認されたように、VHP および TVL の血管は網膜表面の典型的な毛細血管よりもはるかに大きな径をもつという事実によって支持される (Hida 1982; Strek et al. 1993)。また、Saint-Geniez and D'Amore (2004) もすべての硝子体血管系がタイプとしては動脈型であると考えている。しかしながら、他の研究者は TVL がマウスでは毛細血管 (Mitchell et al. 1998) (Braekevelt and Hollenberg 1970)、ラットでは「大部分は毛細血管または周皮細胞をもつ静脈」(Latker and Kuwabara 1981) としていることから、TVL および VHP を構成する血管の分類はマーカー物質を用いたさらなる分析が必要である。

興味深いことに、MCT1 を発現する内皮細胞が、主たる GLUT1 発現細胞と混在していた。GLUT1/MCT1 のモザイクパターンの意義は不明であるが、眼球の血管新生では GLUT1 と MCT1 の発現が細胞レベルで厳密に調整されていると

いえる。このような発現パターンは発達中の脳の血管内皮には見られなかった。

4. 2. 網膜血管形成における MCT1 の部位特異的発現

硝子体血管系が出生後徐々に退行する一方で、網膜内部の表層近くに新しい血管網を生じる。マウスの場合 出生後 10 日までに、新生血管が網膜の神経線維層内を視神経乳頭から周辺に向かって伸長し、つぎに向きを変えて垂直方向に成長し網膜内層に到達する深部血管網を構築する (Dorrell et al. 2002; Gerhardt et al. 2003)。網膜は whole mount 標本を容易に作成できるので (Pitulescu et al. 2010)、正常および病的血管新生の研究に適している。さらに、得られた知見を脳の血管新生に反映させることができる点で有力な材料である (Gariano and Gardner 2005)。

げっ歯類の新生子を用いた研究を通して、脳と同様に、網膜の毛細血管内皮でも授乳期では GLUT1 より MCT1 の発現が強いことが報告されている (Bergersen et al. 1999; Chidlow et al. 2005)。本研究は、whole mount 標本を使うことによって、新生子網膜の毛細血管ばかりでなく静脈でも MCT1 の発現が優位であることを示した。発達中の網膜における MCT1 の優位な発現は、脳でいわれているように (Vannucci and Simpson 2003)、血液中を循環する母乳由来のモノカルボン酸を取りこむためであろう。central plexus で MCT1 がより強く発現していた点では、脳実質の毛細血管と同等である。MCT1 から GLUT1 への発現の移行は網膜でも同様に離乳後に起こっていた。しかしながら、網膜血管新生における MCT1/GLUT1 の部位特異的な発現についてはこれまで情報がなかった。本研究は MCT1 と GLUT1 の発現に基づいて、angiogenic front を central plexus から区別することができた。つまり、発芽先端の angiogenic front は GLUT1 と MCT1 をともに発現しなかったが、central plexus (remodeling plexus ともいう) は MCT1 を発現していた。また、網膜の動脈には、血管新生中では GLUT1 と MCT1 のどちらの発現も認められなかった。

4. 3. 網膜および脳の MCT1 発現血管内皮から伸びだすひげ状突起

網膜血管新生の過程で、血管の発芽先端には常に filopodia が備わっている (Dorrell et al. 2002; Gerhardt et al. 2003; Strasser et al. 2010)。本研究の重要な新知見のひとつは、MCT1 の免疫染色および走査電顕観察によって明らかにされた、central plexus の毛細血管からのびる無数のひげ状突起である。MCT1 の免疫組織化学と走査電顕観察によって、マウス新生子の脳においても同じ構造の存在を確認した。ひげ状突起は形態学的な違いに加えて、発芽血管形成において tip 細胞からのびる filopodia とは MCT1 の発現の有無の点でも異なっていた。ひげ状突起の意義は何だろうか。

網膜内の表層血管網が網膜の周辺領域に達すると、マウスの場合で生後 7 日

目から 9 日目の間に、血管枝は表層血管網から網膜外側に向かって成長する (Dorrell et al. 2002; Gerhardt et al. 2003)。この表層血管網からの進入血管が深層の血管網を形成し、ラットでは成体にみられる血管構築が生後 15 日または 16 日目前後に完成される (Cairns 1959; Ashton 1968)。MCT1 を発現するひげ状突起は、マウスでは生後 15 日目には著しく減少していた。ひげ状突起は脳の血管にも共有される発達中の血管の新しい像であり、授乳期の特別なエネルギー需要に関連する可能性がある。あるいは、血管成長の新たな様式を表しているかもしれない。

遊走内皮細胞は網膜血管新生中に土台となる星状膠細胞と接触するなど、グリコ成分と密接に関連することが知られている (Holash and Stewart 1993; Dorrell et al. 2002; Gerhardt et al. 2003)。土台となる星状膠細胞が活発な解糖によって産生した乳酸を局所的に供給している可能性があるが、星状膠細胞の土台の上に最初に形成された網膜血管網はその後位置的に離開するといわれる (Gerhardt et al. 2003)。従って、エネルギー供給源としての星状膠細胞の関与は継続しない。むしろ MCT1 を発現するひげ状突起が乳酸の取りこみに積極的に関わる可能性は十分にある。今後、眼の血管新生における MCT1 およびモノカルボン酸の関与を明らかにするためには、MCT1 に対する阻害剤や抗体を用いた *in vivo* の実験が必要である。

結論として、本研究は発達期の眼の血管系において GLUT1 および MCT1 の関連性のある、しかし相違する発現様式を明らかにした。脳の血管に外挿できる場合と網膜血管系に特有の現象が見られた。眼球および脳の血管に共通するひげ状突起は、*filopodia* とは異なる血管新生の新たな特徴を示しているかもしれない。

第2章 消退する硝子体血管系の組織化学的特徴

1. 緒言

固有硝子体血管（VHP）と水晶体血管膜（TVL）からなる硝子体血管系は発達中の水晶体に栄養を与え、硝子体を維持するために一時的に構築される血管系である。硝子体血管系はマウスの場合、胎生 10.5 日ごろから伸び始め、胎生 13.5 日には完成する（Smith et al. 2002）。マウスでは生後まもなく VHP と TVL が消退を始め、生後 16 日ごろまでに完全に消失し、それと入れ代わるように網膜固有の血管が伸びだしてくる（Ito and Yoshioka 1999; Brown et al. 2005）。硝子体血管系の消退は血管内皮や周皮細胞のアポトーシスによって起こり、それらの処理にマクロファージが関与することが知られている（Jack 1972; Mitchell et al. 1998; Taniguchi et al. 1999）。その調節機構は十分解明されていないが、原因としてアポトーシス促進因子の発現増強や VEGF に代表される血管成長因子の減少、あるいは血流の停止などが報告されている（Saint-Geniez and D'Amore 2004; Hegde and Srivastava 2017）。

消退する VHP の近傍にマクロファージが集積することはよく知られている（Ito and Yoshioka 1999; Taniguchi et al. 1999）。電顕による観察では、アポトーシス後の血管断片をマクロファージが貪食する様子が示されている（Taniguchi et al. 1999）。さらに、マクロファージ欠損マウスを用いた研究によって、マクロファージが硝子体血管系の消退の際に、重要な役割を担っていることが明らかにされた（Lang and Bishop 1993）。

LYVE-1 はヒアルロン酸受容体として見出された分子であるが、一部のマクロファージにも発現が見られる（Zheng et al. 2014）。Zhang ら（2010）は LYVE-1 抗体を用いて免疫染色を行い、LYVE-1 陽性のマクロファージと硝子体血管系の密接な位置関係を明らかにした。LYVE-1 は、別のヒアルロン酸受容体である CD44 と構造上の相同性がある。CD44 は白血球、樹状細胞、さらにはがん細胞などに広く発現が見られるタンパク質である（Lesley et al. 1994）。硝子体血管系の消退とマクロファージの関係を探るために、本研究の予備実験として別のマクロファージのマーカーである galectin-3 を指標にして（Sato and Hughes 1994; Liu et al. 1995; Sano et al. 2003）、マウス新生子の眼の whole mount 標本を免疫組織化学的に染色した。そして、galectin-3 発現細胞の特異な存在に気づいた。

galectin は動物性レクチンの一種で、複合糖質の β ガラクトシドを認識し、細胞分化・遊走・アポトーシスといった様々な生命現象に関与していることが知られている（Yang et al. 2008）。galectin-3 は 15 種類あるガレクチンのサブタイプの一つで、唯一キメラ型に分類され自己会合能をもつ。内在性のレクチン型タンパク質として単球やマクロファージのみならず、好中球・好酸球・肥満細

胞といった数種の血球にも発現している (Liu 2000, 2005; Dunic et al. 2006)。
galectin-3 は主に細胞質に存在するが、シグナル配列や膜貫通ドメインを欠いているため非典型的経路を介して細胞外に輸送されると考えられる (Hughes 1999; Dunic et al. 2006)。細胞外の galectin-3 は細胞表面のオリゴ糖に結合し、その結果 アポトーシス (Suzuki et al. 2008; Zhuo et al. 2008) や細胞接着 (Sato and Hughes 1992; Inohara et al. 1996; Kuwabara and Liu 1996) に代表されるさまざまな機能を発揮する。注目すべきは、galectin-3 は NG2 コンドロイチン硫酸プロテオグリカンやラミニン (Kuwabara and Liu 1996; Hughes 2001)、インテグリン (Ochieng et al. 1998; Fukushi et al. 2004) などの細胞外マトリックス (ECM) と複合体を作り、細胞—ECM 間の接着に重要な役割をもつことである。血管における galectin-3 の生理学的および病理学的意義は、血栓形成と血管新生に集約される。マウスの血栓症モデルにおいて galectin-3 を発現する白血球は静脈壁に付着し、単量体から三量体への発現レベルが局所で増加するという (DeRoo et al. 2017)。

第2章の研究では、galectin-3 抗体を用いて新生子マウスの硝子体血管を染色したところ、LYVE-1 陽性のマクロファージは galectin-3 を発現しなかったが、硝子体血管の管腔内に galectin-3 陽性細胞が集積していることに気づいた。一方、同様の細胞は網膜固有の血管内にはほとんど見られなかった。本研究は硝子体血管内の galectin-3 陽性細胞の組織化学的性状を精査し、硝子体血管系の消退における関与を調べることを目的とした。

2. 実験方法

2.1. 動物と組織標本

妊娠 ddY マウスと CD1 マウスは Japan SLC (Shizuoka, Japan) と Charles River Laboratories (Yokohama, Japan) からそれぞれ購入した。本研究では、マウス E17.5 の胎子と Day 1, 3, 5, 7, 9, 15, 20 の新生子の眼球を使用した。CD1 系統の galectin-3 欠損マウスの作製については、すでに報告済みである (Hsu et al. 2000)。欠損マウスのサンプルは生後 9, 15, 20 日に採取した。マウスは過量のペントバルビタールナトリウム (Schering Plough Animal Health, the Netherlands) の腹腔内注射により安楽死させた。眼球全体を摘出し、リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した 4 % paraformaldehyde 液で 2~4 時間固定した。網膜は実体顕微鏡下で 4 か所に切れ込みを入れて展開し、水晶体は眼球から取りだした。

すべての動物実験は「北海道大学における動物実験に関する指針」に基づいて行われた。

2.2. 免疫組織化学的染色

サンプルは 0.3 % Triton-X100 入りの 0.01 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に浸漬した後、ガラスボトルに入れて正常ロバ血清で前処理した。以下の 2 または 3 種の抗体の混合液を用いて 3 日間反応させた。使用した抗体は以下の通り。

ヤギ抗マウス galectin-3 抗体 (AF1197; R&D Systems, Minneapolis, MN)、ウサギ抗マウス LYVE-1 抗体 (11-034; AngioBio, Del Mar, CA)、ウサギ抗 myeloperoxidase 抗体 (PA5-16672; ThermoFisher Scientific, Rockford, IL)、ヤギ抗マウス cathepsin D 抗体 (AF1029; R&D Systems)、ラット抗マウス F4/80 抗体 (BM8; BioLegend, San Diego, CA)、ラット抗 integrin β 1 (CD29) 抗体 (MAB2405; R&D Systems)、ウサギ抗 laminin 抗体 (ab11575; abcam, Cambridge, UK)、ウサギ抗 NG2 chondroitin sulfate proteoglycan 抗体 (AB5320; Millipore/Chemicon International, Temecula, CA)、ウサギ抗 type IV collagen 抗体 (ab19808; abcam)、ラット抗マウス/ヒト CD44 抗体 (IM7; affymetrix/ThermoFisher Scientific)、ラット抗 Ly-6G/Ly-6C 抗体 (RB6-8C5; Novus Biologicals, Littleton, CO)、ラット抗 CD68 抗体 (FA-11; affymetrix)、ラット抗マウス/ヒト CD11b 抗体 (M1/70; BioLegend)、ラット抗マウス CD31 抗体 (MEC 13.3; BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ)、ウサギ抗 MCT1 抗体 (MCT1-Rb-Af900; Frontier Institute, Ishikari, Japan)、モルモット抗 GLUT1 抗体 (GLUT1-GP-Af610; Frontier Institute)。

抗原抗体反応は Cy3 標識ロバ抗ヤギ・抗ラット・抗ウサギ IgG 抗体、Cy5 標識ロバ抗ラット IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)、ないし Alexa Fluor 488 標識ロバ抗ラット・抗ウサギ・抗モルモット IgG 抗体 (Invitrogen/ThermoFisher Scientific) を用いて 6 時間反応することで検出した。染色標本はグリセリン/PBS で封入し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Fluoview

FV300; Olympus, Tokyo, Japan) 下で観察した。切片上の免疫反応の特異性は吸収試験を含む従来の手順に従って確認した。

赤血球のカタラーゼ反応を検出するために、組織を 0.01% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) と 0.001% H₂O₂ を含む 0.05 M Tris-HCl バッファー (pH 7.6) でインキュベートした。

galectin-3 陽性細胞の統計学的評価では、それぞれの日令につき 600×800 μm の異なった 5 つの領域を無作為に選び、100 個の LYVE-1 陽性細胞に対する galectin-3 陽性細胞の数を算定した。データは、平均±標準誤差 (SEM) として表された。日令ごとの統計的比較は、GraphPad Prism 6 ソフトウェア (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を用いた Tukey の多重比較試験による一元配置分散分析 (ANOVA) によって評価した。グラフの値は平均±SEM を表し、 $P < 0.05$ は有意であるとみなした。

2.3. 電子顕微鏡の金コロイド銀増感法

固定された組織の一部を 30% ショ糖溶液に 4℃ で一晩浸漬し、O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) に入れ、液体窒素中で急速凍結した。厚さ 12 μm の凍結切片を poly-L-lysine でコートしたスライドガラス上に載せた。切片を正常ロバ血清で 30 分間前処理し、ヤギ抗 galectin-3 抗体 (1 μg/mL) と一晩反応させ、続いて 1 nm の金粒子 (1 μg/mL) と共有結合したウサギ抗ヤギ IgG と反応させた (200 倍希釈; Nanoprobes, Yaphank, NY)。市販のキット (HQ Silver; Nanoprobes) を用いて銀増強後、切片をオスミウム酸で後固定し、脱水後、Epon に直接包埋した。超薄切片を作製し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛の水溶液で二重染色して電子顕微鏡 (H-7100; Hitachi, Tokyo, Japan) で観察した。

3. 実験結果

3.1. 硝子体血管内に集積する galectin-3 陽性細胞

Zhang ら(2010)が報告しているように、胎子と新生子の固有硝子体血管 (VHP) および水晶体血管膜 (TVL) の血管周囲に、円形または不規則な形の LYVE-1 陽性細胞が集まっていた (図 19)。それらはマクロファージの代表的なマーカーである F4/80 抗体 (図 20a) およびリソソーム分解酵素の 1 つである cathepsin D 抗体 (図 20b) に染まり、マクロファージであることを強く示唆した。これらは VHP と TVL の血管壁に沿って分布したが、硝子体血管のない領域には全く存在しなかった (図 20c)。マクロファージは VHP の血管系の近傍に観察され、血管に接触しているようであった (図 20b)。興味深いことに、インテグリンフィラメントは蜘蛛の糸のように LYVE-1 陽性細胞にからみつき、それらを血管に緩く結合していた (図 20d)。生後 5 日目および 7 日目では、galectin-3 の免疫活性は VHP / TVL 血管内の小さく丸い細胞にのみ認められたが、LYVE-1 陽性の血管外マクロファージには観察されなかった (図 21a, b)。VHP および TVL は、GLUT1 抗体で特異的に検出することができることは第一章で述べた (Kishimoto et al. 2016)。GLUT1 陽性の血管は多数の galectin-3 陽性細胞を含有していたが、GLUT1 陰性の網膜固有の血管内には galectin-3 陽性細胞はほとんど存在していなかった (図 21c)。

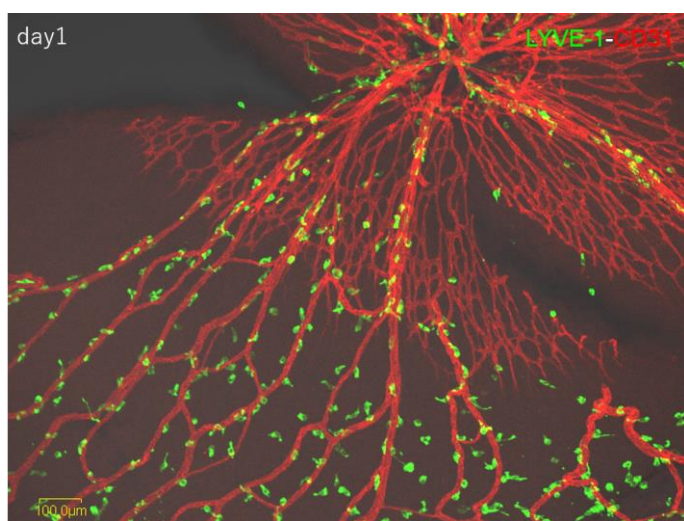


図 19 新生子マウス網膜の LYVE-1 と CD31 の免疫染色

太い内腔をもつ硝子体血管系に貼りつく LYVE-1 陽性マクロファージを確認できた。LYVE-1 陽性細胞は網膜固有の血管周囲にはほとんど見られない。

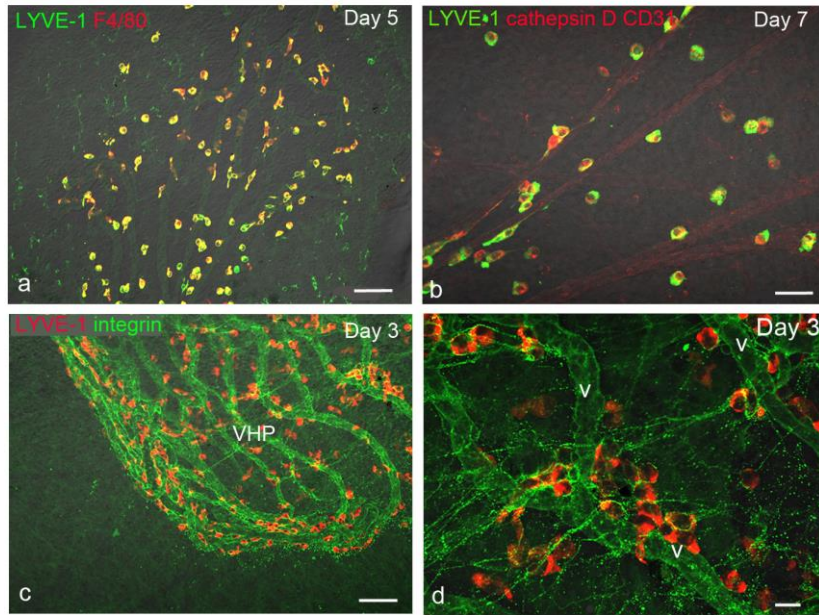


図 20 新生子マウスの固有硝子体血管（VHP）における LYVE-1 の免疫染色

すべての LYVE-1 発現細胞は F4 / 80 (a) およびカテプシン D (b) に対する抗体と反応し、マージ色（黄色）を示す。LYVE-1 とインテグリン β 1 の二重染色では、インテグリン抗体で標識された VHP の広がる領域に LYVE-1 陽性マクロファージの分布が限局されている (c) 。強拡大で観察すると (d) 、LYVE-1 陽性マクロファージは蜘蛛の糸のようなインテグリンの網に絡めとられているように見える。v: 血管 バー：100 μ m (a, c), 50 μ m (b), 20 μ m (d)

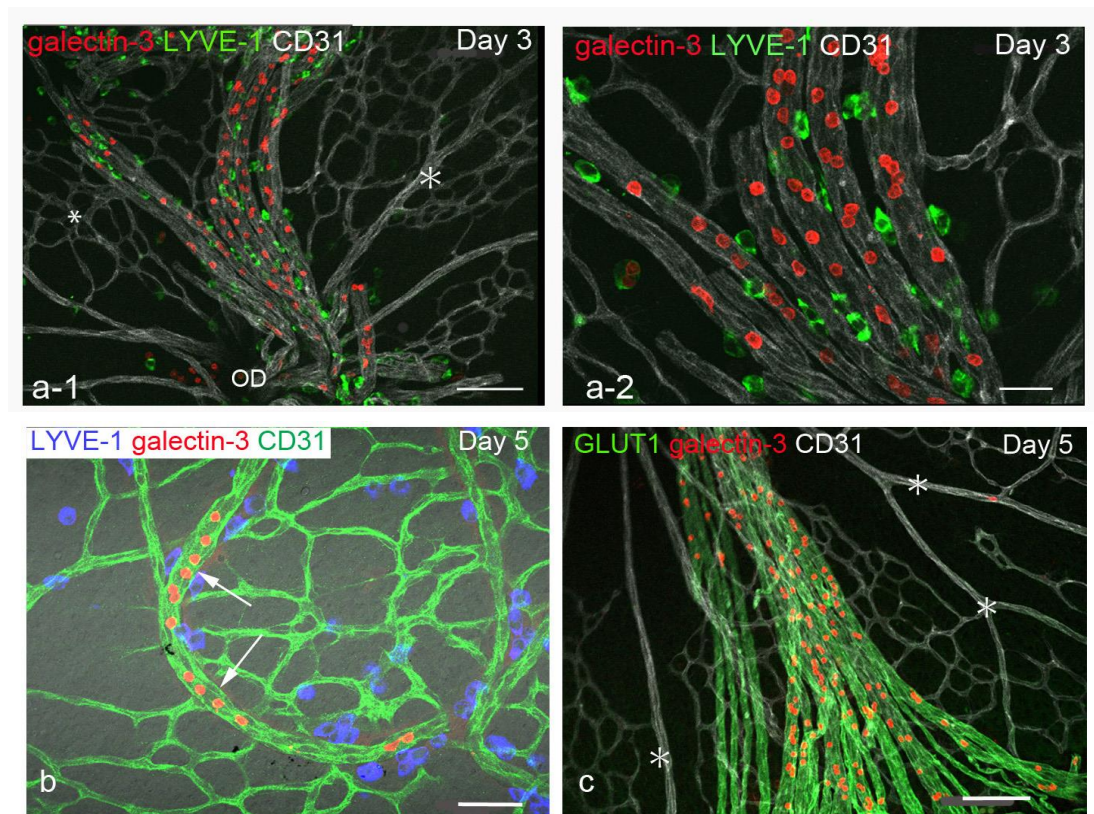


図 21 硝子体血管に特異的な galectin-3 発現細胞の集積

galectin-3、LYVE-1 および CD31 に関する三重染色によって、galectin-3 陽性の小型円形細胞が血管内に局在し、血管外にいる LYVE-1 陽性細胞（緑色）にはその免疫反応がみられないことがわかる（a-2 は a-1 の一部拡大）。galectin-3 陽性細胞が VHP の内腔で見られるが（矢印）、網膜固有の血管内では見られない（b）。図 c では GLUT1 抗体により硝子体血管が標識され、網膜血管（星印）と区別できる。そして、galectin-3 陽性細胞は GLUT1 陽性の硝子体血管にのみ見られる。バー：100 μm (a-1, c), 50 μm (b), 20 μm (a-2)

硝子体血管系におけるこれらの galectin-3 発現細胞は、出生前 (E17.5) および生後 1 日目の新生子 (図 22a) ではほとんど見られず、あったとしてもすべてが血管の外に存在していた。galectin-3⁺細胞の数は生後 3 日目の血管内で急速に増加し、まず径の大きな TVL の近位部で多数観察された。生後 5 日目以降、galectin-3 発現細胞は VHP および TVL の全体にわたって血管内腔に高い頻度で出現した (図 22c、d の矢印)。対照的に、F4/80⁺ LYVE-1⁺マクロファージは出生前にも多数存在しており、周産期全体にわたってかなり一定した出現頻度を示した。galectin-3⁺細胞の数を LYVE-1⁺細胞の数と比較すると、LYVE-1⁺細胞を 100 とした galectin-3⁺細胞の数は生後 1 日目および 3 日目に 10%未満であったが、生後 5 日目と 7 日目には約 60%に及んだ (図 23)。

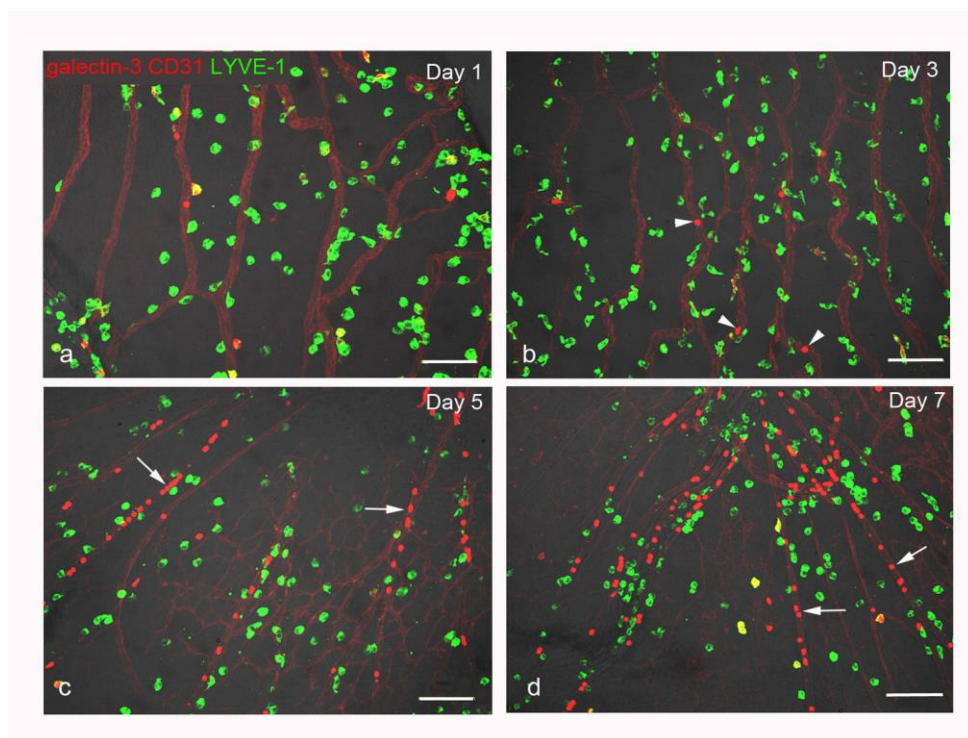


図 22 生後 1 日から 7 日目までの VHP 内にある galectin-3 陽性細胞の変化

生後 1 日目では galectin-3⁺細胞は稀で、血管外に局在していた。galectin-3⁺細胞が血管内に見られるのは生後 3 日目であるが、数はまだ少ない。生後 5 日目と 7 日目には多くの galectin-3⁺細胞が VHP 血管内に観察され (矢印)、その数は血管外に存在する LYVE-1⁺マクロファージ (緑色) とほぼ同数である。バー : 100 μm

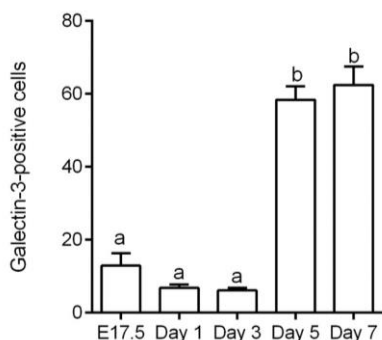


図 23 (左図) E17.5 から Day 7 までの galectin-3⁺細胞の出現頻度 (%)

数値は平均±SEM を表し、字体の異なる箇所は $P < 0.05$ の有意差を示す。Tukey の多重比較試験による一元配置分散分析 (ANOVA) を用いた。

galectin-3⁺細胞の細胞種を同定するために、マーカー分子を用いた免疫染色を行った。galectin-3⁺細胞は F4/80 陰性で、単球・顆粒球のマーカーである CD68 および CD11b 抗体に免疫反応を示した (図 24a、b)。galectin-3⁺細胞は、好中球のマーカーである Ly-6G を発現し、その発現細胞は完全に一致した (図 24c)。円形の galectin-3⁺細胞の大部分は直径約 8 μm であり、赤血球と同等の大きさであり、分葉核を有していた。いびつな形を示すものも しばしば見られ、まれに血管の管腔内で長い細胞質突起を伸ばしていた。galectin-3⁺細胞は細胞質にミエロペルオキシダーゼ陽性の顆粒を少数含んでいた (図 24d)。

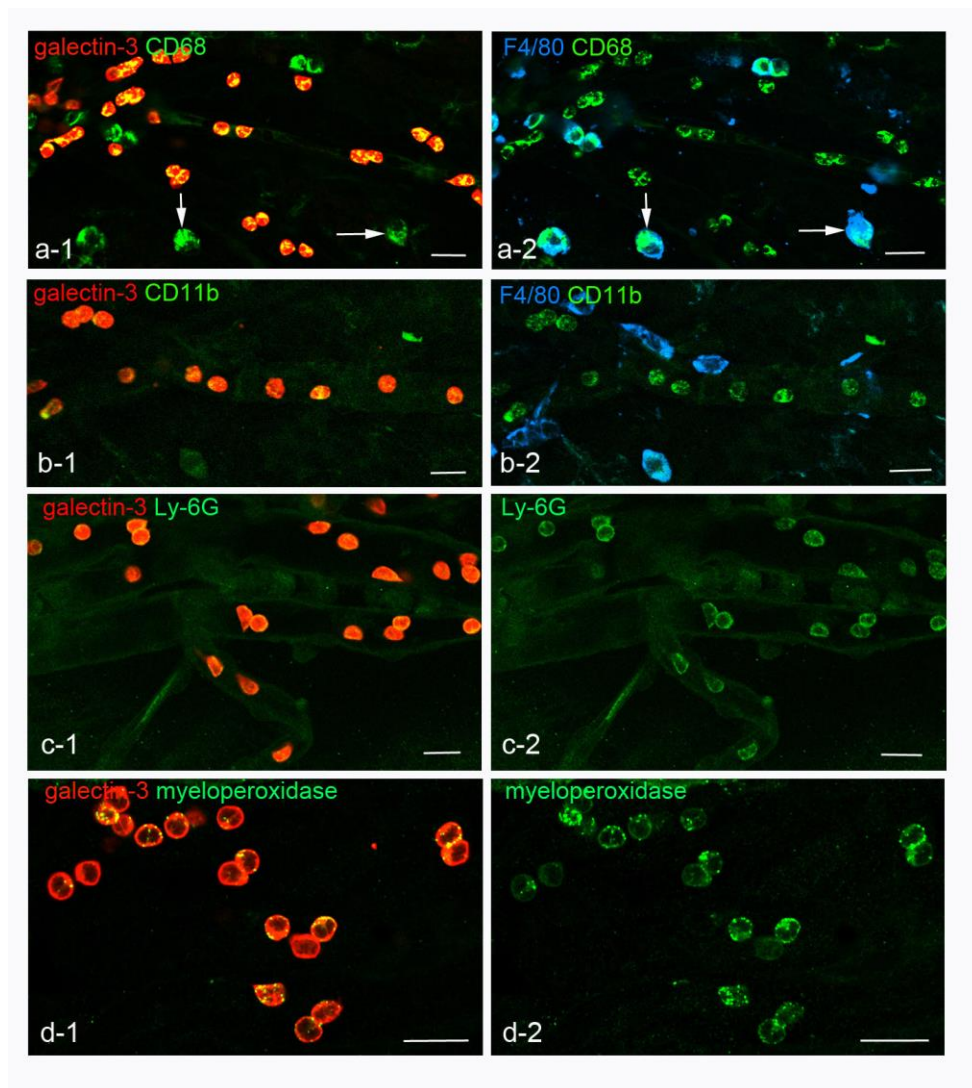


図 24 galectin-3 免疫反応細胞におけるマーカー物質の発現

galectin-3⁺細胞は CD68 (a)、CD11b (b) および Ly-6G (c) を発現する。CD68 については血管外マクロファージ (矢印) も免疫反応陽性である。galectin-3⁺細胞の大部分は少数ではあるが、ミエロペルオキシダーゼ陽性顆粒を含む (d)。バー : 20 μm

電子顕微鏡を用いて観察を行ったところ、galectin-3 の存在を示す金粒子は細胞質にびまん性に分布するが、しばしば細胞表面に沿って集まっていた (図 25a、b)。また、分葉核をもつことも電顕下で確認できた。以上の光顕と電顕レベルの特徴は、galectin-3⁺細胞が好中球の系統に属することを示唆している。

CD44 はヒアルロン酸受容体であり、顆粒球、マクロファージおよびリンパ球を含むさまざまな免疫細胞に広く発現している (Lesley et al. 1994)。VHP 内にある galectin-3⁺細胞は CD44 を発現したが、一方で VHP の外側の LYVE-1⁺マクロファージには CD44 の発現が見られなかった (図 25c)。興味深いことに、血管外マクロファージに発現する LYVE-1 もヒアルロン酸受容体の一つとして知られている (Banerji et al. 1999)。硝子体がヒアルロン酸を豊富に含む代表的な組織であることは注目すべき点である。

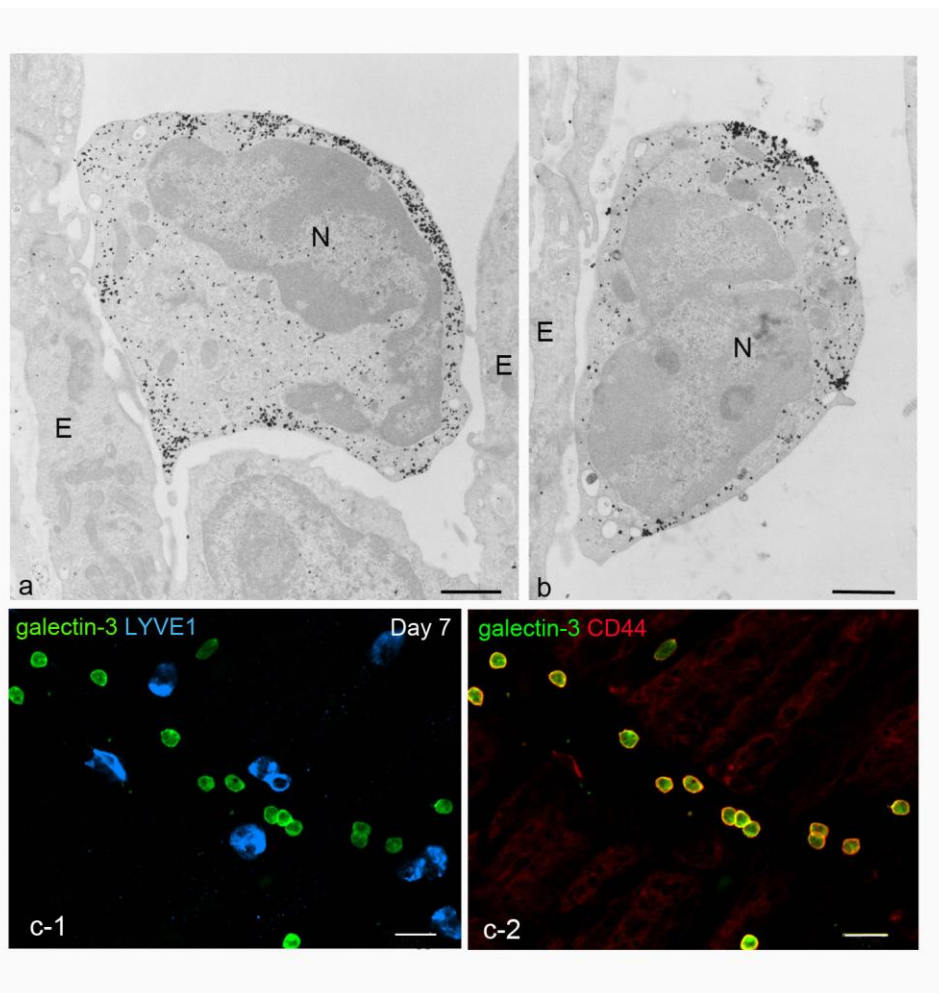


図 25 galectin-3 の免疫電顕観察および galectin-3, LYVE-1, CD44 の三重染色

金コロイド法 (a、b) による galectin-3 の金粒子は、不規則な または分葉核をもつ血管内の細胞を標識した。金粒子は細胞膜に沿って集まる傾向にある。galectin-3 と CD44 の免疫反応は完全に一致している (c)。N: 核 E: 内皮細胞 バー: 1 μ m (a、b), 20 μ m (c)

3.2. VHP の血管は豊富な細胞外マトリックスをもっている

次に ECM および関連分子に対する抗体群を用いて硝子体血管系を染色し、さらなる特徴を探った。その結果、VHP の退行性血管は内皮細胞に沿って厚い ECM を有することが見出された。ラミニン（図 26a）、IV 型コラーゲンおよびインテグリンに関する免疫染色では、VHP および TVL の血管が厚い基底膜をもつことが明らかである。硝子体血管系の ECM の免疫活性は、網膜固有の血管よりもはるかに強かった。さらに ECM の免疫染色によって、血管にまわりつく周皮細胞—正確には、周皮細胞周辺の基底膜—が強い反応を示した（図 26a）。VHP の周皮細胞は密に分布しており、周皮細胞とくに活性型周皮細胞のマーカー物質である NG2 コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（Ozerdem et al. 2001; Fukushi et al. 2004）に対して強い免疫反応性を示した（図 7b）。ラミニンの免疫染色によって、退行中の VHP の一部血管では径が細くなり、「こより状」に退縮していることが明瞭である（図 26c）。ひも状の血管の残骸になっても ECM および周皮細胞は依然として強い免疫反応を示していた。この血管の遺残物はどこどころで膨らみ、そこに CD31 免疫反応を有する内皮細胞の断片が取りこまれていた（図 26b、c-2）。

3.3 VHP/TVL 中にみられる galectin-3 発現細胞を含む血球のうっ血状態

硝子体血管の血流を評価するために、内因性カタラーゼ活性および MCT1 の免疫染色という 2 つの方法により赤血球を galectin-3 とともに検出した。MCT1 はモノカルボン酸トランスポーター（MCT）の主要なサブタイプであり、赤血球では新生子の赤血球がより強く発現する。これらの標本では、赤血球は VHP（図 26d）および TVL（図 26e）の血管に詰まっているような形態を示したが、このような像は網膜固有の血管では決して見られなかった。凝集した赤血球は多くの galectin-3 陽性細胞と混在するという特徴を示した。

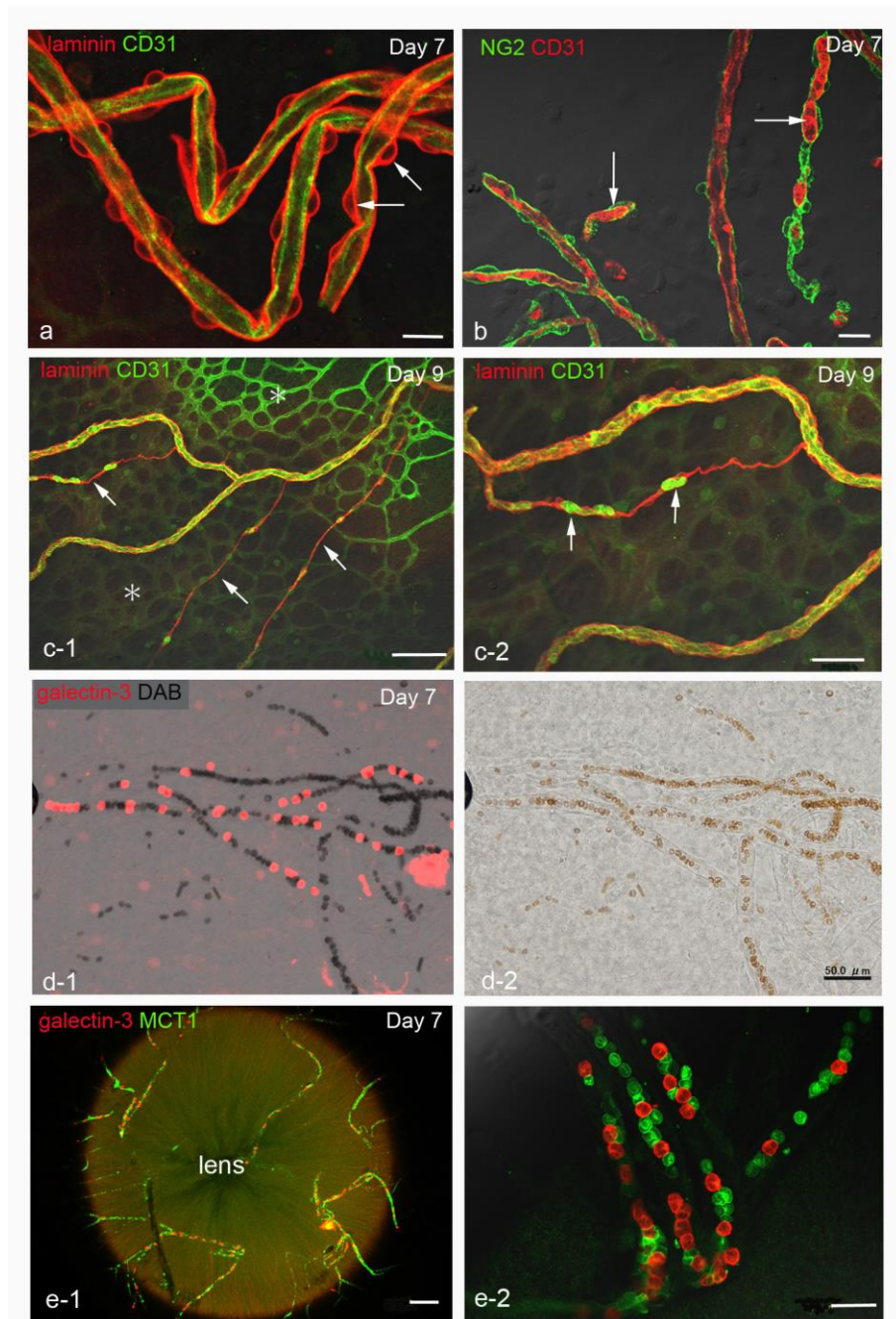


図 26 VHP 血管の細胞外マトリックスと血球のうっ滞状態

ラミニンの免疫染色は周皮細胞と共に厚い基底膜を標識した (a の矢印)。周皮細胞特異的 NG2 の免疫反応は、CD31 陽性血管内皮の断片 (b の矢印) を含む退行中の血管において強くなる。生後 9 日目に、一部の VHP で管径が細く、こより状になっている (c-1 の矢印；*印は網膜の血管網)。赤血球と galectin-3⁺細胞の検出では、VHP の同じ領域が蛍光 (d-1) および透過モード (d-2) で観察される。そこでは (d)、赤血球は DAB と H₂O₂ との反応によって黒色または褐色を示し、galectin-3 陽性細胞と共に血管を塞いでいた。同様のうっ血が TVL でも見られ (e)、ここでは赤血球が MCT1 抗体で緑色に染色されている。バー：250 μm (e-1), 100 μm (c-1, d), 50 μm (c-2), 20 μm (a, b, e-2)

最後に、硝子体血管の退行過程における galectin-3 の関与を調べた。すなわち、硝子体血管の退行が進む生後 9, 15, 20 日目の galectin-3 ノックアウトマウスにおける硝子体血管系を野生型と比較した。血管系の全体を観察するために、硝子体血管系の内皮に強く発現している GLUT1 に対する抗体を用いて TVL を観察することにした。Day 9 (図 27b) および Day 15 (図 27d) の galectin-3 ノックアウトマウスの試料では野生型マウスのもの (図 27a, c) と比較して、レンズの後面をおおう血管がかなりのボリュームで維持されていた。しかしながら、Day 20 になると (図 e, f)、その違いははっきりしなかった。これらの結果は galectin-3 が硝子体血管の退行にある程度寄与していることを示唆している。

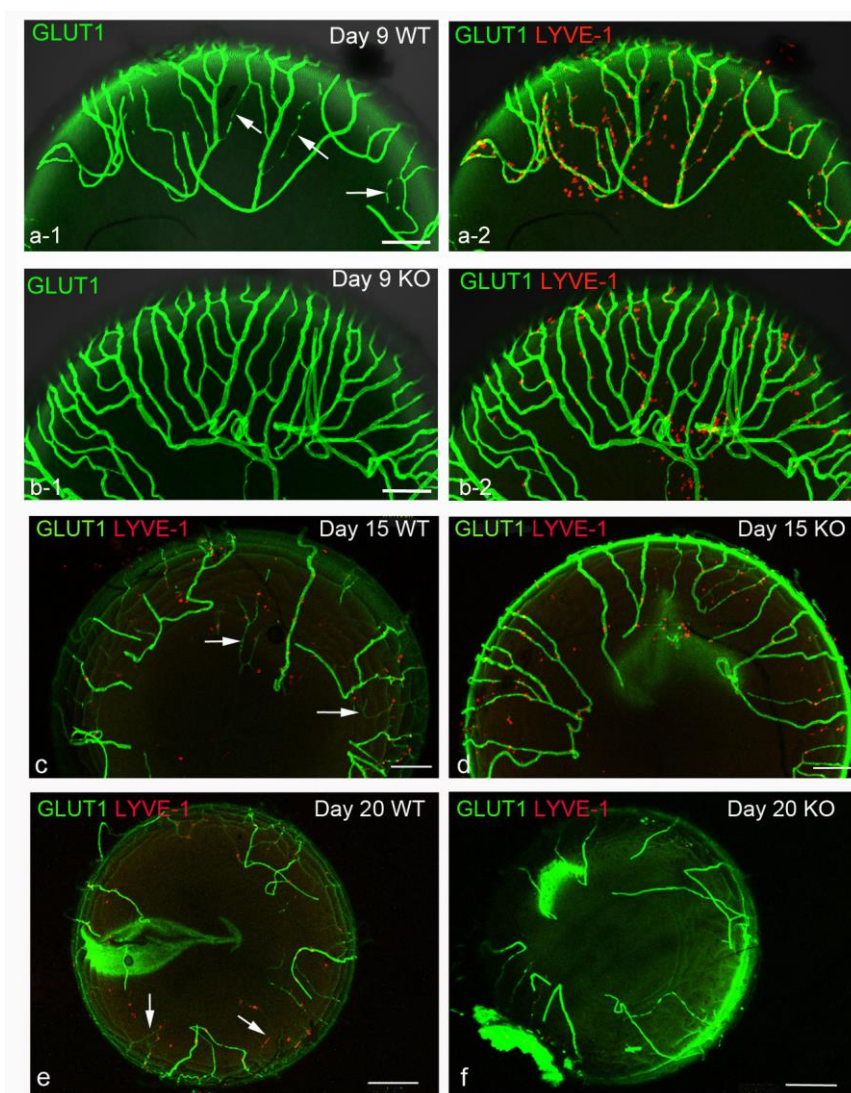


図 27 野生型マウス (a) とノックアウト (b) の生後 9 日目の水晶体後面の図 (生後 15 日目の比較は図 c, d)

GLUT1 で染色された TVL を観察すると、その退行は galectin-3 の欠損によってある程度抑制される。矢印は、ほぼ退縮した血管を指す。しかし、20 日目 (図 e, f) ではノックアウトと野生型の差がはっきりしない。バー : 100 μ m (a, b), 200 μ m (c, d), 300 μ m (e, f)

4. 考察

4.1. galectin-3 を発現する細胞の特徴

galectin-3 発現細胞は硝子体血管系の VHP および TVL の管腔内に集積していたが、網膜固有の血管内には出現しないという大きな特徴があった。硝子体血管に強い親和性を示す galectin-3⁺細胞は一体何細胞であろうか？ galectin-3⁺細胞および血管外マクロファージは単球/マクロファージ系統のマーカーである CD68 に対してともに陽性であった。また、galectin-3⁺細胞は CD11 と Ly-6G に対して免疫活性陽性であり、後者は好中球に特異的な分子である。galectin-3⁺細胞は、マクロファージに特異的な F4/80、LYVE-1 および cathepsin D の各抗体に反応せず、血管外に存在する消化分解活性の高い単球由来のマクロファージとは異なることが明瞭である。眼の発達過程で LYVE⁺ F4/80⁺マクロファージは胎生期でもすでに数多く出現し、一方 galectin-3⁺細胞は生後 3 日目以降によく増加し始めた。電顕で観察すると、galectin-3⁺細胞の細胞質は典型的な顆粒形態とは異なり、顆粒球に見られる大量の特殊顆粒で満たされることはなかった。しかしながら、本研究においては細胞質にミエロペルオキシダーゼ陽性顆粒の存在を確認した。ミエロペルオキシダーゼとの二重染色では、免疫反応が弱い galectin-3⁺顆粒球はミエロペルオキシダーゼ反応が強く、逆の関係も成立することがわかった。以上より、galectin-3⁺細胞は、未成熟または特殊な型の好中球として同定され得る。

硝子体血管が galectin-3 発現細胞を内腔に誘導する正確な理由は不明である。しかしながら、すべての galectin-3⁺細胞に発現が見られる CD44 は硝子体に極めて豊富に存在するヒアルロン酸の受容体である。本研究によって確認されたように、硝子体血管を取り囲み、硝子体内にいわばフリーの状態が存在するマクロファージもまた、別のヒアルロン酸受容体である LYVE-1 を発現していた (Zhang et al. 2010)。LYVE-1 はいくつかの組織の ECM でマクロファージを固定するための足場として機能し得る (Zheng et al. 2014)。したがって galectin-3⁺好中球および LYVE-1⁺マクロファージは両方とも、ヒアルロン酸の豊富な硝子体に対して強い親和性をもち、2 種のヒアルロン酸受容体は硝子体血管系へのそれらの動員および居住を容易にすることができる。また CD44 はヒアルロン酸に対する親和性に加えて、血管内皮への接着を手助けする可能性がある。なぜなら、CD44 は血管内皮表面上に豊富に発現する E-セレクトインのリガンドであるからである。

galectin-3 はマクロファージの化学的誘引分子として機能し (Sano et al. 2000; Gittens et al. 2017)、マクロファージが生細胞を除きアポトーシス細胞のみを貪食する際にオプソニンとしての役割を果たす (Karlsson et al. 2009)。従って、退行の最終段階において放出された galectin-3 はマクロファージの誘導およびアポトーシス細胞の貪食にも関与するのであろう。galectin-3 ノックアウトマウス

では炎症部位のマクロファージおよび好中球の集積が阻害されることが示されている (Colnot et al. 1998; Hsu et al. 2000; Nieminen et al. 2008)。

4. 2. 消退する硝子体血管の特徴

硝子体血管の特徴の 1 つは ECM 成分が豊富であることである。ラミニン、IV 型コラーゲンおよびインテグリン β 1 の免疫染色によって、VHP では網膜固有の血管と比較してより厚い基底膜が認められた。この知見は、VHP (Jack 1972; Balazs 1975) と TVL (Latker and Kuwabara 1981) の基底膜が厚いことおよび多層になることを示した初期の電顕観察と一致している。

発達期の眼では多数のマクロファージが硝子体血管の血管周囲に分布している (Zhang et al. 2010)。それらは血管の退行、とくにアポトーシスの誘導および変性血管の除去に重要な役割を果たす (Lang and Bishop 1993; Diez-Roux et al. 1999; Lobov et al. 2005)。インテグリン抗体で標識された線維状ネットワークは本研究で初めて明らかにされ、その形態学的特徴によって一部分的かもしれないが—遊走性のマクロファージの足場として機能する可能性が示唆された。その意義が解き明かされたわけではないが、この「インテグリンブッシュ」はラットの出生後に走査電顕で観察された糸状の遺残物に相当するかもしれない (Latker and Kuwabara 1981)。起こるはずの退縮が起これなければ胎児性血管の消失 (げっ歯類の場合は新生子期に起きる) 障害となり、原発性硝子体過形成遺残あるいは胎児脈管構造遺残ともよばれる疾患を引き起こす。種々の遺伝子ノックアウトマウスにおける解析によって、インテグリンがこの先天性眼奇形に最も関与が深いことが提唱されている (Hegde and Srivastava 2017)。これらの著者は、インテグリンを 主要な細胞シグナル伝達の中心として、またシグナル伝達カスケードの開始因子としてその重要な機能に注目している。本研究ではインテグリンを、豊富な ECM の成分として、ならびに血管周囲マクロファージの足場として位置づけている。これらの知見は、退行性硝子体血管に関連する細胞どうしの直接的な接着や情報交換の調節過程でのインテグリンの本質的な役割を示唆している。

また周皮細胞の選択的なマーカーである NG2 の免疫染色では、硝子体血管において免疫陽性細胞が密に分布していた。さらに、VHP の周皮細胞における NG2 免疫反応は網膜血管のものよりも強く、そのことは周皮細胞がより活性型であることを意味している。なぜなら、NG2 は ECM への結合、内皮とのクロストーク、あるいは成長因子との相互作用のための細胞表面受容体として機能するからである (Ozerdem et al. 2001; Fukushi et al. 2004)。一般的には、周皮細胞の離脱は血管新生、すなわち血管先端の出芽を誘導するので、周皮細胞が密に分布していることは血管新生を負に制御することを意味する。生後 7 日目以降における VHP の一部は「こより」のように非常に細くなり、管腔が内皮細胞

由来の細胞断片によって閉塞されていた。血管退縮のトリガーは不明であるが、NG2 の発現上昇を伴う収縮性周皮細胞が密に分布することは退行中の血管を絞扼し、最終的に硝子体血管系の退縮をもたらすことが考えられる。

4. 3. galectin-3 が血管退縮に関与する可能性

galectin-3 は細胞表面で会合し、細胞の活性化や細胞接着などのさまざまな機能をもたらすガレクチンサブタイプの一つである。galectin-3 は好中球および好酸球の表面で多量体を形成することで、白血球の誘導と血管内皮への強固な接着を導く (Sato et al. 2002; Nieminen et al. 2007; Rao et al. 2007)。一方、放出された galectin-3 は血管内皮細胞に結合して NG2 および $\beta 1$ インテグリンと複合体、すなわち NG2/galectin-3/ECM 複合体を細胞表面上で形成し得る (Fukushi et al. 2004)。本研究では、上述したように galectin-3 発現細胞の特徴的な集積と NG2 および ECM の発現上昇が示され、退行性の硝子体血管の血管内皮表面でのそれらの緊密な分子構築を示唆している。galectin-3 の多量体化は、 $\beta 1$ インテグリンをより効果的に活性化し NG2 をクラスター化するのに重要であり (Fukushi et al. 2004)、galectin-3 のリガンドである CD98 と共にインテグリン活性化のプロセスに関与する可能性がある (Hughes 2001; Krzesla and Lipinska 2004)。報告されているように、 $\beta 2$ ではなく $\beta 1$ インテグリンは白血球が発現する galectin-3 を介して、血管内皮細胞への好中球 (Werr et al. 1998; Johnston and Kubes 1999) や好酸球 (Rao et al. 2007) の動員と接着に関与する。これらの知見を総合すると、galectin-3 はインテグリン機能の調節を介して循環白血球の動員と接着を制御しているのであろう。

多数の galectin-3⁺細胞を含む血球の集積は VHP および TVL において頻繁に観察され、血液うっ滞を想起させる。galectin-3⁺好中球は NG2/galectin-3/ECM 複合体を形成して VHP と TVL の血管内皮に付着することで血流を阻害し、最終的に血管の退縮を起こしている可能性がある。硝子体血管の退縮は血流の停止 (Meeson et al. 1996) あるいは近位部硝子体血管の血管収縮 (Browning et al. 2001) によっても説明されている。今回の galectin-3 ノックアウトマウスの解析では、TVL の退行がある程度抑制されていた。しかしながら、この変化はマクロファージの作用に打ち勝てなかったせいだろうか、Day 20 にははっきりしなくなった。マクロファージは隣接する血管内皮細胞に対して、ウィント経路を介し硝子体血管の退縮プログラムを単独で誘導することができる (Lang and Bishop 1993; Lobov et al. 2005)。したがって、マクロファージが誘導する硝子体血管の退縮において、galectin-3⁺好中球は中心的な というより補佐的な役割を果たすと考えられるかもしれない。

血流の阻害とは対照的に、galectin-3 発現細胞が虚血状態下で新生血管形成のために硝子体血管に集積する可能性がある。galectin-3 は *in vitro* で血管内皮細

胞の分化を誘導し、*in vivo* では血管新生を刺激するという報告がある（Nangia-Makker et al. 2000; Wan et al. 2011）。この galectin-3 の血管新生における役割は、galectin-3 が血管退縮に関与しているという本研究の結論とは反対の捉え方である。いずれにせよ、退行性硝子体血管に関する本研究で得られた新所見は、血管の退行あるいは血管新生を調節するメカニズムを理解する上で新たな情報を提供することが期待できる。

総括および結論

マウスの生後発達期の眼の血管系に注目し、以下のような知見を得た。

1. 網膜内の血管内皮は脳の血管と同様に授乳期は MCT1 を強く発現し、離乳期以降では GLUT1 をより強く発現して成体型に変化する。この共通した変化は、網膜が神経組織の一部であることと矛盾しない。
2. ところが生後に退行する硝子体血管系は、胎生期から生後にかけて主として GLUT1 を血管内皮が発現しており、これは硝子体血管の特異な指標になる。MCT1 を発現する内皮細胞は、GLUT1 を発現する内皮シートに少数のものがモザイク状に混在していたにすぎない。
3. 網膜内の新生血管から無数のひげ状の突起がのびており、これは血管の発芽域にみられる *filopodia* とはまったく異なるもので、過去にこの構造物に関する報告はなかった。血管新生の新たな様式として注目される。
4. *galectin-3* を発現する血球が硝子体血管内に集積しており、このような血球の集積は網膜血管系には見られなかった。これらの *galectin-3* 発現細胞は、幼弱なあるいは特殊な好中球と同定された。
5. 硝子体血管、とくに固有硝子体血管は厚い基底膜と密に配列する周皮細胞をもつことで、網膜内の血管とは異なっていた。また、基底膜成分であるインテグリンの細糸が細胞間に放散している珍しい像が観察された。
6. 硝子体血管系では、*galectin-3* 陽性の好中球が多数の赤血球とともに血管内でうっ滞している様子が捉えられた。*galectin-3* 欠損マウスでは、血管の退行が有意に抑制されていたので、*galectin-3* を発現する血球はマクロファージによる血管退行において、少なくともそれを補佐する役割をもつと思われた。

硝子体血管系は眼に特有の血管系で、マウスの場合生後に急速に退行する。マクロファージが退行過程に先導的な役割を演じていることは確かであるが、上に述べた硝子体血管系の特殊性も考慮すべきである。この特殊性の中には、通常の血管には見られない性状があり、いずれも根底に深い生物学的意義が隠されていることが十分考えられる。この血管系の更なる解析は、血管の消退および新生過程の解明に役立つ新しい視点を与えることであろう。

謝辞

原稿を終えるにあたり、研究を通して終始指導と協力をいただいた教室の岩永敏彦教授、岩永ひろみ准教授、小林純子講師、木村俊介助教に深く感謝申し上げます。また、様々なことでお世話していただいた教室事務の岩泉和紀さんには深謝致します。組織学的解析に必須の特異抗体のいくつかは、解剖発生学教室の渡辺雅彦教授に手によるもので、心から感謝申し上げたい。

貴重な galectin-3 ノックアウトマウスを提供していただいた近畿大学微生物学講座の朴 雅美准講師には御礼申し上げます。

引用文献

- Adams, R.H. and Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 464-478.
- Ashton, N. (1968). Some aspects of the comparative pathology of oxygen toxicity in the retina. *Brit. J. Ophthalmol.* 52, 505-531.
- Balazs, E.A. (1975). Fine structure of the developing vitreous. *Int. Ophthalmol. Clin.* 15, 53-63.
- Banerji, S., Ni, J., Wang, S.-X., Clasper, S., Su, J., Tammi, R., Jones, M., and Jackson, D.G. (1999). LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J. Cell Biol.* 144, 789-801.
- Bergersen, L., Jóhannsson, E., Veruki, M.L., Nagelhus, E.A., Halestrap, A., Sejersted, O.M., and Ottersen, O.P. (1999). Cellular and subcellular expression of monocarboxylate transporters in the pigment epithelium and retina of the rat. *Neuroscience* 90, 319-331.
- Braekkevelt, C.R. and Hollenberg, M.J. (1970). Comparative electron microscopic study of development of hyaloid and retinal capillaries in albino rats. *Am. J. Ophthalmol.* 69, 1032-1046.
- Brown, A.S., Leamen, L., Cucevic, V., and Foster, F.S. (2005) Quantitation of hemodynamic function during developmental vascular regression in the mouse eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 2231-2237.
- Browning, J., Reichelt, M.E., Gole, G.A., and Massa, H. (2001). Proximal arterial vasoconstriction precedes regression of the hyaloid vasculature. *Curr. Eye Res.* 22, 405-411.
- Cairns, J.E. (1959). Normal development of the hyaloid and retinal vessels in the rat. *Brit J Ophthalmol* 43:385-393.
- Chidlow, G., Wood, J.P. M., Graham, M., and Osborne, N.N. (2005). Expression of monocarboxylate transporters in rat ocular tissues. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 288, C416-C428.
- Colnot, C., Ripoche, M.-A., Milon, G., Montagutelli, X., Crocker, P.R., and Poirier, F. (1998). Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice. *Immunology* 94, 290-296.

- DeRoo, E.P., Wroblewski, S.K., Shea, E.M., Al-Khalil, R.K., Hawley, A.E., Henke, P.K., Myers, D.D. Jr, Wakefield, T.W., and Diaz, J.A. (2017). The role of galectin-3 and galectin-3-binding protein in venous thrombosis. *Blood* 125, 1813-1821.
- Diez-Roux, G., Argilla, M., Makarenkova, H., Ko, K., and Lang, R.A. (1999). Macrophages kill capillary cells in G1 phase of the cell cycle during programmed vascular regression. *Development* 126, 2141-2147.
- Dorrell, M.I., Aguilar, E., and Friedlander, M. (2002). Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocyte template and specific R-cadherin adhesion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 3500-3510.
- Dumic, J., Dabelic, S., and Flögel, M. (2006). Galectin-3: an open-ended story. *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 616-635.
- Fruttiger, M., Calver, A.R., Krüger, W.H., Mudhar, H. S., Michalovich, D., Takakura, N., Nishikawa, S., and Richardson, W.D. (1996). PDGF mediates a neuron-astrocyte interaction in the developing retina. *Neuron* 17, 1117-1131.
- Fukushi, J., Makagiansar, I.T., and Stallcup, W.B. (2004). NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and $\alpha 3 \beta 1$ integrin. *Mol. Biol. Cell* 15, 3580-3590.
- Garcia, C.K., Goldstein, J.L., Pathak, R.K., Anderson, R.G.W., and Brown, M.S. (1994). Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. *Cell* 76, 865-873.
- Gariano, R.F. and Gardner, T.W. (2005). Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature* 438, 960-966.
- Gerhart, D.Z., Enerson, B.E., Zhdankina, O.Y., Leino, R.L., and Drewes, L.R. (1997). Expression of monocarboxylate transporter MCT1 by brain endothelium and glia in adult and suckling rats. *Am. J. Physiol.* 273 (Endocrinol. Metab. 36), E207-E213.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., and Betsholtz, C. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell. Biol.* 161, 1163-1177.

- Gittens, B.R., Bodkin, J.V., Nourshargh, S., Perretti, M., and Cooper, D. (2017). Galectin-3: a positive regulator of leukocyte recruitment in the inflamed microcirculation. *J. Immunol.* 198, 4458-4469.
- Halestrap, A.P. (2012). The monocarboxylate transporter family—structure and functional characterization. *IUBMB Life* 64, 1-9.
- Halestrap, A.P. (2013). Monocarboxylic acid transport. *Compr Physiol* 3, 1611-1643.
- Halestrap, A.P. and Meredith, D. (2004). The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch.* 447, 619-628.
- Hegde, S. and Srivastava, O. (2017). Different gene knockout/transgenic mouse models manifesting persistent fetal vasculature: Are integrins to blame for this pathological condition? *Life Sci.* 171, 30-38.
- Hida, T. (1982). Hyaloid vascular system of the rat: a study on its topography examined by plastic cast. *J. Jpn. Ophthalmol. Soc.* 86, 315-327 (*Acta Soc Ophthalmol Jpn*).
- Holash, J.A. and Stewart, P.A. (1993). The relationship of astrocyte-like cells to the vessels that contribute to the blood-ocular barriers. *Brain Res.* 629, 218-224.
- Hollenberg, M.J. and Dickson, D.H. (1971). Scanning electron microscopy of the tunica vasculosa lentis of the rat. *Can. J. Ophthalmol.* 6, 301-310.
- Hsu, D.K., Yang, R.Y., Pan, Z., Yu, L., Salomon, D.R., Fung-Leung, W.P., and Liu, F.T. (2000). Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am. J. Pathol.* 156, 1073-1083.
- Hughes, R.C. (1999). Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1473, 172-185.
- Hughes, R.C. (2001). Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 83, 667-676.
- Inohara, H., Akahani, S., Kohts, K. and Raz, A. (1996). Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion. *Cancer Res.* 56, 4530-4534.
- Ito, M. and Yoshioka, M. (1999). Regression of the hyaloid vessels and pupillary membrane of the mouse. *Anat. Embryol.* 200, 403-411.
- Iwanaga, T. and Kishimoto, A. (2015). Cellular distributions of monocarboxylate transporters: a review. *Biomed. Res.* 36, 279-301.

- Jack, R.L. (1972). Ultrastructure of the hyaloid vascular system. *Arch. Ophthalmol.* 87, 555-567.
- Johnston, B. and Kubes, P. (1999). The $\alpha 4$ -integrin: an alternative pathway for neutrophil recruitment? *Immunol. Today* 20, 545-550.
- Kaji, I., Iwanaga, T., Watanabe, M., Guth, P. H., Engel, E., Kaunitz, J. D. and Akiba, Y. (2015). SCFA transport in rat duodenum. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 308, G188-G197.
- Karlsson, A., Christenson, K., Matlak, M., Björstad, Å., Brown, K.L., Telemo, E., Salomonsson, E., Leffler, H. and Bylund, J. (2009). Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils. *Glycobiology* 19, 16-20.
- Krzeslak, A. and Lipinska, A. (2004). Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 9, 305-328.
- Kuwabara, I. and Liu, F.T. (1996). Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J. Immunol.* 156, 3939-3944.
- Lang, R.A. and Bishop, J.M. (1993). Macrophages are required for cell death and tissue remodeling in the developing mouse eye. *Cell* 74, 453-462.
- Latker, C. H. and Kuwabara, T. (1981). Regression of the tunica vasculosa lentis in the postnatal rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 21, 689-699.
- Lesley, J., Hyman, R., and Kincade, P.W. (1994). CD44 and its interaction with the extracellular matrix. *Adv. Immunol.* 54, 271-335.
- Liu, F.T. (2000). Galectins: a new family of regulators of inflammation. *Clin. Immunol.* 97, 79-99.
- Liu, F.T. (2005). Regulatory roles of galectins in the immune response. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 136, 385-4000.
- Liu, F.T., Hsu, D.K., Zuberi, R.I., Kuwabara, I., Chi, E.Y., and Henderson, W.R. Jr (1995). Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am. J. Pathol.* 147, 1016-1028.
- Lobov, I.B., Rao, S., Carroll, T.J., Vallance, J.E., Ito, M., Ondr, J.K., Kurup, S., Glass, D.A., Patel, M.S., Shu, W., Morrissey, E.E., McMahon, A.P., Karsenty, G., and Lang,

- R.A. (2005). WNT7b mediates macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature. *Nature* 437, 417-421.
- McLeod, D.S., Hasegawa, T., Baba, T., Grebe, R., d'Auriac, I.G., Merges, C., Edwards, M., and Lutty, G.A. (2012). From blood islands to blood vessels: morphologic observations and expression of key molecules during hyaloid vascular system development. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 7912-7927.
- Meeson, A., Palmer, M., Calton, M., and Lang, R. (1996). A relationship between apoptosis and flow during programmed capillary regression is revealed by vital analysis. *Development* 122, 3929-3938.
- Mitchell, C.A., Risau, W., and Drexler, H.C. (1998). Regression of vessels in the tunica vasculosa lentis is initiated by coordinated endothelial apoptosis: a role for vascular endothelial growth factor as a survival factor for endothelium. *Dev. Dyn.* 213, 322-333.
- Nangia-Makker, P., Honjo, Y., Sarvis, R., Akahani, S., Hogan, V., Pienta, K.J., and Raz, A. (2000). Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 156, 899-909.
- Nieminen, J., Kuno, A., Hirabayashi, J., and Sato, S. (2007). Visualization of galectin-3 oligomerization on the surface of neutrophils and endothelial cells using fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 282, 1374-1383.
- Nieminen, J., St-Pierre, C., Bhaumik, P., Poirier, F., and Sato, S. (2008). Role of galectin-3 in leukocyte recruitment in a murine model of lung infection by *Streptococcus pneumoniae*. *J. Immunol.* 180, 2466-2473.
- Ochieng, J., Leite-Browning, M.L., and Warfield, P. (1998). Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 788-791.
- Ozerdem, U., Grako, K.A., Dahlin-Huppe, K., Monosov, E., and Stallcup, W.B. (2001). NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Dev. Dyn.* 222, 218-227.
- Pellerin, L., Pellegrini, G., Martin, J.L., and Magistretti, P.J. (1998). Expression of monocarboxylate transporter mRNAs in mouse brain: Support for a distinct role of lactate as an energy substrate for the neonatal vs. adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3990-3995.

- Pitulescu, M.E., Schmidt, I., Benedito, R., and Adams, R.H. (2010). Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nat. Protocols* 5, 1518-1534.
- Rao, S.P., Wang, Z., Zuberi, R.I., Sikora, L., Bahaie, N.S., Zuraw, B.L., Li, F.-T., and Sriramaraio, P. (2007). Galectin-3 functions as an adhesion molecule to support eosinophil rolling and adhesion under conditions of flow. *J. Immunol.* 179, 7800-7807.
- Saint-Geniez, M. and D'Amor, P.A. (2004). Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 1045-1058.
- Sakai, K., Shimizu, H., Koike, T., Furuya, S., and Watanabe, M. (2003). Neutral amino acid transporter ASCT1 is preferentially expressed in L-Ser-synthetic/storing glial cells in the mouse with transient expression in developing capillaries. *J. Neurosci.* 23, 550-560.
- Sano, H., Hsu, D.K., Yu, L., Apgar, J.R., Kuwabara, I., Yamanaka, T., Hirashima, M., and Liu, F.T. (2000). Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J. Immunol.* 165, 2156-2164.
- Sano, H., Hsu, D.K., Apgar, J.R., Yu, L., Sharma, B.B., Kuwahara, I., Izui, S., and Liu, F.T. (2003). Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J. Clin. Invest.* 112, 389-397.
- Sato, S. and Hughes, R.C. (1992). Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylactosamine glycans and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. *J. Biol. Chem.* 267, 6983-6990.
- Sato, S. and Hughes, R.C. (1994). Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactose-binding protein of macrophages. *J. Biol. Chem.* 269, 4427-4430.
- Sato, S., Ouellet, N., Pelletier, I., Simard, M., Rancourt, A., and Bergeron, M.G. (2002). Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. *J. Immunol.* 168, 1813-1822.
- Smith, R.S., John, S.W.M., Nishina, P.M., and Sundberg, J.P. (2002). Systematic evaluation of the mouse eye: Anatomy, pathology, and biomethods. Boca Raton FL, CRC Press.
- Strasser, G.A., Kaminker, J.S., and Tessier-Lavigne, M. (2010). Microarray analysis of retinal endothelial tip cells identifies CXCR4 as a mediator of tip cell morphology and branching. *Blood* 115, 5102-5110.

- Suzuki, Y., Inoue, T., Yoshimaru, T., and Ra, C. (2008). Galectin-3 but not galectin-1 induces mast cell death by oxidative stress and mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 924-934.
- Strek, W., Streck, P., Nowogrodzka-Zagórska, M., Litwin, J. A., Pitynski, K., and Miodonski, A.J. (1993). Hyaloid vessels of the human fetal eye. A scanning electron microscopic study of corrosion casts. *Arch. Ophthalmol.* 111, 1573-1577.
- Takahashi-Iwanaga, H. and Fujita, T. (1986). Application of an NaOH maceration method to a scanning electron microscopic observation of Ito cells in the rat liver. *Arch. Histol. Jpn.* 49, 349-357.
- Takata, K., Hirano, H., and Kasahara, M. (1997). Transport of glucose across the blood-tissue barriers. *Int. Rev. Cytol.* 172, 1-53.
- Taniguchi, H., Kitaoka, T., Gong, H., and Amemiya, T. (1999). Apoptosis of the hyaloid artery in the rat eye. *Ann. Anat.* 181, 555-560.
- Townes-Anderson, E. and Raviola, G. (1982). Morphology and permeability of blood vessels in the prenatal rhesus monkey eye: how plasma components diffuse into the intraocular fluids during development. *Exp. Eye Res.* 35, 203-230.
- Vannucci, S.J. and Simpson, I.A. (2003). Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E1127-E1134.
- Wan, S.Y., Zhang, T.F., and Ding, Y. (2011). Galectin-3 enhances proliferation and angiogenesis of endothelial cells differentiated from bone marrow mesenchymal stem cells. *Transplant. Proc.* 43, 3933-3938.
- Werr, J., Xie, X., Hedqvist, P., Ruoslahti, E., and Lindbom, L. (1998). β 1 integrins are critically involved in neutrophil locomotion in extravascular tissue in vivo. *J. Exp. Med.* 187, 2091-2096.
- Yang, R.Y., Rabinovich, G.A., and Liu, F.T. (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert. Rev. Mol. Med.* 10:e17.
- Zhang, Y. and Stone, J. (1997). Role of astrocytes in the control of developing retinal vessels. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 1653-1666.

Zhang, H., Tse, J., Hu, X., Witte, M., Bernas, M., Kang, J., Tilabun, F., Hong, Y.-K., Qiu, M., and Chen, L. (2010). Novel discovery of LYVE-1 expression in the hyaloid vascular system. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 6157-6161.

Zheng, M., Kimura, S., Nio-Kobayashi, J., Takahashi-Iwanaga, H., and Iwanaga, T. (2014). Three types of macrophagic cells in the mesentery of mice with special reference to LYVE-1-immunoreactive cells. *Biomed. Res.* 35, 37-45.

Zhuo, Y., Chammas, R., and Bellis, S.L. (2008). Sialylation of beta1 integrins blocks cell adhesion to galectin-3 and protect cells against galectin-3-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 283, 22177-22185.