鼻粘膜由来ヒト微小血管内皮細胞の長期培養と血管新生

鹿児島大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：大山 勝教授）

今 村 洋 子

LONG-TERM CULTURE OF HUMAN MUCOSAL MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS
AND ANGIOGENESIS IN VITRO

YOKO IMAMURA, M.D.

Department of Otolaryngology, Faculty of Medicine, Kagoshima University, Kagoshima

Human mucosal microvascular endothelial cells (HMMECs) were isolated and cultured from nasal inferior turbinates. These cells can be maintained for up to 30 passages over 10 months, as long as human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), using dish-coated collagen and MCDB 107 medium supplemented with 10 % fetal bovine serum and 75 μ g/ml of crude endothelial cell growth factor prepared from bovine brain. These cells readily formed capillary-like structures when cultivated on dish-coated collagen or collagen gels as compared with HUVECs. The collagenase activities of conditioned medium from HMMEC culture on collagen gels were considerably higher in tumor conditioned medium while those from HUVECs were undetectable. The capillary-like structure in the collagen gel and the collagenase activities of conditioned medium were periodically changed during long-term cultivation of HMMECs. A good correlation between the two was observed.

These results, suggest that there are phenotypic differences between HMMECs and HUVECs and that collagenase plays an important role in angiogenesis. These cultured HMMECs could serve as a valuable experimental model for determining mucosal pathogenesis in the nasal and paranasal sinus regions.

Key words: 微小血管内皮細胞, 長期培養, 血管様構造物, コラゲナーゼ A96—0077—32040

結 言

細胞培養技術の発達に伴い、神経細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞等のヒト体細胞を個別に培養することが可能となってきた。それにより、各細胞独自の機能や生体での役割が解明され、腫瘍、炎症等の病態における各種細胞の細胞間相互作用も明らかになりつつある。なかでも血管内皮細胞培養は、悪性新生物の増殖や転移、炎症やアレルギーの病態、動脈硬化や創傷治癒の機序を解明するうえで重要な役割を果たしてきた^{1)~4)}。過去、ヒト血管内皮細胞は、臍帯

静脈、肺静脈、大動脈といった大血管由来の内皮細胞以外に、皮膚、副腎皮質、脂肪組織、血管腫の微小血管由来の内皮細胞が単離・培養されているが、臍帯静脈由来の内皮細胞以外は長期にかつ安定した培養が困難であり、血管内皮細胞の実験的研究は、もっぱらこの臍帯静脈由来の培養血管内皮細胞が用いられている^{5)~9)}。しかしながら、微小血管内皮細胞の培養法、細胞機能が大血管内皮細胞とは若干異なり、しかも由来臓器の違いにより、同じ微小血管内皮細胞でも細胞特性の違いがあると報告されている¹⁰⁾。

今回著者は、手術時に採取したヒト下鼻甲粘膜より微小血管内皮細胞のみを培養し、現在広く研究に用いられている臍帯静脈由来の内皮細胞と同程度に、これら細胞の長期培養を可能にすることに成功した。そしてこれら細胞をコラーゲン・ゲル上で培養することで、比較的容易にコラーゲン・ゲル内に血管様構造物が形成され、この血管様構造物形成に、内皮細胞自身が産生するコラーゲナーゼが関与することを見いだした。このような内皮細胞は、慢性副鼻腔炎における間葉系細胞や炎症細胞との相互作用を解析するうえで有用と思われる。そこで著者らは、これら内皮細胞の長期培養の手法やその細胞特性、さらには血管様構造物形成との関係などを中心に、その研究成績を報告する。

研究方法

ヒト鼻粘膜微小血管内皮細胞の分離と初代培養

下鼻甲介由来の微小血管内皮細胞の分離及び初代培養は Davison らの方法に準じた¹¹⁾¹²⁾。鼻アレルギーまたは慢性肥厚性鼻炎患者の下鼻甲介切除術にて得られた下鼻甲介粘膜を 500 μ g/ml ペニシリン G, 500 μ g/ml ストレプトマイシンを含む生理食塩水で洗浄後、鉗を用いて上皮組織、骨膜を除去した。この下鼻甲介粘膜を、メスにて 4~5mm 角の小片に切断して DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) で洗浄後、0.5% コラーゲナーゼ、1% EDTA を含む培養液に浸漬して、37°C で 70 分間放置した。取り出した粘膜小片を DPBS で 3 回洗浄した後、20% FBS を含む MCDB 107 (GIBCO) の入ったシャーレ上で、粘膜剥離子を用いて粘膜小片を中央から辺縁へ向かって軽く擦過して、微小血管の内皮細胞を培養液中に押し出した。培養液中に遊離した細胞を、800 回転、5 分間遠心して集め、20% FBS を含む MCDB 107 で懸濁し、これをヒト胎盤由来のコラーゲンを被覆した ϕ 60mm のシャーレに播種した。一度に播種する細胞数は、平均して 4~5mm 角の粘膜小片 10 個から培養液中に押し出されたすべての細胞である。コラーゲン被覆シャーレは、ヒト胎盤由来コラーゲン 0.5ml をシャーレ面に均等にのばした後、余分なコラーゲンを吸引し、自然乾燥させたものである。5% CO₂, 95% Air, 37°C の培養器内で 70 分間放置した後、シャーレの培養液を除去し、DPBS でシャーレの培養面を洗浄し、10% FBS, 75 μ g/ml ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement: Collaborative Research) を含む MCDB 107 (標準培養液) で培養した。培養液は隔日に交換した。

ヒト鼻粘膜微小血管内皮細胞の継代培養

初代培養で、内皮細胞が融合状態に達した段階で 0.05% トリプシン、0.02% EDTA を含む DPBS で細胞を集め、1:4 に分割して、コラーゲンを被覆した新しいシャーレにて標準培養液を加えて培養した。継代した内皮細胞は 1 週間以内に再び融合状態となるため、その時点で次の継代を施行した。

コラーゲン・ゲル上のヒト鼻粘膜微小血管内皮細胞培養

コラーゲン・ゲルの構成は I 型ラット尾腱コラーゲン (Collaborative Research Inc.), 蒸留水, 5 倍 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Gibco), 1N N₂HCO₃ をそれぞれ 2:5:2:1 の割合で 4°C で混合し、これを ϕ 35mm のシャーレに 1ml 入れ、培養器中に 37°C で 10 分間放置したものである。形成されたコラーゲン・ゲル上に継代培養によって得られた血管内皮細胞を播種し、隔日に培養液を交換した。

内皮細胞の同定

A. 間接免疫蛍光抗体法による第 VIII 因子関連抗原の観察

表面をコラーゲンで被覆したスライド・ガラス上で、ヒト鼻粘膜微小血管内皮細胞を培養し、95% エタノールで固定後、ウサギ抗ヒト第 VIII 因子抗体 (Nordic Immunology Laboratories, Netherlands), FITC (Fluorescence-iso-tiocyanate) 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Cappel Laboratories) を用いた間接免疫蛍光抗体法にて細胞内の第 VIII 因子を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

B. UEA-1 レクチン染色

スライド ガラス上で培養した内皮細胞を 10% 中性ホルマリンで固定後、ビチオン化 UEA-1 (Ulex europaeus agglutinin) レクチンと反応させ、ABC-kit (avidin-biotin-peroxidase complex; Vecta-stain Kit) を用いて染色した。

C. 電子顕微鏡による培養血管内皮細胞及び血管様構造物の観察

コラーゲン被覆シャーレ、あるいはコラーゲン・ゲル上で培養した内皮細胞並びに血管様構造物を、シャーレのまま 2.5% グルタルアルデヒドで固定後、オスミウム酸染色し、Epon Q812 で包埋した。小ブロックに切り出した後、培養面に対して水平な面と垂直な面で、超薄切片を作製し、酢酸ウラニルと酢酸鉛で染色後、透過型電子顕微鏡 (HITACHI H-300S) で観察し

た。

ヒト鼻粘膜微小血管内皮細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞の血管様構造物の形成及びコラゲナーゼ活性の比較

ヒト由来の鼻粘膜微小血管内皮細胞と臍帯静脈内皮細胞を、 $\phi 35\text{mm}$ シャーレ内に作成したコラゲン・ゲル上に1シャーレ当たり約70,000ずつ播種し、以下に述べる培養条件で血管様構造物の形成を観察し、同時にそれぞれの培養上清中のコラゲナーゼ活性を測定した。ヒト臍帯静脈内皮細胞は Jaffe らの方法に従い、我々の施設で臍帯静脈より分離・培養し⁵⁾、液体室内にストックしておいたものを使用した。培養条件は、標準培養液 (ECGS 添加)、マウス Sarcoma 180 ならし培地 (TCM: tumor conditioned medium) 添加標準培養液、TCM 添加 MCDB 107 (ECGS 不添加) の3種類である。培養液は隔日交換し、その際除去した培養上清は、スピッツに入れて -40°C で保存し、次に述べる方法で培養液内のコラゲナーゼ活性を測定した。本実験では継代培養した内皮細胞の7～9代目をを用いた。

コラゲナーゼ測定法

まず前処理として、細胞培養上清 $100\mu\text{l}$ に $40\mu\text{l}$ の TPCk-trypsin (1mg/ml , Cooper Biomedical 社) を加え、 35°C で10分間インキュベートして、潜在型コラゲナーゼの活性化を行ったのち、 $60\mu\text{l}$ のダイズトリプシンインヒビター (3mg/ml , Sigma 社) を加えて室温で10分間放置し、trypsin を不活化した。次にコラゲノ

キット (コスモ・バイオ社) を使用し、コラゲナーゼ活性を測定した。前記のごとく前処理を施した検体に、蛍光標識コラゲン (ウシ皮膚 I 型コラゲン) 溶液 $200\mu\text{l}$ を加え、 35°C で120分間反応させた後、 80mM の酵素反応停止液 α -フェナントロリン $10\mu\text{l}$ を加えて 35°C 、60分間インキュベートし反応を停止させて、分解産物のみを熱変性させた。更に $400\mu\text{l}$ 70% エタノールで分解産物を抽出し、蛍光分光光度計を用いてその蛍光光度 ($\text{Em}; 520\text{nm}$, $\text{Ex}; 495\text{nm}$) を測定した。コラゲナーゼ活性 1 unit は $1\mu\text{g}$ のコラゲンを1分間に分解する酵素活性とした¹³⁾。

研究成績

内皮細胞の初代培養

ヒト下鼻甲介粘膜より採取した微小血管内皮細胞を、コラゲンを被覆したシャーレに播種し、培養器内に放置すると、60分後には、2～3個の内皮細胞の集合がシャーレ面に散在するのが観察された。この時点で培養液と共に未接着の細胞を洗い流し、標準培養液を隔日交換して培養を続けると、図1のごとく内皮細胞のコロニーが増大し、互いに融合して、1週間程度でシャーレ面全体が均一の細胞で覆われた。この時点では、明瞭な核を持つ円形の細胞が、血管内皮細胞に特有の単層の敷石上配列を示した。融合状態に達した内皮細胞群は、増殖を停止し定常状態となり、培養液交換を継続すれば、定常状態を4～6週間は特続し

図1 下鼻甲介由来微小血管内皮細胞の初代培養
上段左より播種後1時間、24時間、36時間
下段左より播種後3日、5日、1週間

図2 内皮細胞の増殖に対するTCMの影響
上-下鼻甲介微小血管内皮細胞
下-臍帯静脈内皮細胞

た。一方、Folkman らの方法に従い mouse sarcoma 180 の培養上清から作製した TCM¹⁹⁾ を添加し、標準培養液と TCM の 1 : 1 の混合液で内皮細胞を培養すると、細胞の増殖が著明に促進され、融合状態になるまでの日数が 4 ~ 5 日に短縮される一方、融合状態での細胞の形態及び配列の変化も認めた。TCM 添加により、融合状態での内皮細胞は密に集合した円錐形の細胞群となり、部分的に方向性を持つ配列を示した。ヒト臍帯静脈内皮細胞も同様の培養条件で培養したところ、融合状態において、標準培養液下。あるいは TCM と標準培養液との混合培養液下で、共に細胞の増殖及び形態においてヒト下鼻甲介粘膜微小血管内皮細胞と同様の傾向を示したが、細胞の密集度、形態変化、配列変化はいずれも微小血管内皮細胞に比べ軽度

図3 培養細胞の凝固第VIII因子関連抗原の間接免疫蛍光抗体染色(上)と UEA-1 レクチン染色(下)

であった(図2)。

長期継代培養

著者は、12歳から52歳までの肥厚性鼻炎、あるいは鼻アレルギー患者40例から切除した下鼻甲介粘膜より、ヒト鼻粘膜微小血管内皮細胞の初代培養を試み、その内の約25例において少なくとも6代(12PDL)以上の継代培養が可能であった。そのいくつかで標準培養液下、長期に1 : 4の継代培養が反復され、最多の継代が施行されたものは、現在までに35代(70PDL: population doubling levels)に達し、32PDL及び26PDLの細胞系もまだ活発に増殖し継代を重ねている。しかし継代培養の反復と共に、初めは1週間程度であった分割されてから融合状態に達するまでの日数が、やがて3週間程に延長し、また円形で明瞭な核と

図4 培養細胞内の Weibel-Palade body (電顕像)

緻密な細胞質を有した内皮細胞が、継代と共に緊張を失い、細胞質が不定形となるといった変化が認められた。32PDLの細胞は16歳男性から、26PDLは22歳女性からのもので活発な継代・増殖を続けているのに対し、43歳男性、52歳男性からの細胞は初代培養時から、融合状態に達するのに10～14日かかり、またそれぞれ12PDL及び4PDLでほとんど増殖が止まった。このように、細胞採取者の年齢と継代数の関係では、若年者からの内皮細胞ほど増殖が良く、継代数、生存期間ともに長い傾向が認められた。

内皮細胞の同定

下鼻甲粘膜から採取し培養した細胞が血管内皮細胞であると同定するために、培養細胞の凝固第Ⅷ因子関連抗原の間接免疫蛍光抗体染色、UEA-1 レクチン染色、及び電子顕微鏡での形態的観察を施行した。血管内皮細胞は、細胞質に第Ⅷ因子関連抗原 (von Willebrand factor) を有し、また UEA-1 による染色性も血管内皮細胞に特異的であることが知られており、著者の培養した細胞も図3に示すごとく、すべての細胞が染色された。また電子顕微鏡での観察でも、血管内皮細胞に特有で von Willebrand factor を濃縮している細胞内小器官である Weibel-Palade body を認め (図4)、これらの結果より、培養された細胞は血管内皮細胞であることが確認された。

コラーゲン被覆シャーレ上での血管新生

コラーゲン被覆シャーレで血管内皮細胞を培養し、融合状態で、増殖が停止したまま継代操作をせず、標準培養液を隔日交換し続けると、約1ヵ月後には、培養面上に複数の短い管腔様構造が出現した。それらは両端が二分しつつ延長し、先端で相互に結合して、血

図5 コラーゲン被覆シャーレ上での血管様網目構造の形成

管様の微細な網目構造を形成した (図5)。更に標準培養液の交換を継続したが、血管様構造物は3～4日しか持続せず、培養面からの剥離と新たな血管様構造物の再生を反復した。剥離後には死滅した細胞が培養液に浮遊すると共に、培養細胞層は既に緻密な数石状細胞配列に戻った状態が認められた。血管様構造を形成した部分で、培養面に垂直な薄切標本を作り透過型電子顕微鏡で観察すると、1個の内皮細胞が、培養面から連続的に培養液内に突出してリング状の構造を形成し、リングの内側には細胞の代謝産物と考えられる無構造の物質が存在しており、通常の血管で血液と接する内皮細胞層が、この切片ではリングの外側に位置して培養液と接する一方、管腔の内側に基底膜が認められ、丁度血管腔が内皮したのと類似の状態を示した。また Weibel-Palade body や pinocytotic vesicle も認められた (図6 a, b)。

コラーゲン・ゲル上の血管新生

立体的血管様構造を安定かつ長期に維持するため、コラーゲン・ゲル上で血管内皮細胞を培養したところ、コラーゲン膜上の培養と異なる経過で、血管様網目構造を形成した。コラーゲン・ゲル上に均一に内皮細胞を播種すると、3～4日後にゲル表面に不連続に存在する、中等大で数石状配列を示す細胞のコロニーが数個形成され、コロニー内に短い管腔構造の出現が認められた。管腔状構造は両端が二分しながら延長、結合すると共に、ゲルの深部に向かって増殖し、三次元的な血管様網目構造を形成した (図7)。しかし三次元

a

b

図6 血管様構造の断面電顕像

- a 培養液内に突出したリング状構造
b リングの一部拡大：内側に基底膜(◄)を認める。

条件下の管腔構造は、二次元条件下のものに比較して太く短い傾向があり、網目構造も後者ほど緻密なものではなかった。標準培養液の隔日交換により、形成された網目構造はコラーゲン膜上に比較してより安定な状態で、10～20日の比較的長期間維持されたが、二次元的条件の場合と同様、全体的な網目構造の量としては周期的に消長を反復した。培養日数が50日を超えた頃からコラーゲン・ゲル自体の汚濁が目立ち、内皮細

図7 コラーゲン・ゲル上の血管様網目構造の形成

胞からの代謝産物が周囲に排泄されたものと考えられた。コラーゲン・ゲル表面に垂直な面で連続薄切標本を作成し、透過型電子顕微鏡で観察すると、コラーゲン膜上の血管様構造形成と異なり、コラーゲン・ゲル表面の内皮細胞層の一部が、連続的にゲル深部に向かって襞を形成するように侵入した状態¹⁴⁾や、ゲル表面細胞層と不連続に、ゲル内に独立して存在する、1～2個の内皮細胞から成る管腔構造が認められた(図8)。この管腔構造では、二次元条件下のものと異なり、内皮細胞が管腔の内側に突出して存在し、最外側には基底膜細胞様の像が観察され、本来の生体の血管と類似の構造を呈していた¹⁵⁾ またこの管腔構造形成はTCMの添加によって増強された。ヒト臍帯静脈内皮細胞も同様に血管様構造の形成を示したが、管腔構造の最初の出現を認めるまでの時間的経過が、微小血管内皮細胞での12日に比較して21日と長く、血管様網目構造の量も少ない傾向を認めた。しかし、いったん管腔構造が出現した後は、その消長が微小血管内皮細胞ほど明瞭でなく、管腔構造が常に多少とも存在し続けた。

培養血管内皮細胞のコラゲナーゼ産生

ヒトの下鼻甲粘膜微小血管内皮細胞と臍帯静脈内皮細胞を、コラーゲン・ゲル上で同条件下に培養し、

図8 コラーゲン ゲル内での管腔形成
血管様網目構造の、培養面に垂直な連続超薄切片の抜粋を示す。ゲル表面の内皮細胞層の一部が、内皮細胞同士が相対する形でゲル内に折れこんで行き、孤立した管腔を形成するように観察される。

血管様網目構造の消長を位相差顕微鏡で観察すると共に、同時に採集した培養上清のコラゲナーゼ活性を測定した。ECGSを含む標準培養液で培養したものでは両方の内皮細胞ともほぼ同等に低いコラゲナーゼ活性を示した。一方、ECGSを含む標準培養液とTCMの1:1の混合培養液、あるいはECGSを含まないMCDB 107とTCMの1:1の混合培養液でこれらの内皮細胞を培養すると、臍帯静脈内皮細胞の培養上清のコラゲナーゼ活性はやはり低値を示したのに対し、下鼻甲介粘膜の内皮細胞のそれは周期を持って増加・減少を反復し、前者に比較して著明な高値を示した(図9)。TCMを添加した場合の二種細胞のコラゲナーゼ活性を、観察期間中のトータル値と培養第32日目のピーク値間でt-検定による統計的比較を行うと、それぞれ危険率0.2%及び0.1%レベルで有意の差を認めた。

図9 長期培養血管内皮細胞培養上清中のコラゲナーゼ活性
上—標準培養液，下—標準培養液にTCMを添加
実線は微小血管内皮細胞，破線は臍帯静脈内皮細胞

下グラフにおいて、下鼻甲介微小血管内皮細胞と臍帯静脈内皮細胞のコラゲナーゼ活性測定値間には、観察期間中のトータル値と培養第32日目のピーク値のt-検定による比較で、それぞれ危険率0.2%及び0.1%レベルで有意の差を認めた。

考 按

腫瘍の増殖・転移，創傷治癒，アレルギー，炎症等，種々の病態において微小血管の関与が観察される¹⁶⁾。これら病態の細胞レベルでの解明のために，動物やヒトの様々な臓器由来の血管内皮細胞の培養が試みられ，長期培養の成功も報告されている⁸⁾。しかし一方，血管内皮細胞でも種別，あるいは由来臓器の相違により，その培養条件や生体での機能が異なることも判明してきた¹⁷⁾¹⁸⁾。例えば Folkman らによると，培養されたヒト毛細血管内皮細胞には Weibel-Palade body が

認められるが、ウシ培養毛細血管内皮細胞にはそれが存在せず、また同じウシ血管内皮細胞でも、毛細血管由来の内皮細胞の増殖速度は TCM の存在に左右されるのに対して、大動脈由来のものの増殖は TCM に関係しない¹⁹⁾。また Fibroblast Growth Factor (FGF) の培養内皮細胞増殖に対する作用も、ヒト血管内皮細胞ではトロニン²⁰⁾の共同作用が必要であるのに対して、ウシ血管内皮細胞では FGF のみで増殖を促進する等の報告がある²⁰⁾。ヒト由来の血管内皮細胞として、現在のところ臍帯静脈由来内皮細胞の培養が最も安定して長期に得られ、*in vitro* の研究にはもっぱら本細胞が用いられている。しかし、腫瘍の増殖、転移、創傷治癒、アレルギー、炎症といった病態においては、大血管よりも、むしろ微小血管がこれら病態に関与しており、大血管由来の内皮細胞と微小血管由来のそれとは幾分その性格が異なることを考えると、ヒト由来微小血管内皮細胞の培養系の確立が望まれる。1978年頃から Davison や Folkman らにより皮膚や副腎由来の微小血管内皮細胞の長期培養が始められ⁴⁾⁵⁾¹⁵⁾¹⁹⁾²¹⁾²²⁾、様々な試みがこれに続いているが、まず最初に直面する問題は、純粋に内皮細胞のみの初代培養を成功させることであった²³⁾。微小血管内皮細胞を生体臓器から分離・培養する際、線維芽細胞と上皮細胞が容易に混入し、顕微鏡下に、ピペットやラバーポリスマンを用いて機械的に混入細胞を除去したり¹⁹⁾、比重遠心法により内皮細胞のみを分離する²⁴⁾など、煩雑な方法が用いられてきたが、著者らは各細胞のコラーゲン被覆培養面への接着時間の差を利用し、簡便な方法で、ヒト鼻粘膜微小血管由来の内皮細胞のみの初代培養を確立した¹²⁾。今回著者は培養液の工夫により、これらの内皮細胞の長期継代培養にも成功し、これまで報告されているヒト臍帯静脈内皮細胞と同等に長期、かつ安定した培養系を得た。微小血管内皮細胞の供給源として鼻粘膜を選んだ理由は、鼻粘膜は微小血管に富み、かつ耳鼻咽喉科領域の手術時に容易に得られる組織であることが第一であるが、鼻粘膜は炎症、あるいは喘息を含むアレルギー反応の頻発する気道粘膜の一部を成し、一方鼻腔内の腫瘍も少なくないなど、鼻粘膜では多彩な病態が認められ、鼻粘膜から得た血管内皮細胞の培養系が、微小血管内皮細胞が関与する種々の病態を解明するモデルとして有用であると考えたからである。著者はこれらの細胞を用いてまず血管新生についての幾つかの実験を行った。

鼻粘膜由来の微小血管内皮細胞は、コラーゲン被覆

シャーレ上では、細胞が培養面全体に増殖し、密に融合した後に初めて血管様構造が出現したのに対し、コラーゲン・ゲル上では、培養面の一部にある程度の大きさの細胞のコロニーが形成されると、その内部で血管様構造物が観察された。Kubota らは、血管内皮細胞の活動状態の移行と血管新生の関連について述べ、増殖因子を培養液から除去することにより細胞は増殖期から増殖停止期に移行し、増殖が停止している状態でのみ血管新生が起こり、この現象は可逆的であると報告している²⁵⁾。著者の実験では、細胞の増殖から血管様構造物の形成への移行は、内皮細胞増殖因子 (ECGF) の除去や他の外的刺激なしに起こり、継代せずにこれらの培養を長期継続すると、コラーゲン被覆、あるいはコラーゲン・ゲルいずれの培養系でも血管様構造物が反復出現、ないしは消失するのが認められた。Kubota らの報告のように、血管新生のために、細胞の増殖期から増殖停止期への移行に ECGF の除去あるいは不活化が必要であるとすれば、内皮細胞自体に ECGF 阻害物質が存在する可能性が予想される。内皮細胞が増殖し、相互に密に接触するようになると、接触部からの物理的あるいは化学的情報により、内皮細胞が ECGF 阻害物質を放出し、細胞の状態は増殖期から増殖停止期へ移行すると考えられる¹⁴⁾²⁶⁾。しかし、血管新生が開始される時点での、コラーゲン被覆培養面とコラーゲン・ゲル培養面の細胞の増殖状態の相異から、更に細胞状態の移行のための ECGF 阻害物質放出を促す未知の要素の存在が示唆され、今後に残された興味ある研究課題である。

血管新生に際して、血管内皮細胞が血管新生誘導物質に向かって遊走し、その部に固着した後は、今述べたような機序で血管が形成されるが、それ以前に重要なステップは、血管内皮細胞が、血管壁から周囲結合組織に出て目的部位に到達することであり、そのために血管基底膜及び結合組織の分解が行われなければならない。結合組織は主に I, III 型コラーゲンから成っており、これらは堅固な三本鎖の α -ヘリックス構造を有するために、まず金属プロテアーゼの一種であるコラゲナーゼが α -ヘリックス構造の一部を切る。これにより変性したコラーゲン分子は、さらにこれも金属プロテアーゼの一種であるゲラチナーゼ、あるいは他の様々なプロテアーゼにより容易に分解されるようになる²⁷⁾。基底膜は主に IV 型コラーゲンから成り、これもプロテオグリカナーゼ (ストロメリシン) や IV 型コラゲナーゼで分解される。生体ではこれらのプロテアーゼ

は様々な結合組織細胞から分泌されると共に、マクロファージ、多核白血球、好中球、好酸球等の炎症細胞、更には腫瘍細胞からも分泌され、その分泌を促進する物質として最近 IL-1 が注目されている²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾。また Liotta 等は転移性腫瘍から精製された蛋白分解酵素は IV 型コラーゲンを特異的に分解し、さらに転移の確率の高い腫瘍ほど IV 型コラーゲンの分解活性が高いと報告している³¹⁾。著者の実験で、コラーゲン成分で構成した培養面で、特にコラーゲナーゼを加えることなく血管を形成したことから、内皮細胞自体からもコラーゲナーゼが分泌されると考え、コラーゲン・ゲル上で内皮細胞を播種し、消長を反復する血管様構造物の顕微鏡的観察と平行して、培養上清中のコラーゲナーゼ活性の測定を行った。その際、培養液に TCM を加えることにより、培養液中の TCM の有無が血管様構造物の形成及びコラーゲナーゼ活性に及ぼす影響と、由来臓器の異なる内皮細胞での TCM の作用についても観察した。その結果、TCM の有無にかかわらず、血管形成前にはコラーゲナーゼ活性が高く、逆にいったん血管形成がなされるとその活性は低い傾向が認められた。今回の実験では I 型コラーゲンを基質として用いており、内皮細胞の分泌するコラーゲナーゼは I 型コラーゲナーゼを含むと考えられる。Ingber 等も血管様構造の増加・減少はコラーゲン代謝の変化と関連すると述べており³²⁾³³⁾、結合組織及び炎症細胞等から分泌されるコラーゲナーゼ活性の上昇に加えて、内皮細胞からのコラーゲナーゼも関与して血管の基底膜や血管外結合組織のコラーゲンを分解することにより、内皮細胞の遊走を促進し、目的部位に到達後は血管形成のためのコラーゲンの合成が盛んになると共に、コラーゲナーゼのレベルは低下すると考えられる³⁴⁾³⁵⁾。また異なる臓器由来の内皮細胞間での、TCM の有・無による、コラーゲナーゼ活性レベルを比較すると、下鼻甲粘膜微小血管内皮細胞においては著明に高値を示したが、臍帯静脈内皮細胞では、TCM の有無による差は認められず、TCM には内皮細胞でも、特に微小血管由来のものに特異的に働いて、コラーゲナーゼ活性を増加させる要素が含まれ、腫瘍に微小血管の新生が盛んなことと関係があると考えられる。このように、異なる臓器由来の内皮細胞はその細胞特性もまた異なると考えられるが、Gross らは、ヒト臍帯静脈内皮細胞のコラーゲナーゼ活性レベルは、ウシの毛細血管と大動脈のコラーゲナーゼ活性の中間にあると述べており³⁶⁾、種を問わず微小な血管ほど内皮細胞の放出するコラーゲナーゼ活性は高い

と思われ、コラーゲナーゼ活性と血管新生との間に関連があるとするれば、このことは血管新生が微小血管から起こるという事実と符号する。

以上、ヒト鼻粘膜微小血管内皮細胞の培養法と細胞特性について述べてきたが、この培養系は鼻副鼻腔領域の疾患、とりわけ、炎症、アレルギー、腫瘍など微小血管が関与する病態の解明の実験モデルとして有用である。今後は、この培養系を利用し、更に内皮細胞の分泌するコラーゲナーゼの同定や、内皮細胞の活動状態の移行を左右する因子の解明を分子生物学的な手法も取り入れて進めることにより、種々の病体の発生進行機序や治療に対するより実践的アプローチを試みたいと考えている。

結 語

ヒト下鼻甲粘膜由来の微小血管内皮細胞の純粋培養を試み、その特性について検討した結果、下記の新知見が得られた。

1) 本細胞は培養液を工夫することで、ヒト臍帯静脈由来の血管内皮細胞と同程度の長期かつ安定な培養が可能であった。

2) コラーゲン・ゲル上での培養にて、本細胞は TCM の添加で容易に血管様構造物を形成した。

3) これら血管様構造物は周期的に消長を繰り返し、それに伴って培養液中のコラーゲナーゼ活性の変化が認められた。一方臍帯静脈由来内皮細胞ではその活性が低値であった。

以上、本細胞は大血管由来の内皮細胞と若干その性質を異にすると考えられ、微小血管が関与する病態解明の研究に有用であると考えられた。

参 考 文 献

- 1) 高野達哉, 峰尾千恵子: 血管内皮細胞の機能と動脈硬化. 細胞 20: 351-384, 1988.
- 2) 室田誠逸: 血管内皮細胞の傷害とその制御. 細胞 20: 344-347, 1988.
- 3) Folkman J, Watson K, Ingber D et al: Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. Nature 399: 58-61, 1989.
- 4) Folkman J: How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? Cancer Res 46: 467-473, 1986.
- 5) Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG et al: Culture of human endothelial cells derived from umbilical

- veins. *J Clin Invest* 52: 2745-2756, 1973.
- 6) Gimbrone Jr. MA, Cotran RS, Folkman J: Human vascular endothelial cells in culture. *J Cell Biol* 60: 673-684, 1974.
 - 7) 増澤幹男: 血管内皮細胞の話題. 皮膚病診療 8: 814-817, 1986.
 - 8) Jarrell B, Levine E, Shapiro S et al: Human adult endothelial cell growth in culture. *J Vascular Surg* 1: 757-764, 1984.
 - 9) Maciag T, Hoover GA, Stemberman MB et al: Serial propagation of human endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 91: 420-426, 1981.
 - 10) Pratt BM, Form D, Madri JA: Endothelial cell-extracellular matrix interactions. *Ann New York Acad Sci* 460: 274-288, 1985.
 - 11) Davison PM, Bensch K, Karasek MA: Isolation and growth of endothelial cells from the microvessels of the newborn human foreskin in cell culture. *J Invest Dermatol* 75: 316-321, 1980.
 - 12) Fukuda K, Imamura Y, Koshihara Y et al: Establishment of human mucosal microvascular endothelial cells from inferior turbinate in culture. *Am J Otolaryngol* 10: 85-91, 1989.
 - 13) 永井 裕, 堀 久枝, 服部俊治, 砂田泰伸, 寺戸国昭 他: コラゲナーゼ活性の簡易微量測定法の開発とその応用. 炎症 4: 247-254, 1984.
 - 14) Montesano R, Orci L: Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis in vitro. *Cell* 42: 469-477, 1985.
 - 15) Folkman J, Haudenschild C: Angiogenesis in vitro. *Nature* 288: 551-556, 1980.
 - 16) Folkman J: Angiogenesis. Chap 42 in Jaffe EA (ed) *Biology of endothelial cells*. Martinus Nijhoff Publisher, Boston, 1984, pp 412-428.
 - 17) Hoshi H, McKeehan WL: Isolation, growth requirements, cloning, prostacyclin production and lifespan of human adult endothelial cells in low serum culture medium. *In Vitro Cell Develop Biol* 22: 51-56, 1986.
 - 18) Madri JA, Pratt BM: Endothelial cell-matrix interactions; In vitro models of angiogenesis. *J Histochem Cytochem* 34: 85-91, 1986.
 - 19) Folkman J, Haudenschild CC, Zetter BR: Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5217-5221, 1979.
 - 20) Gospodarowicz D, Brown KD, Birdwell CR et al: Control of proliferation of human vascular endothelial cells. *J cell Biol* 77: 774-788, 1978.
 - 21) 佐藤 昇: Invitro における血管新生. 実験医学 4: 1123-1125, 1986.
 - 22) 辻 卓夫, Karasek MA: ヒト皮膚微小血管内皮細胞の培養法と血管様構造の再構築. 組織培養 10: 55-58, 1984.
 - 23) 山本清高: 血管内皮細胞の純培養. 細胞 20: 329-333, 1988.
 - 24) Marks RM, Czerniecki M, Penny R: Human dermal microvascular endothelial cells; An improved method for tissue culture and description of some singular properties in culture. *In Vitro Cell Develop Biol* 21: 627-635, 1985.
 - 25) Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR et al: Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol* 107: 1589-1598, 1988.
 - 26) Ingber DE, Folkman J: How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? *Cell* 58: 803-805, 1989.
 - 27) Piez KA, Reddi AH: *Extracellular Matrix Biochemistry*. Elsevier Science Publishers, New York, 1984.
 - 28) Dejana E, Ji-Ming W, Mantovani A: The recruitment of leukocytes and their interaction with the vessel wall; The role of interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Scand J Rheumatology Suppl* 66: 19-25, 1987.
 - 29) Herron GS, Banda MJ, Clark EJ et al: Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 2: 2814-2818, 1985.
 - 30) Murphy G, Reynolds JJ: Current views of collagen degradation; Progress towards understanding the resorption of connective tissues. *Bioassays* 2: 55-60, 1985.
 - 31) Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S et al: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284: 67-68, 1980.
 - 32) Ingber D, Folkman J: Inhibition of angiogenesis through modulation of collagen metabolism. *Lab Invest* 59: 44-51, 1988.
 - 33) Ingber DE, Folkman J: Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro; Role of extracellular matrix. *J Cell Biol* 109:

- 317-330, 1989.
- 34) Kramer RH, Fub G-M, Karasek MA: Type IV collagen synthesis by cultured human microvascular endothelial cells and its deposition into the subendothelial basement membrane. *Biochem* 24: 7423-7430, 1985.
- 35) Iruela - Arispe ML, Hasselaar P, Aage H: Differential expression of extracellular proteins is correlated with angiogenesis in vitro. *Lab Invest* 64: 174-186, 1991.
- 36) Gross JL, Moscatelli D, Jaffe EA et al: Plaminogen activator and collagenase production by cultured capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 95: 974-981, 1982.

稿を終えるにあたり、暖かいご指導ならびにご校閲を賜りました恩師大山 勝教授に深甚なる謝意を表します。また本研究に際し、終始直接のご指導とご助言を頂きました福田勝則先生に心からの感謝を申し上げますとともに、電顕標本作製にあたり専門的にご指導、ご協力下さいました花牟礼 豊先生に厚くお礼申し上げます。またご親切なご助言、ご協力を頂きました教室の先輩諸先生方、及び片平聖子研究員に深謝致します。

(1992年 6月16日受稿 1992年12月3日受理 急載)
別刷請求先 〒890 鹿児島市桜ヶ丘8-35
鹿児島大学医学部耳鼻咽喉科学教室 今村洋子

<p>A 96—0077—32041</p> <p>鼻粘膜由来ヒト微小血管内皮細胞の長期培養と血管新生</p> <p>今村洋子 (鹿大)</p> <p>ヒト下甲介粘膜より微小血管内皮細胞を分離し、コラーゲン被覆シャーレ上でFBS及びEGGF加MCDB107を培養液として、ヒト臍帯静脈内皮細胞と同程度の30代を超える長期継代培養を行った。臍帯静脈内皮細胞との比較で、本細胞はより容易に血管様構造物を形成し、またTCM存在下での培養上清中コラーゲンゼ活性も著明に高値を示した。コラーゲン・ゲル内の血管様構造物の量と培養上清中のコラーゲンゼ活性は長期培養中に相互に関連する定期的な変化を示し、内皮細胞は由来臓器により性質が異なり、コラーゲンゼが血管新生に重要な役割を持つと考えられる。本培養系は鼻・副鼻腔粘膜病変の解明に有用な実験モデルになると思われる。</p>	<p>日耳鼻</p> <p>A 96—0058—92384</p> <p>甲状腺乳頭腺癌の統計学的検討 ——特に術後再発に関する検討とその方法論——</p> <p>浅井美洋・峯田周幸・梅村和夫・安原秋夫・向高洋幸 石崎久義・伊藤久子・野末道彦 (浜松医大)</p> <p>新たに「手術根治度」という治療的要因を定義し、甲状腺乳頭腺癌44症例を対象とした術後再発に関する統計学的検討を行った。多変量解析(Cox)の重回帰型生命表法の結果、術後再発に有意に影響していたのはT分類、年齢層及び手術根治度であった。また術後累積再発率を手術根治度別に検討した結果、ルーチンの気管周囲郭清術に加えて術前や術中に転移性リンパ節を認めた側頸部のみ系統的に郭清した群の術後5年累積再発率は約10%、リンパ節摘出または部分的郭清で済ませた群では約70%であった。一方、術前や術中にリンパ節転移が認められれば系統的に側頸部を郭清しなくても術後5年以内の頸部リンパ節再発はなかった。以上より術後のQOL (Quality of Life) を考慮すると、甲状腺乳頭腺癌の初回手術では年齢層及び原発巣の進展度に留意しながら、頸部リンパ節に対しては気管周囲郭清術と術前または術中所見で転移を認める側の側頸部郭清術を行うことが適当と考えた。また「手術根治度」は手術方針や予後の検討に有用であると考えた。</p>
<p>A 96—0088—90341</p> <p>頭頸部癌におけるHLA-DR抗原の免疫組織学的考察</p> <p>寒川高男 (和医大)</p> <p>頭頸部扁平上皮癌42症例を対象に、HLA-DR抗原の発現について免疫組織学的に検討した。その結果、癌組織でのHLA-DR抗原発現は、各癌組織で種々の程度にみられ、腫瘍浸潤リンパ球と有意な関係が認められた。つまり、CD8陽性リンパ球(CD8/CD3)はHLA-DR抗原陽性癌組織に多くみられ、CD4陽性リンパ球(CD4/CD3)はHLA-DR抗原陰性癌組織に多く浸潤していた。そして、HLA-DR抗原陽性癌組織では、細胞増殖の指標とされているKi-67陽性率が有意に低下していた。また、in vitroの実験から、IFN-γは癌細胞に対してHLA-DR抗原の発現を増強し、かつ、Ki-67陽性率を低下させた。以上のことから、癌組織でのHLA-DR抗原の発現は、腫瘍浸潤リンパ球により産生されたサイトカインによって誘導される可能性が示唆された。</p>	<p>日耳鼻</p> <p>A 96—0066—60010</p> <p>イヌ喉頭神経に含まれる自律神経線維の 起始細胞についての研究</p> <p>——コレラトキシンによる逆行性トレーサー法を用いて——</p> <p>宇野敏行 (京府医大)</p> <p>イヌ上喉頭神経、下喉頭神経に線維を送る自律神経の起始細胞の分布を、逆行性トレーサーであるコレラトキシンBサブユニットを用いた、免疫組織化学法によって検討した。実験には2カ月の幼犬を用い、上喉頭神経内枝、上喉頭神経外枝、下喉頭神経にコレラトキシンを適用した。実験結果より、1) イヌ喉頭を支配する交感神経細胞は、主として上頸神経節の尾側に分布し、主に上喉頭神経内枝に線維を送っていること、2) イヌ喉頭を支配する副交感神経細胞は、迷走神経背側核の限られた範囲に局在し、その主たる経路もまた上喉頭神経内枝であることが明らかになった。</p>