115 血管内皮細胞-平滑筋細胞共培養系の LDL の取り込み および構成細胞の増殖特性

The characteristics of an endothelial-smooth muscle cell coculture in the uptake of LDL and the growth of cells

○丹羽 光一 (北大電子研) 中田 直哉 (北大工) 南山 真裕子 (北大工) 正 狩野 猛 (北大電子研)

Koichi NIWA, Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University, Sapporo.

Naoya NAKADA, Faculty of Engineering, Hokkaido University, Sapporo.

Mayuko MINAMIYAMA, Faculty of Engineering, Hokkaido University, Sapporo.

Takeshi KARINO, Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University, Sapporo.

Key words: Endothelial Cell, Smooth Muscle Cell, Coculture, LDL

1. はじめに

動脈壁は内膜、中膜および外膜から成っており、内膜は血管内皮細胞と内弾性板、中膜は主に血管平滑筋細胞から構成されている。血管壁の内膜内にコレステロールが過剰に蓄積すると、動脈硬化が生じることが知られている。コレステロールは低密度リポ蛋白 (low density lipoprotein; LDL) の構成成分として血中に存在しており、血中コレステロール濃度の上昇は動脈硬化発症の危険因子とみなされている。

動脈硬化の研究のために培養内皮細胞 (EC) や平滑筋細胞 (SMC) を用いた実験が数多くなされてきた。さらに EC と SMC の相互作用を調べる目的で、両細胞を共培養した系が用いられてきた。これまでに用いられてきた殆どの共培養系では、EC と SMC は多孔質膜で隔てて培養されている。しかし実際の血管では、EC と SMC は内弾性板の有窓構造を介して直接接しており、これまでの共培養系は生理的な血管構成細胞の状態を再現しているとは言えない。そこで我々は、SMC 上に直接 EC を重層播種した共培養系を作製し、LDL の取り込みに関する検討を行っている^(1,2)。

本研究では、細胞間の直接の接触を維持した EC-SMC の共培養系を効率的に作製するために、共培養系による LDL の取込みや細胞増殖の特性について検討を行った。

2. 試料および方法

2.1 細胞培養

ウシ大動脈より採取した内皮細胞 (EC) および平滑筋細胞 (SMC) を、ウシ胎仔血清 (20 % v/v)、ペニシリン (100 U/mL) およびストレプトマイシン (100 μ g/mL) を含むイスコフ改変ダルベッコ溶液 (IMDM) で継代培養して用いた。

2.2 共培養系の作製とアスコルビン酸濃度の影響の検討

SMC 上の EC の増殖におよぼすアスコルビン酸の影響を調べるために、様々な濃度のアスコルビン酸を含む培養液を用いて共培養系を作製した。直径 35 mm の培養皿に SMC を 5×10^4 /cm² の密度で播種して 5 日間培養した後、EC を 5×10^4 /cm² の密度で重層播種し、さらに 5 日間培養を続けた。それぞれの共培養系を、蛍光色素 DiI で標識したアセチル化 LDL (DiI-Ac-LDL, 5 μ g/mL) を含む培養液で 2

時間培養し、蛍光マイクロプレートリーダー (Fluoroskan ascent, Thermo Labsystems) を用いて共培養系に取り込まれた DiI-Ac-LDL の蛍光強度を測定した (励起波長 544 nm, 蛍光波長 590 nm)。

SMC のコラーゲン産生に対するアスコルビン酸の影響について検討するために、様々な濃度のアスコルビン酸を含む培養液で SMC を培養した。培養 6 日後に SMC を回収して超音波で破碎し、電気泳動用のサンプルを作製した。サンプルを電気泳動 (SDS-PAGE) した後、IV 型コラーゲンに対する抗体を用いて常法により⁽³⁾イムノブロットを行った。

2.3 共培養系による LDL の取り込み量の測定

直径 35 mm の培養皿に、前節と同様の方法で共培養系を作成した。培養には、アスコルビン酸を 50 μ g/mL 含む培養液を用いた。共培養系を DiI-LDL を含む培養液で一定時間培養した後、細胞を界面活性剤 (0.2 % Triton-X100) を含む PBS 2 mL で溶解した。細胞溶解液をホモジナイザーで破碎した後、遠心分離 (3000 rpm, 2 min)

Fig. 1. Immunoblot of type IV collagen produced by SMC. Representative result of 3 independent experiments is shown.

Fig. 2. Fluorescence intensity of the cells in cocultures incubated with DiI-Ac-LDL.

Fig. 3. Time course of DiI-LDL uptake by cocultures. Representative results of 3 independent experiments.

して上清を回収した。上清の蛋白量は市販のキット (BCA protein assay reagent, Pierce) を用いて測定した。上清の蛍光強度は蛍光分光光度計 (FP-750, 日本分光) を用いて測定した (励起波長514 nm, 蛍光波長550 nm)。蛍光強度はLDLの重量に換算し、単位蛋白量当たりのLDL取り込み量として表記した。

2.4 共培養系の組織切片の作製

共培養系の増殖特性を調べるために、共培養系の組織切片を作製して細胞層の厚みを測定した。底面が多孔質膜で構成されている直径30 mmの培養皿 (Millicell-CM, Millipore) にSMCを $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ の密度で播種して5日間培養した後、ECを $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ の密度で重層播種し、さらに17日間培養した。経日的に共培養系をパラホルムアルデヒド (4% in PBS) で固定してパラフィンに包埋し、組織切片を作製してヘマトキシリン-エオジンで染色した。切片は顕微鏡下で観察して写真撮影を行い、一つの標本につき無作為に約50箇所の厚みを測定して平均値を算出した。

3. 結果および考察

3.1 SMCのコラーゲン産生とECの接着に及ぼすアスコルビン酸の効果

Fig. 1 は、様々な濃度のアスコルビン酸を含む培養液でSMCを培養したときのIV型コラーゲンの産生量を、イミューノブロットで解析した結果を示したものである。この結果から、アスコルビン酸の濃度が高くなるほど、SMCによるコラーゲンの産生量が増大することがわかった。

Fig. 2 は、様々な濃度のアスコルビン酸を含む培養液で共培養系を作製し、DiI-Ac-LDLを取り込ませたときの蛍光強度を示している。DiI-Ac-LDLはECに特異的に取り込まれるため、この蛍光強度はSMC上に存在するECの細胞数を反映していると考えられる。アスコルビン酸の濃度が $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の時に比べ、 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の時は蛍光強度が増大していた。以上の結果は、アスコルビン酸の濃度が高いほどSMCのコラーゲン産生量が増大してECが接着しやすくなり、SMC上に被覆するECの数が増大することを示唆している。

3.2 共培養系によるLDLの取り込み

Fig. 3 は、異なる濃度のDiI-LDLを培養液中に添加したときの共培養系によるLDLの取り込み量を経時的に示した

Fig. 4. Thickness of cell layer in cocultures.

ものである。LDLの取り込み量は添加したLDLの濃度に応じて多くなる傾向が認められ、また、経時的に取り込み量が増大することがわかった。同様の傾向が、LDLと同じ直径の蛍光微粒子の取り込みにおいても認められた。以上の結果から、共培養系によるLDLの取り込み量を調べることで、培養液中のLDLの濃度を逆に推しはかることができるという可能性が示唆された。

3.3 共培養系における細胞層の厚みの経時変化

Fig. 4 は、SMCを播種してから5日後にECを重層播種し、さらに培養を続けたときの共培養系の細胞層の厚みの経時変化を示したものである。図の横軸は、ECを播種した時点を0日として表示している。細胞層の厚みは、12日後まで増加し、それ以降はほぼ一定の値になる傾向があることがわかった。

一般に、培養したSMCではECによる被覆の影響が見られず、重層しながら増殖を続けると考えられている。本研究結果からも、SMCが一定期間は増殖を続けることが確認された。このことから、本研究で紹介した共培養の作製方法では、培養期間を調節することによって一定の厚みのある共培養系を作製することが可能であることが明らかとなった。

4. 結論

本研究により、SMCにECを重層播種して共培養系を作製する場合、アスコルビン酸を添加することによりSMC上をECで完全に被覆したものを作製できることがわかった。また、この共培養系はSMCの培養期間を調節することで任意の厚みにすることができると、および共培養系によるLDLの取込みが培養液中のLDL濃度に応じて変化することが分かった。本研究で作製した共培養系は、実際の血管におけるLDLの取り込みや細胞の増殖能をin vitroで検討する際に有用な実験系であると考えられる。

5. 参考文献

- [1] 坂井滋郎, 丹羽光一, 狩野猛. 第14回バイオフロンティア講演論文集(No.03-19), 5-6, 2003.
- [2] Niwa, K., Kado, T., Sakai, J., Karino, T. Ann. Biomed. Eng. (In press)
- [3] Niwa, K. et al. Free Radic. Res. 35: 519-527, 2001.