341 低酸素による生体外 3 次元血管様ネットワーク構造の誘導

Hypoxia induces 3D micro-vessel formation *in vitro*.

○ 植田 晃然	(慶大理工院)	米山 育子	(慶大理工院)
正 須藤 亮	(慶大理工院)	池田 満里子	(慶大理工院)
小久保 謙一	(北里大医療衛生)	正 工藤 奨	(芝浦工大工)
小林 弘祐	(北里大医療衛生)	正 谷下 一夫	(慶大理工院)

Akinori UEDA, Keio University, 3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa

Ikuko YONEYAMA, Keio University

Ryo SUDO, Keio University

Mariko IKEDA, Keio University

Ken-ichi KOKUBO, Kitasato University, 1-15-1 Kitasato, Sagami-hara, Kanagawa

Susumu KUDO, Shibaura Institute of Technology, 3-9-14 Shibaura, Minato-ku, Tokyo

Hirotsuke KOBAYASHI, Kitasato University

Kazuo TANISHITA, Keio University

Key Words : Angiogenesis, Hypoxia, Network Formation

1. 緒 言

既存の血管から新しい血管が生じる現象である血管新生は、多くの生体の現象に関連しているため、従来から数多くの研究が行われてきた。Folkman ら⁽¹⁾が *in vitro* で毛細血管様構造を観察して以来、*in vitro* における内皮細胞の血管新生能を調べる研究では、マトリゲル上に細胞を播種するものや、コラーゲンゲルの層の間に細胞を培養するものなど様々なモデルが血管新生のメカニズムや血管新生促進因子・抑制因子の効果を調べるために用いられてきた。

血管の形成は、すべての組織の形成・機能維持に不可欠であり、再生医学の展開においても重要な課題である。3 次元的な臓器において、酸素や栄養分の輸送が拡散のみでは十分に行われず、組織内に血管ネットワークが 3 次元的に組み込まれることが望まれる。

しかしながら 3 次元的な *in vitro* ネットワークの制御因子の解明はほとんど行われていない。従来から低酸素状態が血管新生において重要な役割を果たしていることが知られてきたが、その詳細なメカニズムについては分かっておらず、そのメカニズムを解明することは血管新生の制御を考える上で不可欠である。そこで、本研究では、低酸素状態による内皮細胞への影響と、その結果として内皮細胞の 3 次元的なネットワーク形成能にどのような影響があるのかを調べることを目的として実験を行った。

2. 方 法

2.1 細胞培養

ウシ肺毛細血管内皮細胞を 10 %FBS, 1 %抗生物質, 15 mM HEPES を含んだ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) で培養した。

2.2 血管新生 3 次元モデルの作製

コラーゲンゲルは以下の方法で作製した。3 mg/ml Type I コラーゲン, 10 倍濃縮 Minimum Essential Medium (MEM), 再構成用緩衝液 (0.08 N NaOH + 20 mM HEPES) を 8:1:1 の割合で混合したものを、Cell Culture Insert に流し込み、37 °C で 30 分間ゲル化させた。その上に内皮細胞を播種した。

2.3 低酸素負荷実験

上記の Cell Culture Insert を血管壁細胞混合培養システム (ヤマト科学株式会社) に設置して、培養液中の溶存酸素濃度を 5% に設定して実験を行った。

播種 24 時間後に低酸素負荷を開始して、その後、7 日間負荷した。観察は位相差顕微鏡を用いて 24 時間ごとに行った。

2.4 共焦点レーザー顕微鏡による観察

形成されたネットワークの 3 次元的な形態を観察するために、7 日間低酸素/常酸素 (21% O₂) 下にて培養したネットワークの形態を Acridine Orange で染色して、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

2.5 増殖因子に対する反応性への影響

低酸素負荷による、内皮細胞の増殖因子に対する反応性への影響を調べるために、播種 24 時間後の細胞を 2 日間低酸素/常酸素下で培養した後、培養液に 30 ng/ml の bFGF を添加して、ネットワーク形成の状態を観察した。

2.6 Conditioned Medium (CM) への影響

低酸素負荷による、内皮細胞の分泌物への影響を調べるために、播種 24 時間後の細胞を 2 日間低酸素/常酸素下で培養した後、CM を採取した。採取した CM を別に用意したコラーゲンゲル上の内皮細胞に添加して、ネットワーク形成の状態を観察した。

3. 結果及び考察

3.1 低酸素によるネットワーク形成

低酸素下の細胞は、day 3 からゲル内への侵入を開始した。その後、ゲル内に侵入した細胞はネットワークを形成した。一方、常酸素下で培養した細胞のゲル内への侵入は少なく、ネットワークの形成も低酸素のものに比べて顕著に少なかった (Fig. 1)。

Fig. 1 Hypoxia induces network formation

ECs formed network in collagen gel. (A) On day 6 of hypoxia application, ECs invaded in underlying collagen gel and formed network. (B) ECs under normoxia condition, whereas, hardly formed network. Bar scale: 100 μ m.

3.2 ネットワークの3次元的形態観察

day 7 のネットワークを 1.8 μ m 刻みで深さ方向に観察したところ (Fig. 2), 細胞がゲル内に侵入して連続的な3次元のネットワークを形成していることが確認された。また、ネットワークを形成している細胞のうち、最も深い位置にある核の深さを計測したところ、低酸素で形成されたネットワークの方が常酸素のものに比べて、有意に深い位置まで侵入していることが分かった (Fig. 3)。

Fig. 2 3D morphology of formed network under hypoxia

Fig. 3 Effect of hypoxia on network depth

Data are mean $\pm$ S.E. * $P < 0.01$ vs. normoxia. $n = 30$.

3.3 増殖因子刺激に対する反応性への影響

2 日間低酸素を負荷した細胞は、30 ng/ml bFGF を添加したところ、常酸素下の細胞に比べて、有意に多くのネットワークを形成した (Fig. 4)。以上より、低酸素を負荷された細胞は増殖因子に対する反応性が高まっていることが分かる。

Fig. 4 Effect of hypoxia on sensibility of ECs to bFGF

Data are mean $\pm$ S.E. * $P < 0.01$ vs. normoxia. $n = 30$.

3.4 Conditioned Medium (CM) への影響

ゲル上に播種した細胞に 2 日間低酸素を負荷した細胞の CM を添加したところ、常酸素の CM を添加した細胞に比べて有意に多くのネットワークを形成した (Fig. 5)。このことから、低酸素下で培養された内皮細胞は、ネットワーク形成を促進する物質を分泌していることが分かった。

Fig. 5 Effect of hypoxia on secretion of ECs

Data are mean $\pm$ S.E. * $P < 0.01$ vs. normoxia. $n = 30$.

4. 結 言

内皮細胞に低酸素を負荷することで、生体外において、3 次元的なネットワークが誘導された。その原因としては、低酸素によって、内皮細胞の増殖因子に対する反応性が高まることや、内皮細胞がネットワーク誘導因子を分泌していることが考えられる。

文 献

- (1) Folkman J and Haudenschild C, Angiogenesis *in vitro*: *Nature* 288 (1980) 551-556