Arch Jpn Chir 61(2), 134～149, März, 1992

Extracellular Matrix と内皮細胞
—In vitro における血管新生のモデルを用いた検討—

京都大学脳神経外科学教室
（指導：菊池晴彦教授）
金　子　隆　昭

〔原稿受付：平成3年12月27日〕

Relationship between Endothelial Cells and Extracellular Matrix: Investigation Using the Model of Angiogenesis in Vitro

Takaaki Kaneko

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University

Using model of angiogenesis in vitro, the relationship between endothelial cells and extracellular matrix was studied.

Endothelial cells of bovine brain microvascular vessels (BBECs), carotid artery (BCECs) and aorta (BAECs) were cultured on type I collagen gel and Matrigel. BBECs make tubular structures and BCECs and BAECs grow and make confluent monolayer on type I collagen gel. BCECs and BAECs make tubular structures when second layer of collagen gel was overlaid. BBECs, BCECs and BAECs rapidly make tubular structures on Matrigel. These morphological changes were not affected by basic fibroblast growth factor.

The effect of extracellular matrices on the cell kinetics and morphology of cultured bovine carotid artery endothelial cells was studied. Endothelial cells show a cobble stone appearance on plastic and type I collagen gel. They proliferate and make capillary-like structures on reconstituted gels composed of type I collagen and basement membrane substrata. And that endothelial cells forming capillary-like structures were increased with the increase in the concentration of basement membrane substrata. Transmission electronmicroscopic examination study revealed endothelial cells forming capillary-like structures have junctional complexes on type I collagen and its mixture with basement membrane substrata. But endothelial cells on basement membrane substrata have no junctional complexes.

These results suggest that BBECs have more potent angiogenic ability than BCECs and BAECs. And that proliferation and morphogenesis of endothelial cells are regulated by extracellular matrices.

Key words: Extracellular matrix, Endothelial cell, Angiogenesis, Junctional complex.
索引語：細胞外基質，内皮細胞，血管新生，細胞間接着装置
Present address: Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

I. はじめに

血管新生は個体の発生や種々の病態下でみられるが，脳神経外科領域においてはとりわけ腫瘍の増殖に伴う腫瘍血管の発達，あるいは虚血病巣への側副血行路の形成などが重要である．血管新生のモデルとしては corneal micropocket assay 法など in vivo におけるアッセイ法が利用されてきた[1,8,25,26]．しかし，血管新生は内皮細胞の増殖，遊走，そして管腔形成という幾多の過程よりなるため，個々の過程を検討することも重要である．そのため，近年における細胞培養の技術を用いて，in vitro での血管新生のモデルが開発された[4,5,3,13]．これまでの報告から，培養系を用いた場合に血管新生は内皮細胞の管腔形成として表現され，①管腔形成は内皮細胞に固有の形態変化であり，平滑筋細胞や周細胞の存在を必要としない，②管腔形成の極初期は1個の内皮細胞中に生じた空胞より生じる，③管腔形成は微小血管由来の内皮細胞に限らず，臍帯静脈や大動脈など大血管由来の内皮細胞にも認められる，④線維芽細胞成長因子などの成長因子，あるいは phorbol ester などにより，促進される，⑤コラーゲンやラミニンなどの extracellular matrix の存在下で促進されることが明かとなっている[6,12,14,19,20,23]．本研究では，内皮細胞の局在による管腔形成能の違いを牛脳微小血管，頸動脈および大動脈由来の内皮細胞を用いて比較検討した．さらに，extracellular matrix が内皮細胞の増殖能と管腔形成能に及ぼす影響を牛頸動脈由来の内皮細胞を用いて検討した．

II. 材料と方法

1. 内皮細胞の培養

① 牛脳微小血管内皮細胞 (BBEC) の培養

BBEC は三井らの方法に従って得た[16]．即ち，内皮細胞を得る前に6穴の培養皿をI型コラーゲン（新田ゼラチン）でコーティングした．次いで，無菌的に牛脳白質を phosphate buffered saline (PBS)（日水）中で細切し，15 ml 容量の遠沈管に回収後，PBS で十分洗浄した．0.25%トリプシン (Difco Laboratories)/0.02%EDTA（ナカライテスク）/PBS を 10 ml 加え，室温で20～30分放置後，牛胎児血清 (FBS) を加えて暫く静置．上清を別の遠沈管に回収した．沈澱物に10%FBS, 200 U/ml のペニシリンG(明治製菓) および 200 μg/ml のストレプトマイシン（明治製菓）を加えた M199 (Flow Laboratories) を 10 ml 加え，ピペッティングを繰り返して組織片をもみほぐした．これを静置して上清を遠沈管に移すという操作を組織片がなくなるまで繰り返した．回収された培地を遠沈し，上清を捨てて沈澱物に培地 (10%FBS/M199) を加え，I型コラーゲンでコーティングした培養皿にまきこみ，37°C, 5%CO_2, 95%air の条件で6時間静置した．培地を捨てて，PBS で洗浄し，新しい培地を加えて培養した．培地は3日毎に交換した．内皮細胞のコロニーが出現し，5 mm 程度の大きさに成長したら，コロニーの周囲に存在する不要な細胞をラバーポリスマンおよびパスツールピペットの先端で剝ぎ落とし，PBS で十分洗浄した[15]．位相差顕微鏡でコロニーの周囲に不要な細胞がないことを確認した後，M199 を加えて1日培養し，コロニーをラバーポリスマンで剝ぎ，培地を回収して遠沈した．上清を捨てて0.25%トリプシン／0.02%EDTA/PBS で5分間処理した．培地を加えて遠沈後，得られた内皮細胞を培養皿に播種し，5%CO_2, 95%air で培養した．

② 牛頸動脈内皮細胞 (BCEC) の培養

BCEC はトリプシン処理により得た．即ち，血管の外膜をできるだけ剝離した後，血管の分枝を絹糸で結紮．血管の断端に三法活栓をつけた延長管を入れて固定した．血管内腔を PBS で十分洗浄した後，0.25%トリプシン/0.02%EDTA/PBS を満たし，20～30分間放置した．その後，10%FBS, 200 U/ml のペニシリンGおよび 200 μg/ml のストレプトマイシンを加えた Dulbecco's minimum essential medium (DME)（日水）でトリプシン液を洗いだし，遠沈管に回収して 1000 rpm で5分間遠沈した．得られた細胞を DME に巻き込んで6穴のディッシュに播種した．なお，ディッシュはあらかじめ清潔にしたカバーガラスの破片を敷き詰め，I型コラーゲンでコーティングしておいた．得られた細胞を位相差顕微鏡で観察し，細胞数が少ない時は同じ操作を繰り返した．37°C, 5%CO_2 95%air の条件下で培養し，3日毎に培地を交換した．内皮細胞のコロニーが出現してきた時点で，位相差顕微鏡下に内皮細胞のコロニーが1個だけ存在するガラス片を拾い上げ，I型コラーゲンをコーティングした24穴の培養皿に各々のウェルに1個ずつガラス片をのせた．この際，内皮細胞の存在する面を下にするように置き，ガラス片は1日後に取り除いた．

③ 牛大動脈内皮細胞 (BAEC) の培養

6穴の培養皿にガラス片を敷き詰め，I型コラーゲンでコーティングしておく．BAEC は剝離法で得た．

即ち，牛大動脈の外膜をできるだけ除去した後，縦に切り開いた．血管の内腔側をメスの刃で軽くこするようにして内皮細胞を剝離した．刃についた組織をPBS 中に洗い落とし，1000 rpm で5分間遠沈した．上清を捨てて0.25%トリプシン溶液を加えて15分間静置し，FBS を加えた．遠沈後，DME に巻き込み，あらかじめ用意した培養皿に播種し，37°C，5%CO_2，95%air で培養した．培地は3日毎に交換した．BCEC の場合と同様，1個の BAEC のコロニーを認めるガラス片のみを拾い上げ，24穴の培養皿に1個ずつガラス片を内皮細胞のある面が下になるようにして置いた．ガラス片は翌日除去した．

こうして得られた内皮細胞の同定は，アセチル化LDL の取り込みを確認することで行った[27]．

2. Extracellular matrix

I型コラーゲン (Vitrogen 100) (Collagen Corporation) と Matrigel (Collaborative Research) を用いた．

(A) 内皮細胞の局在による管腔形成能の検討

Vitrogen 100 と Matrigel を12穴の培養皿に加えてインキュベーター内でゲル化させた．BBEC，BCEC および BAEC をゲル化させた Vitrogen 100 と Matrigel 上にそれぞれ 1.0×10^2，1.0×10^3，5.0×10^3 および 1.0×10^4 個/cm^2 ずつ播種し，位相差顕微鏡で経時的に観察した．In vitro における血管新生を客観的に評価するため，経時的に写真を at random に5枚ずつ撮り，形成された管腔をトレーシングペーパーに写し取ってその長さを計測した[29]．

bFGF の管腔形成に及ぼす影響を検討するために BBEC, BCEC および BAEC を12穴の培養皿でゲル化させた Matrigel 上に 1.0×10^4 個/cm^2 ずつ播種した．bFGF（宝酒造株式会社，京都）の濃度が 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml となるように調整した無血清の培地を用いて BBEC, BCEC および BAEC を培養した．経時的に位相差顕微鏡下に写真を5枚ずつ撮り，管腔構造の長さを測定した．

(B) Extracellular matrix の BCEC の増殖と分化に及ぼす影響

Vitrogen 100 と Matrigel を用い，両者を混合して Vitrogen 100 : Matrigel＝4 : 1, 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4 の体積比となるように各種のゲルを作製した．これらのゲルを24穴の培養皿に加えてゲル化させ，BCEC を 1.0×10^4 個／ウェルずつ播種し，37°C，5%CO_2，95%air の条件下で培養し，位相差顕微鏡で経時的に観察した．5日後に BCEC をトリプシン及び Matrisorb (Collaborative Research) で回収し，細胞数を hemocytometer で数えた．

3. モノクローナル抗体 Ki-67 を用いた BCEC の成長解析[2,27]

Vitrogen 100 と Matrigel より再構成したゲルを tissue chamber slide (Lab-Tek) 上に加え，ゲル化させた．再構成したゲル及びプラスチックの上に BCEC を 1.0×10^4 個／ウェルずつ播種し，37°C，5%CO_2，95%air の条件下に48時間培養した．その後，PBS で洗浄し，冷アセトンで10分間固定．室温で乾燥させた後，PBS で洗浄した．免疫染色は ABC (Avidin-biotin complex) 法で行った．即ち，5%馬血清で20分間処理した後，PBS で3回洗浄後，200倍希釈したモノクローナル抗体 Ki-67 (Dakopatts) で2時間反応させた．PBS で洗浄し，50倍希釈したビオチン化した horse-anti-mouse IgG で1時間反応させ，更に PBS で洗浄し，100倍希釈した avidin DH and biotinylated horseradish peroxidase H complex (Vectastain ABC kit) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を1時間反応させた．以上の反応はいずれも室温で行った．発色は 0.01% H_2O_2 を加えた 0.5 mg/ml diaminobenzidine 溶液で約10分間行った．Hematoxylin で核染を行い，グリセリンで封入した後，顕微鏡で観察した．視野を at random に5ヵ所選び，写真を撮って Ki-67 陽性細胞の比率を計算した．

4. 電子顕微鏡による観察

(1) 走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察

試料を経時的に採取し，2.5%グルタールアルデヒド（0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液，pH 7.2）で1時間固定，0.1 M カコジル酸緩衝液で数回洗い，酸化オスミウムとタンニン酸で処理した後，エタノールのシリーズで脱水した．臨界点乾燥の後，金パラジウム蒸着して走査型電子顕微鏡 (Hitachi S-4000) で観察した．

(2) 透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察

培養皿から剝離した試料を PBS で洗浄し，水平ら[17,18,22] のマイクロウェーブ固定法で固定した．即ち，2%パラホルムアルデヒド／0.5%グルタールアルデヒド／0.1 M カコジル酸ソーダ緩衝液を加えてマイクロウェーブを照射した後30分室温で放置．0.1 M カコジル酸で洗浄し，1%オスミウム酸で1時間後固定した．エタノールのシリーズで脱水し，Epon に包埋した．超薄切片作製後，酢酸ウランと水酸化鉛で染色し，透過型電子顕微鏡 (JEOL 1200EX) で観察した．

Ⅲ. 結　　果

得られた BBEC, BCEC および BAEC はいずれもプラスチック上で典型的な敷石状配列を示し，アセチル化 LDL の取り込み能が陽性であった (Fig. 1, 2).

(A) 内皮細胞の局在による管腔形成能の検討

1) Ⅰ型コラーゲンゲル上での培養

BBEC をⅠ型コラーゲンゲル上に播種し，経時的に位相差顕微鏡で観察すると，1日以内に管腔構造を形成した．これは位相差顕微鏡で translucent な構造物として観察され，中空な構造であることがわかる (Fig. 3). 形成された管腔構造は2週間以上の長期間にわたって維持されていた．SEM で観察すると，内皮細胞はゲルの表面に管腔構造を形成しており，その表面にはコラーゲンの繊維が付着しているのがわかる (Fig. 4). 透過型電子顕微鏡で観察すると，内皮細胞

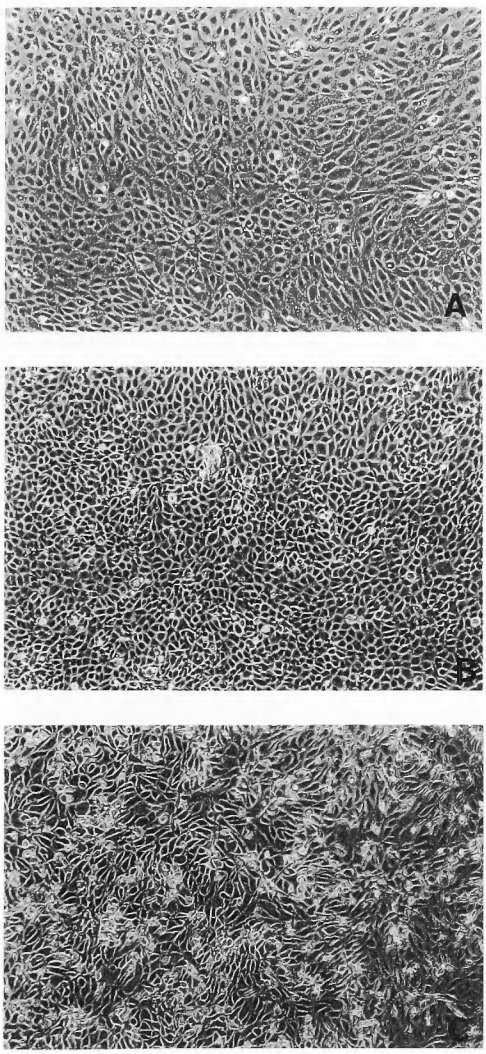

Fig. 1 Phase contrast micrograph of cultured BBECs (A), BCECs (B) and BAECs (C). ×150.

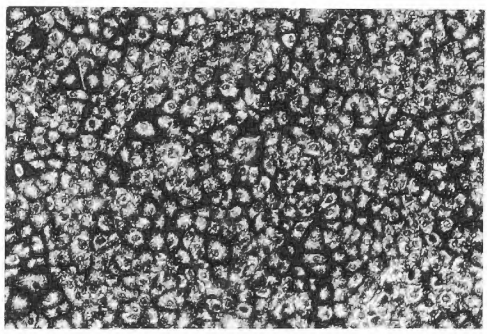

Fig. 2 Phase contrast micrograph of BBECs. They uptake acethylated LDL. ×150.

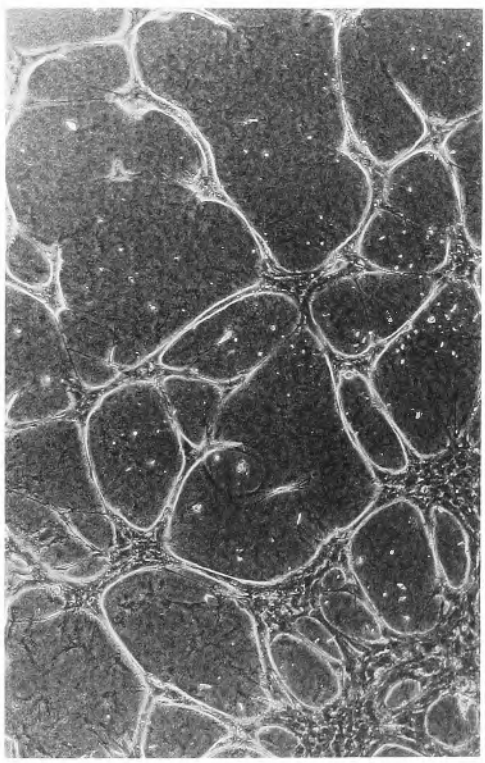

Fig. 3 Phase contrast micrograph of BBECs cultured on Vitrogen 100. ×200.

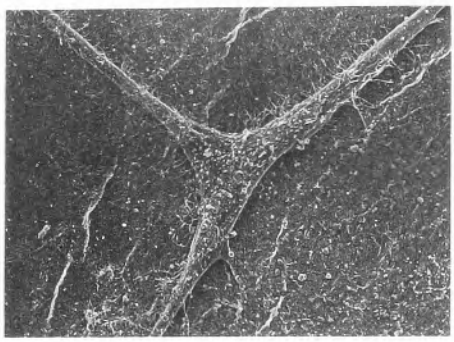

Fig. 4 Scanning electron micrograph of BBECs cultured on Vitrogen 100. ×600.

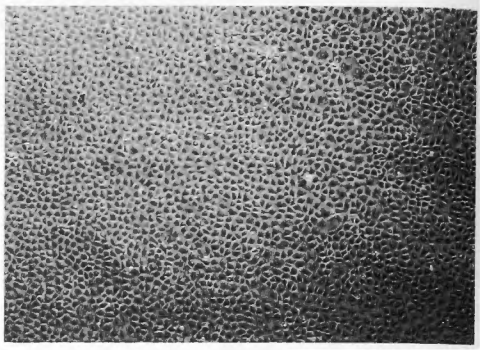

Fig. 6 Phase contrast micrograph of BCECs cultured on Vitrogen 100. ×100.

により囲まれた lumen を認めた．内皮細胞と内皮細胞の間には所々に junctional complex が形成されていた (Fig. 5).

BCEC および BAEC は，Ⅰ型コラーゲンゲル上に播種すると，管腔構造は形成せずに増殖して敷石状配列を呈した (Fig. 6). その上にさらにⅠ型コラーゲンゲルを重層すると，内皮細胞は管腔構造を形成した (Fig. 7).

2) Matrigel 上での培養

BBEC を matrigel 上に播種すると，1.0×10^2 個/cm^2 以上の内皮細胞を播種した場合に6時間後には内皮細胞が編目状の構造を形成し始め，12時間で完成した (Fig. 8). 管腔構造の長さを経時的に計測すると，12時間で完成した構造は24時間以上経過すると急速に退縮していくことがわかった (Table 1). SEM で観察すると，BBEC は播種して1時間後には遊走し始め，6時間でゲル上に多くの細胞からなる編目状の構造を形成する (Fig. 9). TEM で観察すると，内皮細胞に囲まれて lumen を認めた (Fig. 10). 内皮細胞で囲まれた lumen の内部には debris 様の物質もみられた．個々の

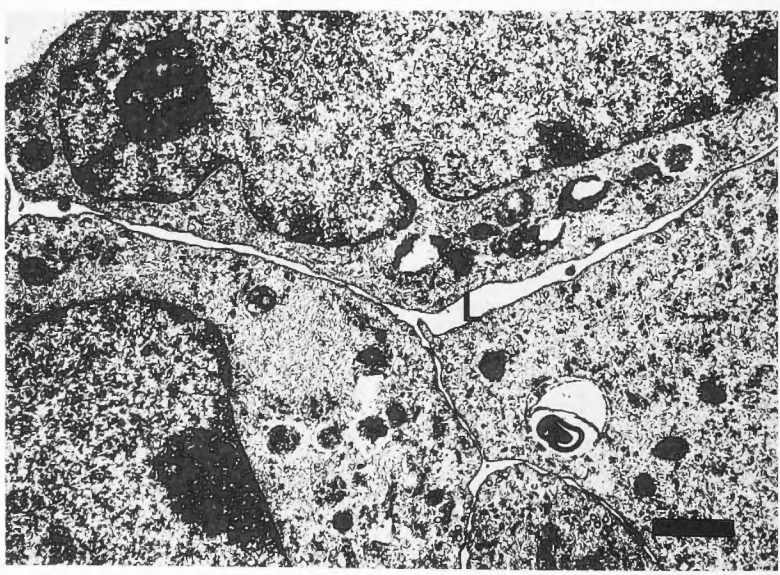

Fig. 5 Transmission electron micrograph of BBECs cultured on Vitrogen 100. Lumen-like structure surrounded by BBECs are seen (L). ×15,000, bar=1 μm.

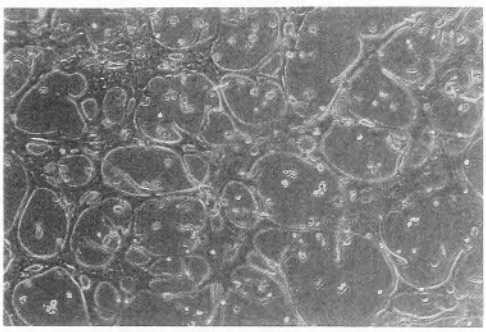

Fig. 7 Phase contrast micrograph of BCECs cultured on Vitrogen 100 and overlaid with second gel layer. ×150.

内皮細胞はリボソームやミトコンドリアなどの organella に富み，また多数の空胞を認めた．内皮細胞間には junctional complex を認めなかった (Fig. 11).

BCEC と BAEC も Matrigel 上では短時間のうちに管腔構造を形成した．しかし，これらの内皮細胞は 1.0×10^4 個/cm^2 以上播種した場合に管腔構造を形成し，それ以下の細胞を播種した場合には管腔を形成しなかった．

3) bFGF の形態変化に及ぼす影響

Table 1 に BBEC の Matrigel 上での形態変化に及ぼす bFGF の影響を示す．bFGF を 5〜20 ng/ml の濃度で用いた場合には形成される管腔の長さは bFGF を用いない場合と比較して，有意な差を認めなかった．

(B) Extracellular matrix の BCEC の増殖と分化に及ぼす影響

1) BCEC の形態と extracellular matrix

BCEC を Vitrogen 100 上に播種すると，多くのコロニーを形成し，1 週間から10日でほぼ confluence となった．

BCEC を Matrigel 上に播種すると，1 時間後には細長く伸展し始め，6 時間後には多くの内皮細胞からなる編目状の構造を形成した．この構造はほぼ12時間後には完成され，24時間後まで維持されたが，その後急速に退縮していった．

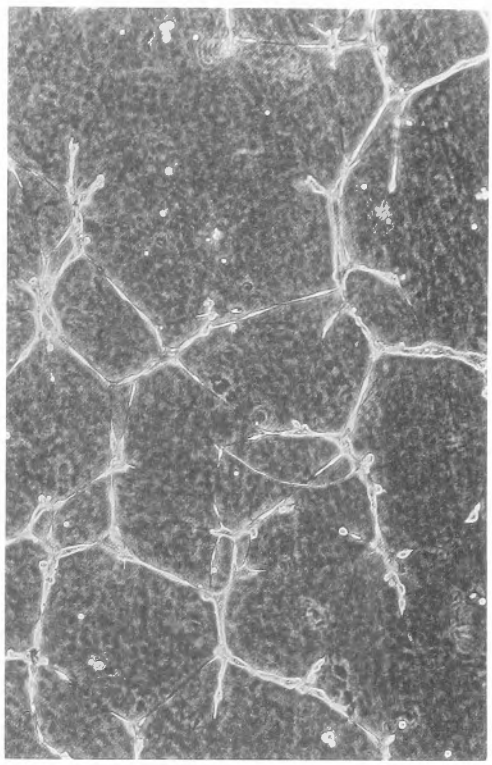

Fig. 8 Phase contrast micrograph of BBECs cultured on Matrigel. 12 hours after innoculation. ×100.

BCEC を Vitrogen 100 と Matrigel より再構成したゲル上に播種した場合には，敷石状配列を呈する部分と編目状の構造を呈する部分が認められた (Fig. 12). 敷石状配列を呈する内皮細胞数をC，編目状構造を呈する内皮細胞数をTとして，

Table 1 Length of tubular structures on Matrigel (mm/mm^2). BBECs are innoculated at the density of 1.0×10^4 cells/cm^2. Data are shown as mean±SD.

	6 (hrs)	12 (hrs)	24 (hrs)
bFGF (−)	0.90±0.15	1.79±0.19	1.49±0.21
bFGF (5 ng/ml)	0.82±0.23	1.88±0.27	1.61±0.31
bFGF (10 ng/ml)	0.70±0.25	1.94±0.20	1.51±0.18
bFGF (20 ng/ml)	0.97±0.42	2.01±0.51	1.53±0.29

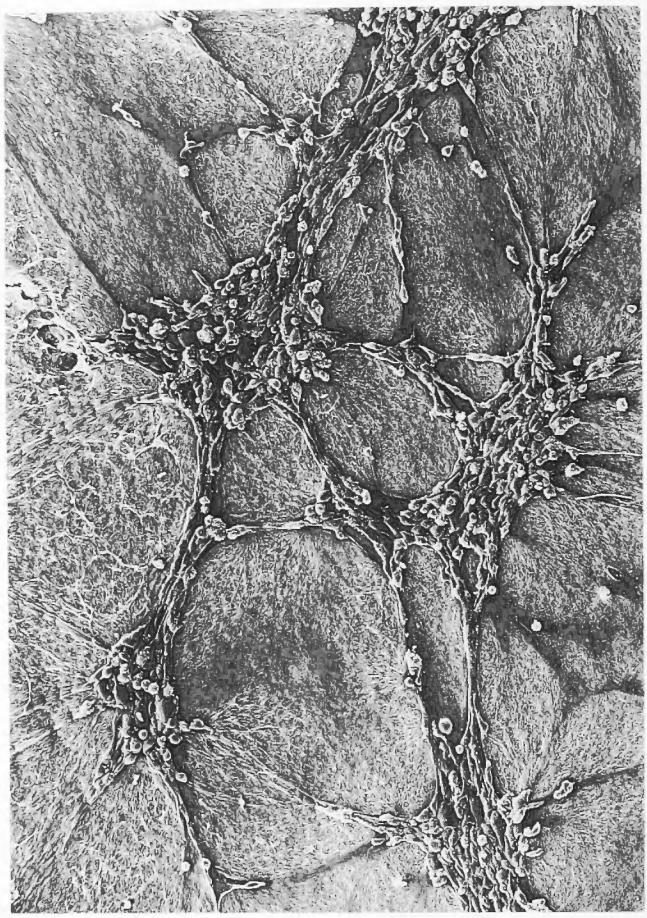

Fig. 9 Scanning electron micrograph of BBECs cultured on Matrigel. ×500.

$\frac{T}{C+T}$ を計算した (Table 2). 再構成したゲル中の Matrigel の比率が多くなるに従い，編目状構造を形成する内皮細胞の比率が多くなった．また，編目状の構造は Matrigel 上に形成された構造よりもはるかに長期間維持された．

2) ゲル上での BCEC の増殖能の検討

酵素処理により，ゲル上の BCEC を回収し，細胞数を調べた (Fig. 13). BCEC はプラスチック上で最も高い増殖能を示した ($p<0.05$). また，ゲル中の Matrigel の比率が高くなるにつれて BCEC の増殖能は低くなった．

3) Ki-67 を用いた BCEC の成長解析

Fig. 14 はモノクローナル抗体 Ki-67 で免疫染色した BCEC である．Ki-67 陽性の BCEC は，位相差顕微鏡で敷石状配列を示す部分に存在した．Ki-67 陽性率を Table 3 に示す．Ki-67 陽性率はプラスチック上で培養した場合に最も高かった ($p<0.01$). ゲル上で BCEC を培養した場合，Vitrogen 100 : Matrigel=2 : 1 の比率で再構成したゲルを用いた場合は Vitrogen 100 を単独で用いた場合よりも高い陽性率を示した．再構成したゲル中の Matrigel の比率が増すにつれて，Ki-67 陽性率は低下する傾向にあった．

4) TEM による観察

Matrigel 上に形成された編目状の構造物を TEM で観察すると，BCEC に囲まれた管腔構造が確認された (Fig. 15A). 個々の内皮細胞は多くの空胞を持ち，ミトコンドリアなどの organella がよく発達している．しかし内皮細胞間には接着装置を認めなかった (Fig. 15B). Vitrogen 100 と Matrigel からなるゲル上に形成

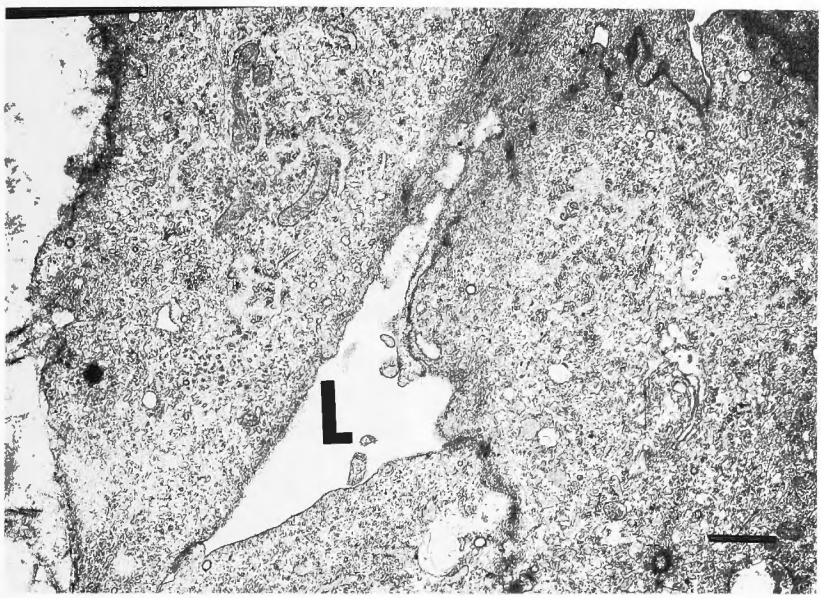

Fig. 10 Transmission electron micrograph of BBECs cultured on Matrigel. Lumen surrounded by BBECs are seen (L). ×6,000, bar=2 μm.

Fig. 11 Transmission electron micrograph of BBECs cultured on Matrigel. No junctional complex is seen between cell and cell. ×75,000, bar=0.3 μm.

された編目状の構造も TEM で観察すると，内皮細胞に囲まれた管腔構造が確認された．この場合には細胞間にはよく発達した接着装置を認め，Vitrogen 100 の比率が増すにつれてより著明となった (Fig. 15C, D, E).

Ⅳ．考　　案

内皮細胞は doubling time が 47–23000 日と極めて長

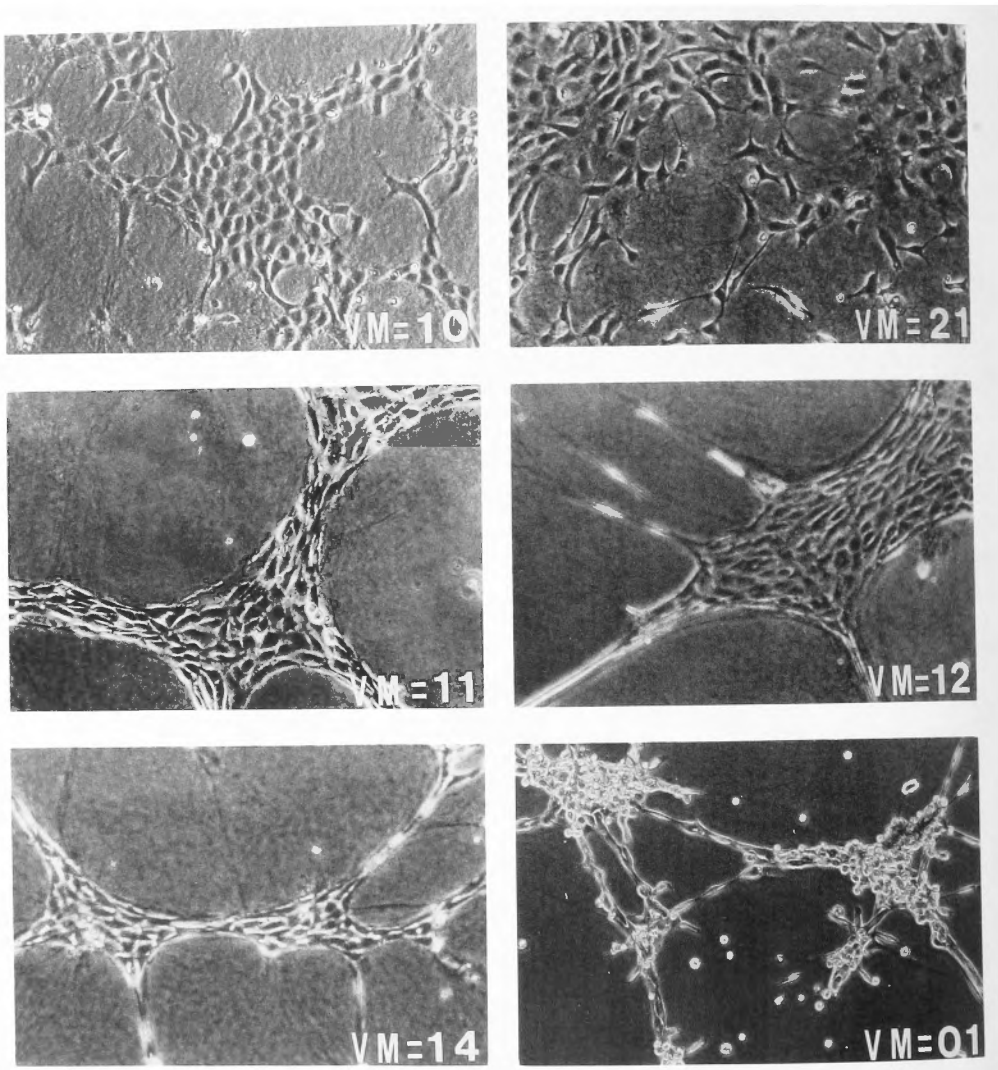

Fig. 12 Phase contrast micrograph of BBECs cultured on reconstituted gels composed of Vitrogen 100 and Matrigel. VM＝21 means that gel in composed of 2 volumes of Vitrogen 100 and one volume of Matrigel. ×100.

く，正常の個体ではほとんど休止期にある[9]．しかし，虚血性病変，あるいは腫瘍性病変が出現するとその極早期より新生血管を形成してくる．特に中枢神経系においては日常の臨床においても確認されている．これは，内皮細胞が本来，非常に活発な遊走能を持ち，angiogenic ability が強いことを意味する．今回の検討より，in vitro において牛脳微小血管内皮細胞をⅠ型コラーゲンゲル上で培養した場合，増殖せずに管腔構造を形成することが明らかになった．これはⅠ型コラーゲンゲル上では管腔構造を形成せずに増殖する頸動脈や大動脈など大血管由来の内皮細胞と比較して，脳微小血管内皮細胞の angiogenic ability がより強力であることを示唆するものと思われる．これまでの報告では，内皮細胞をコラーゲンゲル内で3次元培養した場合やゲルを内皮細胞の上に重層した場合に管腔構造を誘発することが明らかになっているが，コラーゲンゲルの上に播種しただけで直ちに管腔形成を起こしたという報告はない．ただ，コラーゲンゲルの上で con-

fluent となった内皮細胞に fibroblast growth factor あるいは phorbol ester を加えると管腔形成を引き起こしたとする報告があるが[19,21]，この場合には敷石状に配列した内皮細胞層の下，つまりゲル内に管腔が形成されており，今回のモデルとは異なるとおもわれる．今回の検討では頸動脈や大動脈由来の内皮細胞はゲルを重層することで管腔構造を誘導することができた．

Table 2 The ratio of BCECs forming capillary-like structures (mean±SD). The ratio is calculated as;
the number of BCECs in capillary-like structures/total BCECs. M=Matrigel, V=Vitrogen 100.

Matrigel	30.9±3.9 (%)
M : V=4 : 1	7.8±1.4 (%)
M : V=2 : 1	6.7±0.9 (%)
M : V=1 : 1	3.6±0.8 (%)
M : V=1 : 2	—
M : V=1 : 4	—
Vitrogen	—

基底膜の構成成分からなる Matrigel を用いた場合には過去の報告と同様，極めて早期に内皮細胞の形態変化を引き起こした[12]．しかもこの場合，形態変化を誘導するためには播種する内皮細胞の密度が重要であることが今回の検討から明らかになった．即ち，脳微小血管の内皮細胞は大血管の内皮細胞に比べて1%以下の少ない細胞数で形態変化を起こす この事実もまた脳微小血管内皮細胞が大血管の内皮細胞より angiogenic ability が強いことを示唆するものと思われる．Kubota ら[12] は Matrigel 上に形成される管腔構造は抗ラミニン抗体で強く抑制され，抗Ⅳ型コラーゲン

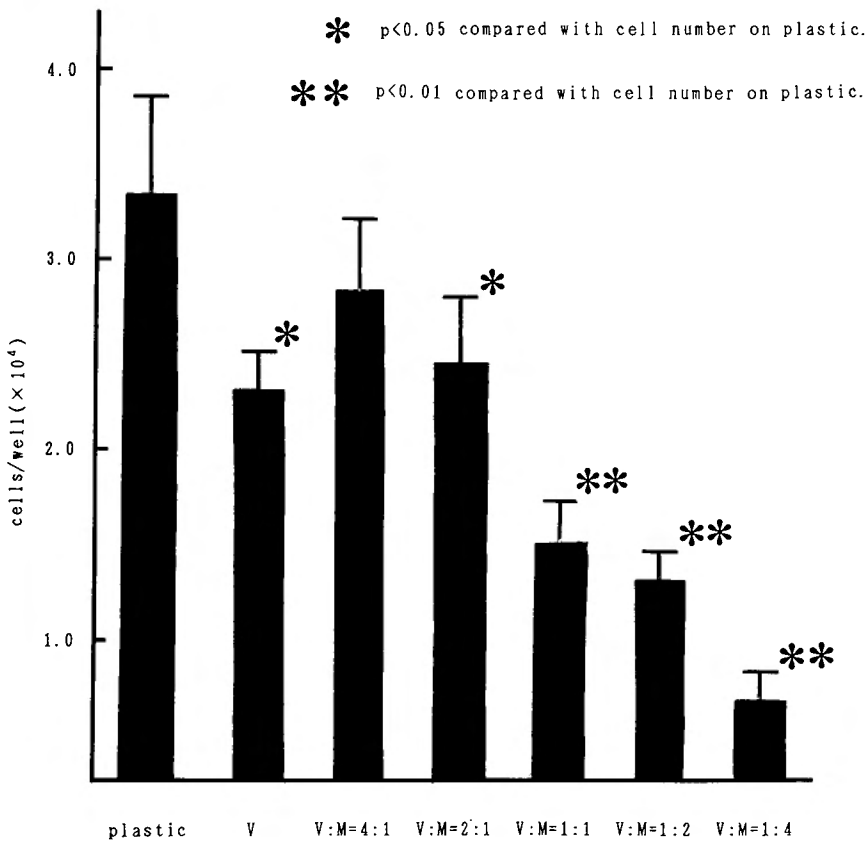

Fig. 13 Effect of substrata on proliferation of BCECs. Proliferation rate is decreased with the decrease in the percentage of Matrigel. The highest proliferation rate was obtained when BCECs were cvltured on plastic. V=Vitrogen

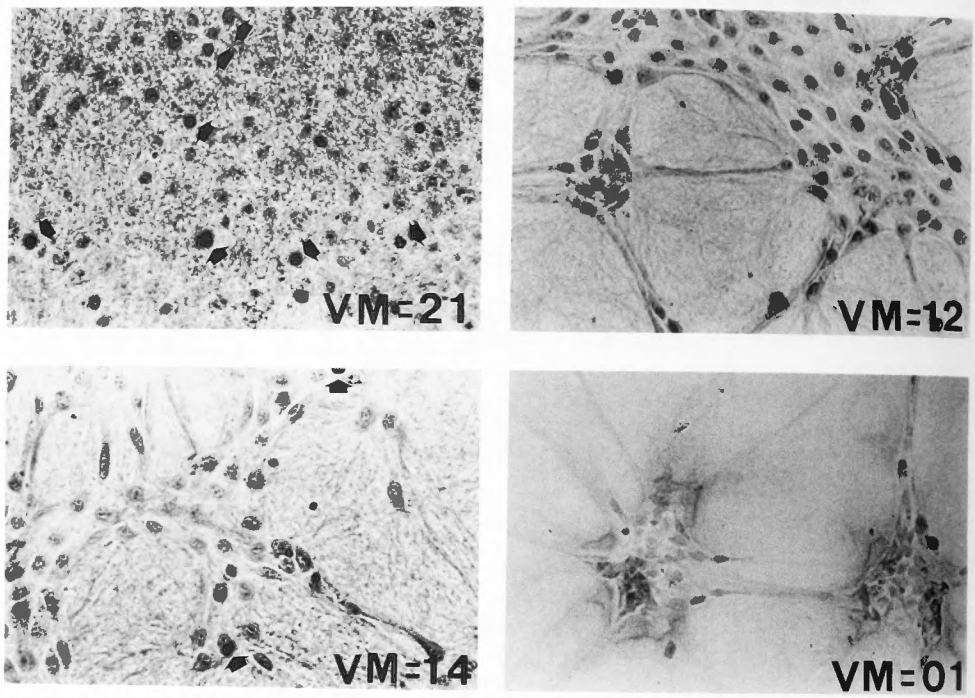

Fig. 14 Photomicrograph of BCECs cultured on reconstituted gels composed of Vitrogen 100 and Matrigel. BCECs are immunostatined with Ki-67 monoclonal antibody. Arrows indicate Ki-67 positive cells. V=Vitrogen 100 and M=Matrigel. VM=21 means that gel is composed of 2 volumes of Vitrogen 100 and one volume of Matrigel. ×100.

Table 3 Ki-67 positivity of BCECs on the reconstituted gels (mean±SD). Ki-67 positivity is gradually decreased with the increase in the percentage of Matrigel. M=Matrigel, V=Vitrogen 100.

gel	Ki-67 positibity (%)
Matrigel	0.78±0.02
M : V=4 : 1	3.2±0.5
M : V=2 : 1	6.4±0.2
M : V=1 : 1	9.8±1.3
M : V=1 : 2	11.0±1.5
M : V=1 : 4	9.4±0.6
Vitrogen	9.1±1.0
Plastic	19.0±1.7

抗体では僅かに抑制されたと報告している．また Grant ら[7] はラミニンが内皮細胞の管腔形成を惹起すると報告しており，ラミーンが内皮細胞の管腔形成に関与している可能性が強い．しかし我々の検討ではラミーン単独，あるいはラミーンとⅠ型コラーゲンゲルから再構成したゲル上では管腔形成が起きなかった．Kubota ら[12] もラミニンは管腔形成を起こさなかったと報告しており，今後の検討を要する．Montesano ら[21] はⅠ型コラーゲンゲル上で培養した内皮細胞に bFGF を加えると管腔形成が促進されると報告している．今回の検討から内皮細胞を Matrigel 上で培養した場合には内皮細胞の形態変化は内皮細胞の局在に関わらず，bFGF の影響を受けないことがわかった．これは内皮細胞の形態変化は extracellular matrix により調節されており，それ以外の液性因子は内皮細胞の形態変化を修飾しているためであろうと考えられる．

Vitrogen 100（Ⅰ型コラーゲン）と Matrigel（基底膜成分）より再構成したゲルを用いた今回の検討から，頸動脈由来内皮細胞の増殖と分化はこの両者により強く影響を受けることが明かとなった．牛頸動脈内皮細胞を Matrigel 上で培養すると短期間の内に管腔構造を形成した．しかし，Matrigel 上に形成される管腔構造は長期間維持されず，短期間で退縮してしまう．こ

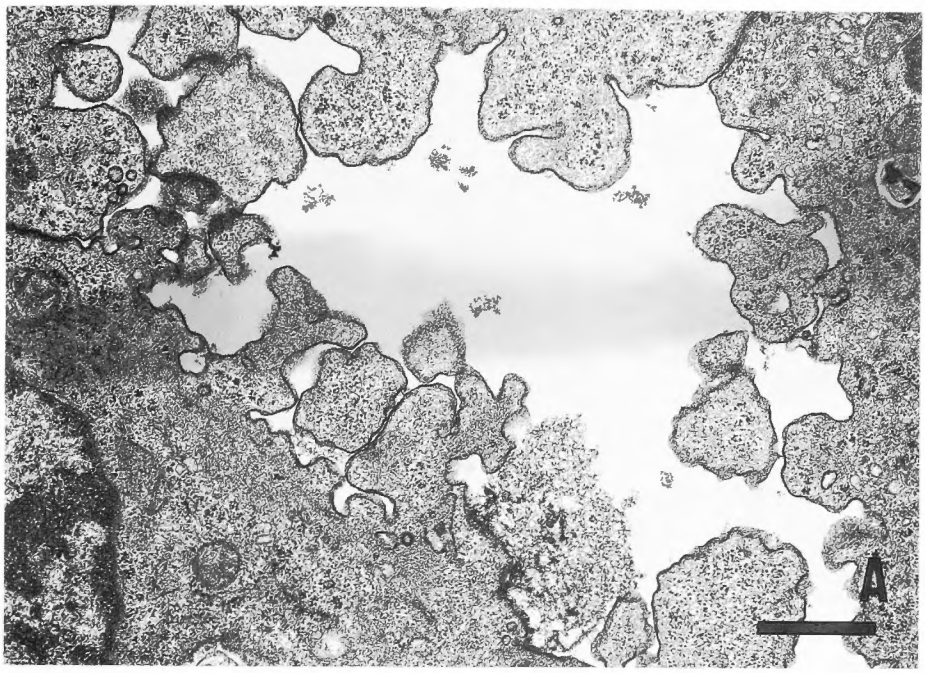

Fig. 15(1)

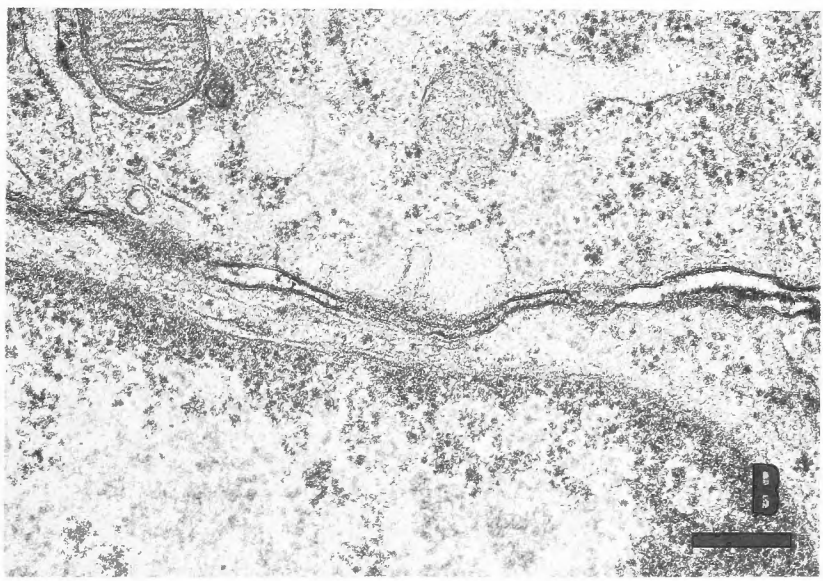

Fig. 15(2)

のように Matrigel 上に形成された管腔構造が長期間維持されない理由として，これらの構造を形成する内皮細胞間に電顕的に観察した場合，junctional complex が認められないということが考えられる．しかし Kubota らの報告[12] では，Matrigel 上に形成された管腔構造が 2 週間以上の長期にわたり維持されたとして

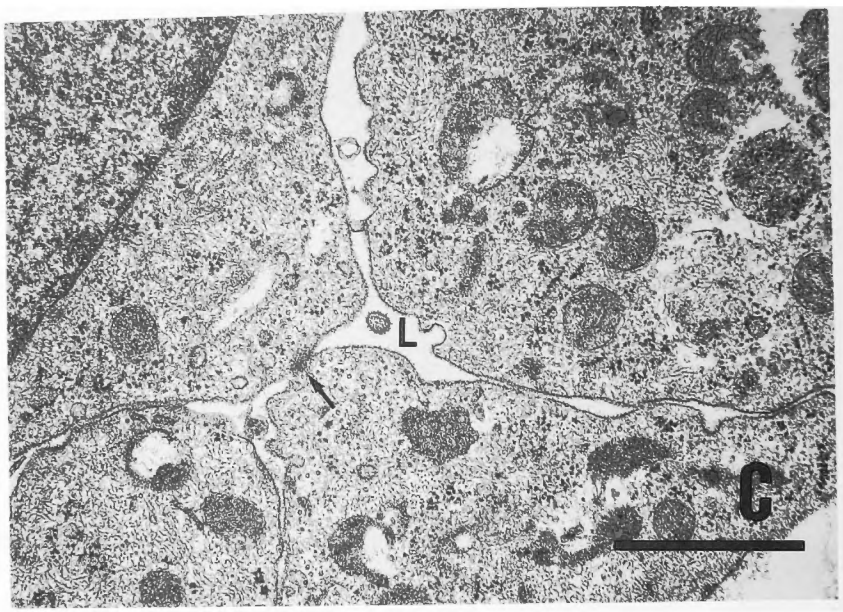

Fig. 15(3)

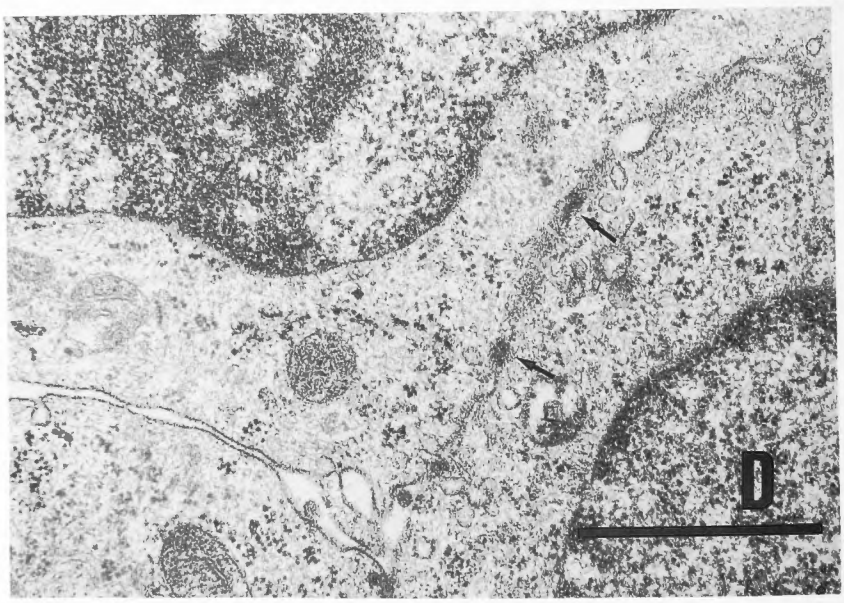

Fig. 15(4)

おり，今回得られた結果と異なる．この相違が内皮細胞の種あるいは局在の違い，あるいは培養条件の違いによるものかどうかは不明である．

Matrigel と Vitrogen 100 から再構成したゲル上に内皮細胞を培養すると，短期間内に Matrigel 上に形成されたものと同様の構造が形成され，培養液さえかえれば長期間維持されることがわかった．しかもその構造は再構成したゲル内の Matrigel の比率が増すにつ

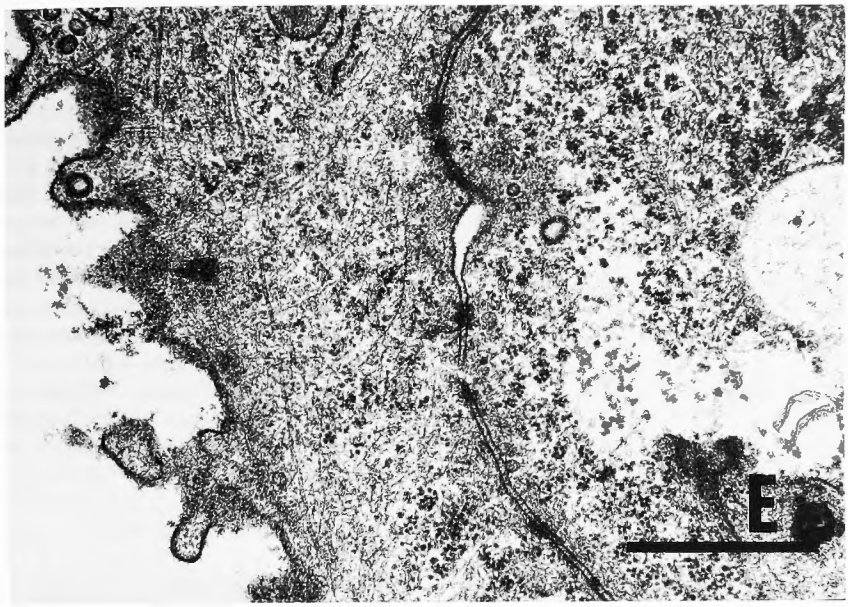

Fig. 15(5)

Fig. 15 Transmission electron micrograph of BCECs cultured on reconstituted gels composed of Vitrogen 100 and Matrigel. (A) BCECs on Matrigel. Lumen surrounded by BCECs are seen. ×33,000, bar=1 μm. (B) BCECs on matrigel. No junctional complex is seen. ×75,000, bar=0.3 μm. (C) BCECs on reconstituted gel composed of (1 volume of Vitrogen 100) and (4 volumes of Matrigel). Lumen is seen (L). Desmosome is seen (arrow). ×4,000, bar=10 μm. (D) BCECs on reconstituted gel composed of (1 volume of Vitrogen 100) and (2 volumes of Matrigel). Desmosomes are seen (arrow). ×5,000, bar=10 μm. (E) BCECs on Vitrogen 100. Many desmosomes are seen between cell and cell. ×4,000, bar=10 μm.

れて著明になった．電顕的に観察すると，これらの構造を形成する内皮細胞間には junctional complex が発達していた．以上の結果より，基底膜成分を主体としたゲルは内皮細胞の分化を促進し，形成された管腔構造の形態維持には junctionla complex の形成が必要であること，そしてそれはⅠ型コラーゲンゲルにより誘導されることが明かとなった．

一方，内皮細胞の増殖についてみると，Matrigel 上では内皮細胞は増殖しなかった．Schelling ら[24] はウシ心臓の venule から得られた内皮細胞を用いた検討から，Matrigel 上で培養した場合には collagen や fibronectin などよりも高い増殖能を得られたと報告しているが，Kubota ら[12] はヒト臍帯静脈の内皮細胞を fibronectin と Matrigel の上で培養した場合に，Matrigel 上では内皮細胞が増殖しなかったと報告しており，我々の報告と一致している．今回の検討では Vitrogen 100 を単独で用いた場合よりも Vitrogen 100 : Matrigel＝4 : 1 あるいは 2 : 1 の比率で再構成したゲル上で高い増殖能を示す傾向にあった．この結果は，モノクローナル抗体 Ki-67 を用いた BCEC の成長解析でも Ki-67 陽性率は Vitrogen 100 を単独で用いた場合よりもむしろ Vitrogen 100 : Matrigel＝4 : 1 あるいは 2 : 1 で再構成したゲルを用いた場合の方が高い傾向を示すという結果とも一致する．また，モノクローナル抗体 Ki-67 を用いた検討では形態変化を起こした内皮細胞は Ki-67 が陰性であった．これは tritiated-thymidine を用いた Ingber らの検討[10]，及び Iruela-Arispe らの検討[11] の結果と一致する．

Angiogenesis は内皮細胞の増殖，遊走，そして形態変化と多くの過程より成る dynamic な現象であり，多くの因子が関与しているため，それを客観的に評価することは困難であった．しかし，in vitro で angiogenesis が検討できるようになり，今後さらに angiogenesis のメカニズムは明かにされるものと思わ

れる．これまで神経系においては angiogenesis は現象として知られているもののあまり検討されていなかった．今後，中枢神経疾患と angiogenesis との関連性についても基礎的な検討が必要であると思われる．

V．結　　語

1) 牛脳微小血管由来の内皮細胞は頸動脈や大動脈などの大血管由来の内皮細胞よりも管腔形成能が強い．このことは内皮細胞の局在により，血管新生能が異なることを示唆する．

2) 牛頸動脈の内皮細胞を用いた検討から基底膜成分は内皮細胞の分化を促進し，I型コラーゲンゲルは内皮細胞の増殖を促進することが明かとなった．

3) 内皮細胞により形成された管腔構造の維持には電顕的に junctional complex の形成が必要であり，それはI型コラーゲンにより誘導された．

稿を終えるに当り，本研究について多大な御指導を頂きました京都大学医学部脳神経外科　菊池晴彦教授，京都大学生体医療工学研究センター長　筏　義人教授に深甚なる謝意を捧げます．また，本研究の実施にあたり惜しみなく御協力を頂いた京都大学生体医療工学研究センター　藤里俊哉先生，京都大学脳神経外科　宮本　享先生，久保洋昭先生，塩野義製薬研究所神埼川分室　長谷川博司先生，能登谷満先生に心からお礼申し上げます．最後に本研究について大切な御助言を幾度も頂いた小倉記念病院脳神経外科　永田　泉部長，国立循環器病センター電子顕微鏡室　高市成子先生，塩野義製薬研究所神埼川分室　水平敏知先生に深甚なる謝意を捧げます．

引 用 文 献

1) Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, et al: Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. J. Clin. Invest. **84**: 1470–1478, 1989.
2) Falini, B., Elenghi, L., Fagioli, M., et al.. Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody. J. Histochem. Cytochem., **37**: 1471–1478, 1989.
3) Feder, J., Marasa, J.C., and Olander J.V.: The formation of capillary-like tubes by calf aortic endothelial cells grown in vitro. J. Cell. Physiol., **116**: 1–6, 1983.
4) Folkman, J., Haudenschild, C.: Angiogenes in vitro. Nature, **288**: 551–556, 1980.
5) Folkman, J.: Angiogenesis: initiation and control. Ann. N.Y. Acad. Sci., **145**: 212–227, 1983.
6) Folkman, J.: What is the role of endothelial cells in angiogenesis? Lab. Invest., **51**: 601–604, 1984.
7) Grant DS, Tashiro K, Segui-Real B, et al: Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. Cell **58**: 933–943, 1989.
8) Hayker A, Culler FL, Beattie GM, et al: An in vivo model for study of the angiogenic effects of basic fibroblast growth factor. Biochem. Biophys. Res. Commun. **147**: 876–880, 1987.
9) Hobson B, Denekamp J: Endothelial proliferation in tumours and normal tissue: continued labeling studies. Br. J. Cancer **49**: 405–413, 1984.
10) 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.
11) Iruela-Arispe ML, Hasselaar P, Sage H: Differential expression of extracellular proteins is correlated with angiogenesis in vitro. Lab. Invest. **64**: 174–186, 1991.
12) Kubota, Y., Kleinman, H.K., Martin, G.R. 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.
13) Maciag, T., Kadish, J., Wilkins, L. et al.: Organizational behavior of human umbilical vein endothelial cells. J. Cell Biol., **94**: 511–520, 1982.
14) Madri, J.A., Pratt, B.M.: Endothelial cell-matrix interactions: in vitro models of angiogenesis. J. Histochem. Cytochem., **34**: 85–91, 1986.
15) Minakawa T: Long-term culture of microvascular endothelial cells derived from mongolian gerbil brain. Stroke **20**: 947–951, 1989.
16) 三井洋司，今村　享：機能細胞の分離と培養．丸善，東京，225–240, 1987.
17) Mizuhira, V., Notoya, M., and Hasegawa, H.: New tissue fixation method for cytochemistry using microwave irradiation. I. General remarks. Acta Histochem. Cytochem., **23**: 501–523, 1990.
18) 水平敏知，長谷川博司，能登谷満：マイクロウェーブ固定法．生体の科学，**42**: 148–159, 1991.
19) Montesano R, Orci L: Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis in vitro. Cell **42**: 469–477, 1985.
20) Montesano R: Cell-extracellular matrix interactions in morphogenesis: an in vitro approach. Experientia, **42**: 977–985, 1986.

.) Montesano R, Vassali JD, Baird A, et al: Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 7297–7301, 1986.

!) Notoya, M., Hasegawa, H., and Mizuhira, V.: New tissue fixation method for cytochemistry using microwave irradiation. II. Details. Acta Histochem. Cytochem., **23**: 525–536, 1990.

3) Olander, J.V., Bremer, M.E., Marasa, J.C., et al: Fibrin-enhanced endothelial cell organization. J. Cell. Physiol., **125**: 1–9, 1985.

ł) Schelling, M.E., Meininger, C.J., Hawker, J.R. et al.: Venular endothelial cells from bovine heart. Am. J. Physiol., **254**: H1211–H1217, 1988.

5) Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R: Transforming growth factor-α: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. Science **232**: 1250–12532, 1986.

26) Shing Y, Folkman J, Haundenschild C, et al: Angiogenesis is stimulated by a tumor derived endothelial cell growth factor. J. Cell Biochem. **29**: 275–287, 1985.

27) 白石哲也，田渕和雄，国塩勝三，他：単クローン抗体 Ki-67 が認識する抗原について．脳腫瘍病理，**6**: 149–156, 1989.

28) Voyta, J.C., Via, D.P., Butterfield, C.E. et al.. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. J. Cell Biol., **99**: 2034–2040, 1984.

29) Yasunaga C, Nakashima Y, Sueishi K: A role of fibrinolytic activity in angiogenesis. Quantitative assay using in vitro method. Lab. Invest. **61**: 698–704, 1989.