

In vitro の血管新生に及ぼす Nicardipine の効果

*京都大学脳神経外科, **京都大学生体医療工学研究センター

金子 隆昭*, 永田 泉*, 菊池 晴彦*, 宮本 享*
久保 洋昭*, 藤里 俊哉**, 筏 義人**

〔原稿受付：平成3年12月27日〕

The Effect of Nicardipine on Angiogenesis in vitro

TAKA AKI KANEKO

TAKA AKI KANEKO*, IZUMI NAGATA*, HARUHIKO KIKUCHI*, SUSUMU MIYAMOTO*,
HIROAKI KUBO*, TOSHIYA FUJISATO**, YOSHITO IKADA**

* Department of Neurosurgery and ** Research Center for Biomedical Engineering,
Kyoto University, Kyoto, Japan

We studied the effect of nicardipine, a calcium channel blocker, on the morphological change of endothelial cells in vitro. Cultured endothelial cells derived from bovine carotid artery make tubular structures between collagen gel layers. Tube formation of endothelial cells was suppressed by culture with 10^{-9} – 10^{-5} M of nicardipine in a dose dependent manner. Migration of endothelial cells was also suppressed by the same dose of nicardipine. However, proliferation of endothelial cells was not enhanced. These findings suggest that nicardipine acts as an inhibitor of angiogenesis in vitro by inhibiting the migration of endothelial cells.

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、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臨床的には重要である。しかし、血管新生は内皮細胞の増殖、遊走、そして血管新生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はこれまで困難であった。近年における細胞培養の技術の進歩により、in vitro での血管新生のモデルが開発され、多くの angiogenic factor が検討されてきた^{3,11-13,15-19,23,25}。一方、血管新

生の抑制因子についてもこれまで in vivo あるいは in vitro のモデルを用いて検討されてきたが^{2,6-9,14,24,26}、培養系を用いた報告はこれまでのところ見あたらない。

今回、培養内皮細胞を用いて血管新生（内皮細胞の管腔形成）に及ぼすカルシウム拮抗剤、ニカルジピン[®]の効果について検討した。

II. 材料と方法

1. 内皮細胞の培養

牛の頸動脈の内皮細胞 (BCEC) はトリプシン処理に

Key words: Endothelial cell, Angiogenesis, Ca^{2+} antagonist, Culture

索引語：内皮細胞、血管新生、 Ca^{2+} 、培養

Present address: Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

より得た¹⁰⁾。まず、血管の分枝を網糸で結紮後、血管の断端に延長管を入れて固定した。血管内腔を phosphate-buffered saline (PBS) (日水、東京) で十分洗浄した後、0.25%トリプシンを満たし、20分間放置。その後、10%の牛胎児血清 (FBS) を加えた Dulbecco's minimum essential medium (DME) (日水) でトリプシン液を洗いだし、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細かく砕い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。37°C, 5%CO₂, 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、以後継代培養した。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。

2. 血管新生のモデル

In vitro での血管新生のモデルは、Kanayasu らの方法に従って行った¹¹⁾。即ち、Vitrogen 100 (Collagen Corporation), 0.1N NaOH/HEPES buffer と10倍に濃

縮した minimal essential medium (日水、東京) をそれぞれ 8:1:1 の比率で混合し、12穴の培養皿に加えて 37°C でゲル化させた。その上に BCEC を 1.5×10^5 個/ウェルずつ播種し、1 ml の DME を加えて24時間培養した。それから、培地を捨て、その上に Vitrogen 100 を 1 ml 加えてゲル化させた。更に、10%の FBS を含んだ DME でニカルジピン (山之内製薬、東京) を希釈し、1 ml ずつゲルの上に加えた。培地は2〜3日に1度交換した。内皮細胞の形態は位相差顕微鏡

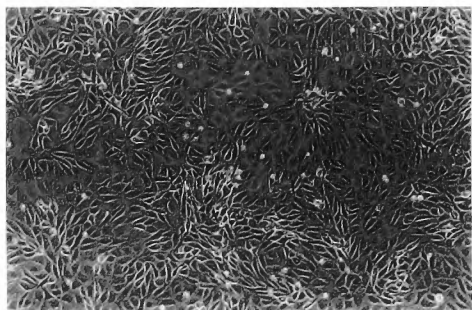


Fig. 1 Phase contrast micrograph of BCECs. $\times 200$.

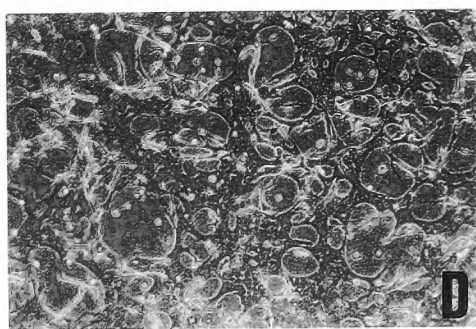
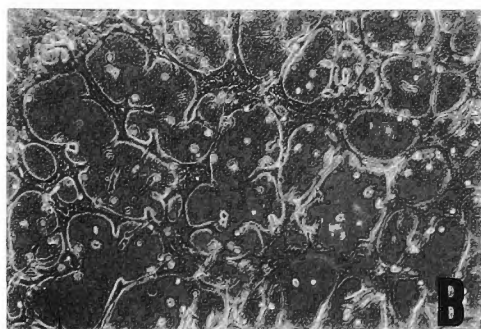
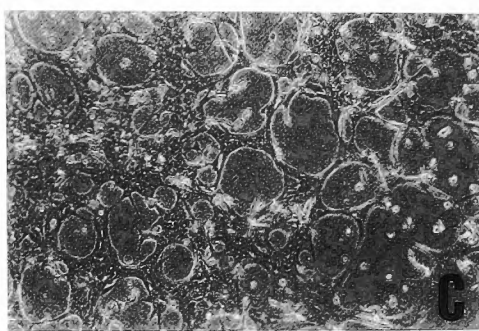
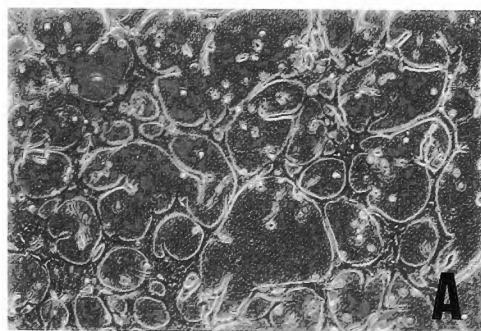


Fig. 2 Phase contrast micrographs of BCECs cultured between collagen gel layers at 5 days of culture. (A) control. (B), (C) and (D) are BCECs cultured with 1.0×10^{-7} M of nicardipine, 1.0×10^{-6} M of nicardipine and 1.0×10^{-5} M of nicardipine, respectively. $\times 200$.

でモニターし, at random に5枚の写真を撮った. 形成された管腔構造をトレーシングペーパーに写し取り, その長さをイメージアナライザーで測定した.

3. 透過型電子顕微鏡による観察

培養皿から剝離した試料を PBS で洗浄し, 2%パラホルムアルデヒド, 0.5%グルタルアルデヒド, 0.1 M カコジル酸ソーダ緩衝液を加えて1時間固定し, 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.

4. ニカルジピンの BCEC の増殖に及ぼす効果

BCEC を24穴の培養皿に播種し, 0.5%の FBS を含んだ DME でニカルジピンを希釈した. この培地で BCEC を7日間培養し, 0.25%のトリプシンで細胞を剥し, ヘモサイトメーターで細胞数を計測した.

5. ニカルジピンの BCEC の遊走に及ぼす効果

BCEC の遊走はこれまでの報告に従って行った^{4,11)}. 即ち, Blind well chamber (Neuroprobe) の下室に10%の FBS を加えた DME で希釈されたニカルジピンを満たし, 8.0 μ m の孔径の chemotaxis membrane (Nucleopore) で覆う. 上室には BCEC を 1.0×10^4 個

／ウェルずつ播種し, 10%の FBS を加えた DME で3時間培養した. それから membrane を取り除き, 上面の細胞を拭き取り, 90%のエタノールで固定後, ヘマトキシリンで染色した. Membrane の下面にある細胞数を計測した.

III. 結 果

BCEC は, プラスチックの培養皿上では典型的な敷石状配列を呈した (Fig. 1).

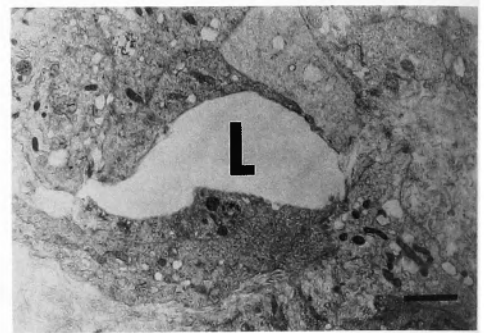


Fig. 3 Transmission electron micrograph of tubular structure. L is a lumen surrounded by BCECs. $\times 3,500$, Bar = 4 μ m.

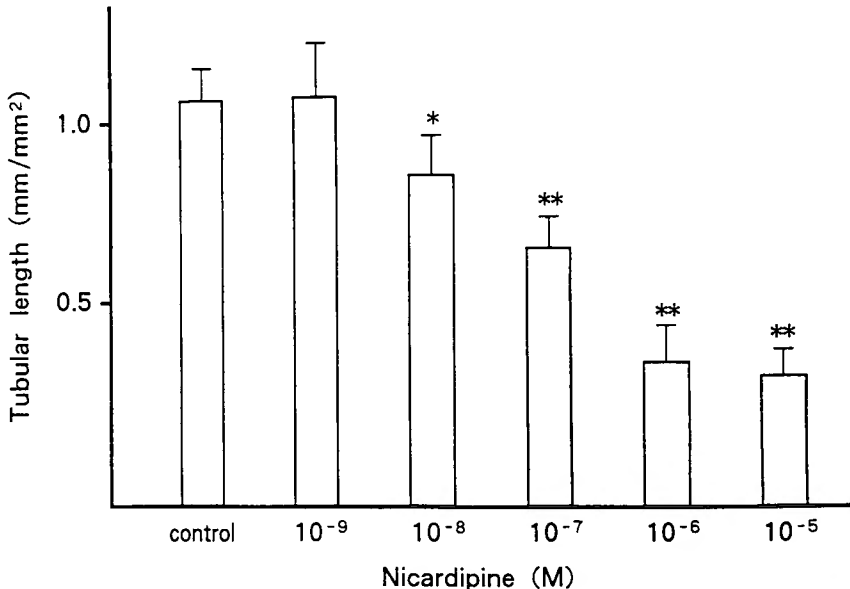


Fig. 4 Effect of nicardipine on tube formation of BCECs. Values are mean $\pm$ SE. * $p < 0.05$ (vs. control), ** $p < 0.01$ (vs. control).

Fig. 2 はコラーゲンゲルの2層間で5日間培養した CEC である。コラーゲンゲル上に培養した BCEC に更にゲルを重層すると、BCEC は管腔構造を形成し始め、次第に成長していった (Fig. 2A)。Fig. 2 に 10^{-7} – 10^{-5} M のニカルジピンを加えた場合の CEC による管腔形成を比較したものである。 10^{-7} M のニカルジピンを加えた場合、BCEC は管腔構造を形成してくるが、対照に比べて管腔構造を形成していない内皮細胞も多く認められる (Fig. 2B)。しかし、ニカルジピンの濃度が増加するにつれて管腔形成は明かに抑制された (Fig. 2C, D)。

Fig. 3 は透過型電子顕微鏡で観察した管腔構造を示すが、内皮細胞で囲まれた内腔を認めた。

培養10日目における管腔構造の長さを計測し、Fig. 4 に示した。ニカルジピンを加えない対照群における管腔構造の長さは 1.07 ± 0.09 mm/mm² であった。ニカルジピンを 10^{-9} M 加えた群では管腔構造は 0.99 ± 0.16 mm/mm² であり、ニカルジピンの濃度を

10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M と増やすにつれて管腔の長さはそれぞれ 0.90 ± 0.11 , 0.65 ± 0.09 , 0.39 ± 0.10 , 0.36 ± 0.07 mm/mm² と減少した。

ニカルジピンの BCEC の増殖に及ぼす効果について検討したが、ニカルジピンは 10^{-9} – 10^{-5} M の範囲では BCEC の増殖に明かな影響を与えなかった。

ニカルジピンの BCEC の遊走能に及ぼす影響についてみると、Fig. 5 に示すとおり、 10^{-7} M 以上の濃度では濃度依存性に BCEC の遊走は抑制された。

IV. 考 察

血管新生は内皮細胞の増殖、遊走および形態変化よりなる一連の連続した過程である。近年、培養技術の進歩により、これらの過程を個々別々に検討することが可能となった³⁾。血管新生における多くの過程の中で、内皮細胞の形態変化、即ち管腔形成は内皮細胞のみに認められる変化であり、しかも in vitro で再現した場合には管腔の長さを画像解析で客観的に評価できるため、これまで多くの血管新生因子の検討に利用されてきた。

これまでの報告から、培養系では細胞外基質が内皮細胞の管腔形成に重要な働きを有することが明らかになっている^{12,15)}。内皮細胞を I 型コラーゲンゲルの層の間に培養した場合、あるいはコラーゲンゲルを用いて3次元培養した場合には内皮細胞は活発に管腔構造を形成する。今回の検討からも、牛頸動脈の内皮細胞は I 型コラーゲンゲルの2層間で管腔を形成した。

細胞外基質以外にも多くの血管新生因子が検討されている^{11,13,16–19,23,25)}。中でも線維芽細胞成長因子は血管新生におけるすべての過程を促進することが明らかとなっており、現在では最も強力な血管新生因子と考えられている^{5,17)}。

それに対して、血管新生を抑制する因子はこれまでうさぎの角膜を用いたアッセイ法や漿尿膜法により検討されているが培養系を用いたアッセイは、報告されていない^{2,6–9,14,24,26)}。ある種のステロイド (angiostatic steroids) はヘパリンの存在下に血管新生を抑制することが報告されている^{2,7,26)}。Angiostatic steroids が血管新生を抑制するメカニズムは不明であるが、Ingbar らはステロイドが新生血管の基底膜を障害すると報告している⁷⁾。D-ペニシラミンやメソトレキセートは in vivo で血管新生を抑制するが、in vitro では内皮細胞の増殖を抑制する効果があり、in vivo における効果は内皮細胞の増殖抑制によるものと考えられる^{6,14)}。

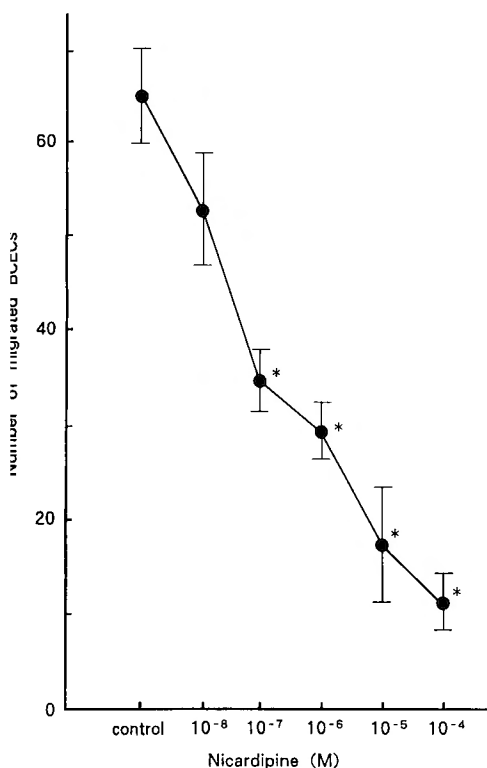


Fig. 5 Effect of nicardipine on migration of BCECs. Values are mean $\pm$ SE.

* $p < 0.01$ (vs. control).

ブレオマイシンも漿尿膜アッセイ法で血管新生を抑制するが、この効果も内皮細胞の増殖抑制によるものと思われる²²⁾。

今回の検討から、カルシウム拮抗剤の一種であるニカルジピンは、内皮細胞の増殖には影響せずに遊走を抑制することにより培養内皮細胞の管腔形成を抑制することがわかった。カルシウム拮抗剤の培養内皮細胞や培養平滑筋細胞、とくに培養内皮細胞に対する効果はこれまでのところそれほど詳細には検討されていない^{20,21)}。Nakao らはニカルジピンが培養平滑筋細胞の遊走を抑制すると報告している²⁰⁾。また、ニフェジピンが培養平滑筋細胞の増殖を抑制するという報告もある²¹⁾。これらの効果は粥状硬化を抑制するものである。最近、粥腫内における血管新生の促進が粥状硬化の形成に重要な役割を有しているとの報告もあり⁹⁾、ニカルジピンは粥腫内の血管新生を調節することにより、粥状硬化を抑制しているという可能性も考えられる。しかし、今回得られた結果は *in vitro* におけるものであり、これがそのまま *in vivo* でもいえるかどうかは今後の課題であるが、内皮細胞の形態変化においてもカルシウムチャンネルが関与している可能性があり、今後 *in vivo* においても検討していく必要がある。

V. 文 献

- 1) Barger AC, Beeuwkes RIII, Lainey LL, et al: Hypothesis: Vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. *N. Eng. J. Med.* **310**: 175-177, 1984.
- 2) Crum R, Szabo S, Folkman J: A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. *Science* **230**: 1375-1378, 1985.
- 3) Folkman, J., Haudenschild, C.: Angiogenesis in vitro. *Nature*, **288**: 551-556, 1980.
- 4) Glaser BM, D'Amore PA, Seppa H, et al: Adult tissues contain chemoattractants for vascular endothelial cells. *Nature* **288**: 483-484, 1980.
- 5) Gospodarowicz D: Expression and control of vascular endothelial cells: Proliferation and differentiation by fibroblast growth factor. *J. Invest. Dermatol.* **93**: 39S-47S, 1989.
- 6) Hirata S, Matsubara T, Saura R, et al: Inhibition of *in vitro* vascular endothelial cell proliferation and *in vivo* neovascularization by low-dose methotrexate. *Arthritis and Rheumatism*. **32**: 1065-1073, 1989.
- 7) Ingbar DE, Madri JA, Folkman J: A possible mechanism for inhibition of angiogenesis by angiostatic steroids: Induction of capillary basement membrane dissolution. *Endocrinology* **119**: 1768-1775, 1986.
- 8) Ingbar D, Folkman J: Inhibition of angiogenesis through modulation of collagen metabolism. *Lab. Invest.* **59**: 44-51, 1988.
- 9) Ingbar D, Fujita T, Kishimoto S, et al: Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* **348**: 555-557, 1990.
- 10) Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* **52**: 2745-2756, 1973.
- 11) Kanayasu T, Nakao-Hayashi J, Asuwa N, et al: Leukotriene C₄ stimulates angiogenesis in bovine carotid artery endothelial cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**: 572-578, 1989.
- 12) Madri JA, Williams SK, Wyatt T, et al: Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. *J. Cell Biol.* **97**: 153-165, 1983.
- 13) Madri JA, Pratt BM, Tucker AM: Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor- β depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **106**: 1375-1384, 1988.
- 14) Matsuda T, Saura R, Hirohata K, et al: Inhibition of human endothelial cell proliferation in vitro and neovascularization in vivo by D-penicillamine. *J. Clin. Invest.* **83**: 158-167, 1989.
- 15) Montesano R, Orci L, Vassalli P: In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J. Cell Biol.* **97**: 1648-1652, 1983.
- 16) Montesano R, Orci L: Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis in vitro. *Cell* **42**: 469-477, 1985.
- 17) Montesano R, Vassalli JD, Baird A, et al: Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 7297-7301, 1986.
- 18) Montesano R, Orci L: Phorbol esters induce angiogenesis in vitro from large-vessel endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* **130**: 284-291, 1987.
- 19) Montesano R, Pepper MS, Belin D, et al: Induction of angiogenesis in vitro by banadate, an inhibitor of phosphotyrosine phosphatase. *J. Cell. Physiol.* **134**: 460-466, 1988.
- 20) Nakao J, Ito H, Ohyama T, et al: Calcium dependency of aortic smooth muscle cell migration induced by 12-L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetra-

- enoic acid; Effect of A23187, nicardipine and trifluoperazine. *Atherosclerosis* **46**: 309-319, 1983.
- 21) Nilsson J, Sjolund M, Palmberg L, et al: The calcium antagonist nifedipine inhibits arterial smooth muscle cell proliferation. *Atherosclerosis* **58**: 109-122, 1985.
- 22) Oikawa T, Hirotani K, Ogasawara H, et al: Inhibition of angiogenesis by bleomycin and its copper complex. *Chem. Pharm. Bull.* **38**: 1790-1792, 1990.
- 23) Sato N, Fukuda K, Nariuchi H, et al: Tumor necrosis factor inhibiting angiogenesis in vitro. *JNCI* **79**: 1383-1391, 1987.
- 24) Sidky YA, Borden EC: Inhibition of angiogenesis by interferons: Effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses. *Cancer Res.* **47**: 5155-5161, 1987.
- 25) Yasunaga C, Nakashima Y, Sueishi K, et al: A role of fibrinolytic activity in angiogenesis. Quantitative assay using in vitro method. *Lab. Invest.* **61**: 698-704, 1989.
- 26) Ziche M, Ruggiero M, Pasquali F, et al: Effects of cortisone with and without heparin on angiogenesis induced by prostaglandin E1 and by S180 cells, and on growth of murine transplantable tumours. *Int. J. Cancer* **35**: 549-552, 1985.