

培養グリオーマ細胞の移動動態の観察
血管内皮細胞株との共培養下でみられた
リアルタイム・ダイナミクス

稲永親憲

新潟大学大学院医歯学総合研究科

脳研究所 病理学分野

(主任：高橋 均)

Cellular Dynamics of Glioma Cell Migration
in Co-culture System with Endothelial Cells

Chikanori INENAGA

Department of Pathology, Brain Research Institute,

Graduate School of Medical and Dental Science,

Niigata University

(Director: Prof. Hitoshi TAKAHASHI)

要 旨

グリオーマ細胞 (GC) の遊走が血管内皮細胞 (EC) の存在によってどのような影響を受けるのかを知る目的で、両細胞株を共培養し、GCの動態をリアルタイムで長時間観察した。まずGC株 (ラット C6) に GFP-レトロウイルスを感染させ、蛍光シグナルを安定かつ強発現する細胞をクローニングした。これを EC 株 (ラット大脳由来) と共培養し、その動きを Time-lapse 顕微鏡でデジタルイメージとして 2-5 時間記録した。EC を単層培養し、その後 GC を追加すると、定着後の GC は様々な形態を示し、多数の突起を持つものや紡錘形単極あるいは双極性のものが観察された。GC の移動には基本的に 3 種類のパターンが認められた。単一の先導突起を収縮することにより胞体を素早く移動させるパターン、先導突起の長さを変えることなく胞体と突起が同期して移動するパターンと、突起は動かすものの核が殆ど動かないパターンである。これらの移動動態は、発生期終脳におけるグリア芽細胞が示すそれと類似していた。EC 上での GC の動きの特徴を明らかにする目的で、異なる細胞種であるラット線維芽細胞

Reprint requests to: Chikanori INENAGA
Department of Pathology
Brain Research Institute
Niigata University
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先：〒951-8585 新潟市旭町通り 1-757
新潟大学脳研究所病理学分野 稲永親憲

(NIH3T3) 上での GC の動きと比較したところ、2 時間での GC の平均移動距離は EC 上で $19.8 \mu\text{m}$ 、3T3 上で $32.8 \mu\text{m}$ であり、有意差をもって EC 上の方が動きに乏しかった。この差には両細胞株から放出された液性因子は関与しておらず、細胞膜における GC と EC の親和性が関わっていると考えられた。次に、matrigel を薄くコーティングしたシャーレに EC を播き、その後、GC の培養上清のみを添加すると毛細血管様のネットワークが形成された。このことから、GC から出された何らかの液性因子が、EC の管腔形成の促進に関与している可能性が考えられた。ネットワーク形成状態で GC を加えると、それらは紡錘形を示しつつネットワークに沿って移動した。指向性は示さず、交差あるいは途中で逆行する場合もあった。また著しく速く ($56 \mu\text{m}/\text{h}$) 移動する細胞の存在が初めて観察された。このように GC が脳内で浸潤する際の移動動態は一樣ではなく、それらは、増生した EC が作る管腔に沿って積極的に移動し得るものと考えられた。本研究結果は、ヒト脳におけるグリオーマ細胞の浸潤メカニズムを知る上で極めて重要と考えられた。

キーワード: グリオーマ細胞, 血管内皮細胞, 共培養, 移動動態, Time-lapse 顕微鏡

序 文

グリオーマの治療を困難なものにしている一因として、境界不明瞭な発育、すなわち single cell レベルでの周囲脳実質への腫瘍細胞浸潤があげられる。

剖検症例を観察していても、いくつかの腫瘍細胞が、腫瘍塊から離れて神経線維や血管に沿って、遠方まで移動したと見なせることがしばしばある。

これまでも、in vitro や in vivo でグリオーマの浸潤能についてのいろいろな観点からの報告はいくつか認められ^{1)–5)}、主に様々な物質や遺伝子の影響が検討されているが、実際のリアルタイムの動きを観察した報告は殆ど認められない。いったい実際にグリオーマ細胞たちはどのような移動形態をとっているのだろうか？

今回、GFP-レトロウィルスを使用し、蛍光顕微鏡下で光毒性を最小限に抑えながら生細胞を観察する方法を用いることにより、グリオーマ細胞のリアルタイムな動きを観察することを可能とした。そして、その遊走が血管内皮細胞の存在によってどのような影響を受けるのかを調べる目的で、血管内皮細胞との共培養下における培養グリオーマ細胞のリアルタイムな動きを観察した。

材料と方法

グリオーマ細胞

グリオーマ細胞株として、ラット C6 を用いた。この細胞株は、Wistar 系ラットから N-nitrosomethylurea により誘発されたグリオーマで、これまでも様々な実験モデルに幅広く用いられている株である^{1)–3)6)7)}。

培養は 60 or 100 mm plastic dish 上で Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 添加 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 292 mg/L L-Glutamine, 1% Antibiotic-Antimycotic (penicillin G + streptomycin + amphotericin B) (以上すべて Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) 培地を用い、通常条件 (5% CO₂, 37 °C) でおこなった。細胞の継代は、細胞が dish 上で confluent (増殖が飽和に達した状態) に達した時点で PBS 洗浄し、37 °C の 0.05% Trypsin-ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) で数分処理し、同量以上の培地を加えた後、1500 rpm で 5 分間遠心して細胞を回収するという方法でおこなった。今回の実験で用いた他の細胞も同じ条件で培養、継代した。

C6 にレトロウィルスを用いて GFP 遺伝子を導入することにより、永続的に安定した蛍光シグナルを発現するようにした。GFP-レトロウィルスは Kakita ら⁸⁾⁹⁾ が作成したものを、その力価

は約 5×10^5 cfu/ml である。これを培地に加えることにより C6 に感染させ、その中から強い蛍光シグナルを発現している細胞をクローニングし、最終的にすべての細胞が安定かつ強い蛍光シグナルを発現する株を得た。感染前後の細胞で差がないことを、形態、継代後に confluent に達するまでの期間、glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:200, poly, DAKO) および vimentin (1:100, mono, DAKO) に対する免疫組織学的染色態度をみることにより検定した。

血管内皮細胞 (EC)

Niida ら⁷⁾ により分離、培養された株を用いた。詳細は原著に譲るが、要約すると、「Fisher 344 ラットの全脳からクモ膜を除いたものをホモジナイズし、ホモジネートをまず孔径 $300 \mu\text{m}$ 、次いで $150 \mu\text{m}$ のナイロンメッシュに通して後者のメッシュ上に残った微小血管を type I collagenase で処理し、培養する。コロニーを形成したものをクローニングした後、継代維持し、10-20 代の細胞を使用する。」となる。

譲渡されたこの細胞を、poly-L-lysine (SIGMA) でコートされた plastic dish 上で、前述の DMEM 培地を用い、通常条件 (5% CO₂, 37°C) で培養した。

これら細胞が、血管内皮細胞の性格を有していることを確認するために、継代後 2 日目の sub-confluent な細胞に、DiI-Ac-LDL (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA, USA) を $10 \mu\text{g/ml}$ 濃度で使用培地に溶かして加え、overnight 後にその取り込みを判定した。また、第 VIII 因子 (1:250, poly) に対する免疫組織学的染色もおこなった。

血管内皮細胞単層培養上でのグリオーマ細胞の動き

60 mm plastic dish に、約 1×10^6 個の EC を撒き、24-48 時間後にほぼ confluent になったことを確認して、これに約 9×10^4 個の C6 を加えた。2-4 時間後に Time Lapse 顕微鏡システムを用いて 3 分ごとに 2 時間の観察をおこなった。C6 の

細胞形態をリアルタイムに観察すると共に、得られたデジタルデータから C6 の移動距離を測定した。

EC 上での動きの特徴を明らかにする目的で、EC のかわりに異なる細胞種である NIH3T3 (ラット由来 fibroblast) 株を用いて同様の実験をおこない、両者を比較した。

さらに、EC と 3T3 から分泌される何らかの液性因子が C6 の移動速度に影響を与えるかどうかを調べるために、C6 を加える直前に両者の培地を交換して同様の実験をおこなったが、明らかな影響は認められなかった。

毛細血管様ネットワーク上でのグリオーマ細胞の動き

35mm glass bottom dish (Hole 14mm: Matsunami glass Ind., LTD., JPN) の hole 部を氷上で、 $50 \mu\text{l}$ の BD Matrigel Matrix (Becton Dickinson Lab. Bedford, MA, USA) にて薄くコーティングし、37°C で 30 分ゲル化させる。Matrigel は、Engelbreth-Holm-Swarm マウス肉腫から抽出した、ラミニン、コラーゲン IV、エンタクチン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの複合体であり、再構成基底膜として利用されている。ここに DMEM 培地と C6 の培養上清を 1:2 の割合で入れ、約 1×10^5 個の EC を中央に集まるように静かに加えると、4-8 時間後に毛細血管様のネットワークが形成される。

EC は標識していないものと、PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit (SIGMA) により直前に標識したものを、各々を用いて実験をおこなった。

ネットワークを形成した状態で、約 3×10^4 個の C6 を加え、その 2-4 時間後に Time Lapse 顕微鏡システムを用いて 1-3 分間隔で 1-4 時間観察した。観察中の保温は、11mm の穴をあけた Thermo Plate (MATS-55R30, Tokai Hit, JPN) を 42°C 設定で蓋を外した dish 上に乗せることによりおこなった。同条件の予備実験では 36-37°C の底面温が得られている。CO₂ は、room air の条件としたが、あらかじめ培地の pH が 7.2-7.4 となるように低めに調整しておくことにより観察中の pH 上昇に対処した。得られたデジタル

データを Movie としても保存し、毛細血管様ネットワーク上でのグリオーマ細胞の動きを解析した。

Time Lapse 顕微鏡

Time Lapse 顕微鏡システムは、デジタル画像取得および解析ソフト MetaMorph (Ver.5, Universal Imaging Corp., Downingtown, PA, USA) により制御されている。デジタル CCD カメラは ORCA-ER (C4742-95, Hamamatsu, JPN) を用い、電動の光路シャッター、蛍光フィルターホイール、および X-Y ステージをコントロールする MAC 5000 (Ludl Electronic Products Ltd., Hawthorne, NY, USA) を用いることにより光路の自動制御をおこない、可能な限り余分な光が細胞にあたらないようにした。また顕微鏡は倒立型の IX70 (Olympus, JPN) を使用し、水銀ランプの光路にフィルターを入れることにより、光量を 6% 以下にして光毒性を抑えた。明視野撮影も光量を抑えて、ノマルスキー微分干渉法などでおこなった。蛍光フィルターは、励起波長 (X) 484 nm, 吸収波長 (M) 515 nm のものを GFP 観察に、X555, M620 のものを PKH26, DiI, Alexa Fluor 568 観察に用いた。

免疫組織学的染色

蛍光抗体法で施行した。培養細胞を 4% paraformaldehyde で 15 分間固定し、0.1% Triton X-100 in PBS で 5 分処理する。10% 正常 Goat 血清 (NGS) で 30 分間ブロッキングをおこなった後、一次抗体を 1% NGS in PBS で所定の濃度に希釈して 60 分反応させる。その後 PBS で良く洗浄し、二次抗体として Alexa Fluor 568 標識の Goat anti-rabbit IgG (1:500) もしくは Goat anti-mouse IgG1 (1:500) を遮光状態で 30 分反応させた後、蛍光顕微鏡で観察した。

結 果

グリオーマ細胞

GFP-レトロウィルスを感染させた C6 細胞は

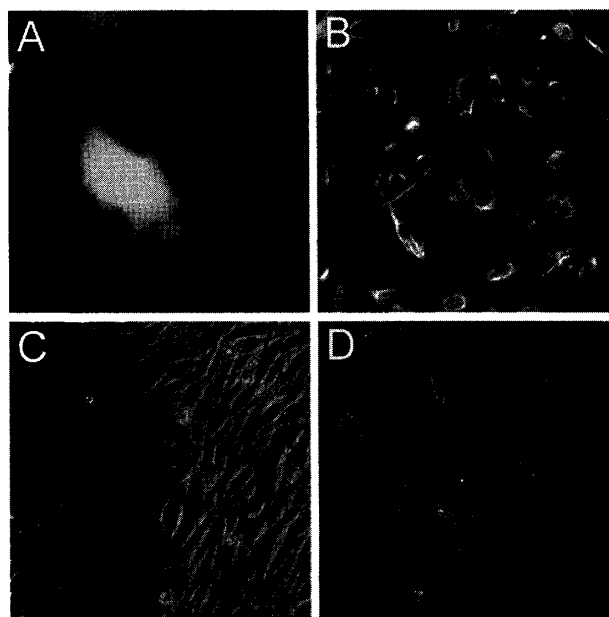


図 1

- A. GFP を強発現している C6 細胞 (×40).
- B. vimentin 陽性の C6 細胞 (×10).
- C. 敷石状配列を示す血管内皮細胞 (EC, ×10).
- D. EC は DiI-Ac-LDL の取り込みを示す (×10).

分裂後も安定して強い蛍光シグナルを発現した (図 1A)。感染前後の細胞では、形態、増殖能に差は無く、GFAP および vimentin に対する免疫組織学的染色でも差は認められなかった。GFAP 陽性の細胞はごく僅かであり、vimentin はほとんすべての細胞で陽性であった (図 1B)。

血管内皮細胞

実験で用いた細胞は、血管内皮細胞の性格を有していた。すなわち、単層培養で敷石状を呈し (図 1C)、DiI-Ac-LDL の取り込みが認められ (図 1D)、免疫組織学的染色で第 VIII 因子関連抗原が陽性であった。

血管内皮細胞単層培養上でのグリオーマ細胞の動き

単層培養された EC 上に定着した GC は様々な形態を示し、紡錘形単極あるいは双極性のものや、多数の突起を持つものなどが認められた。

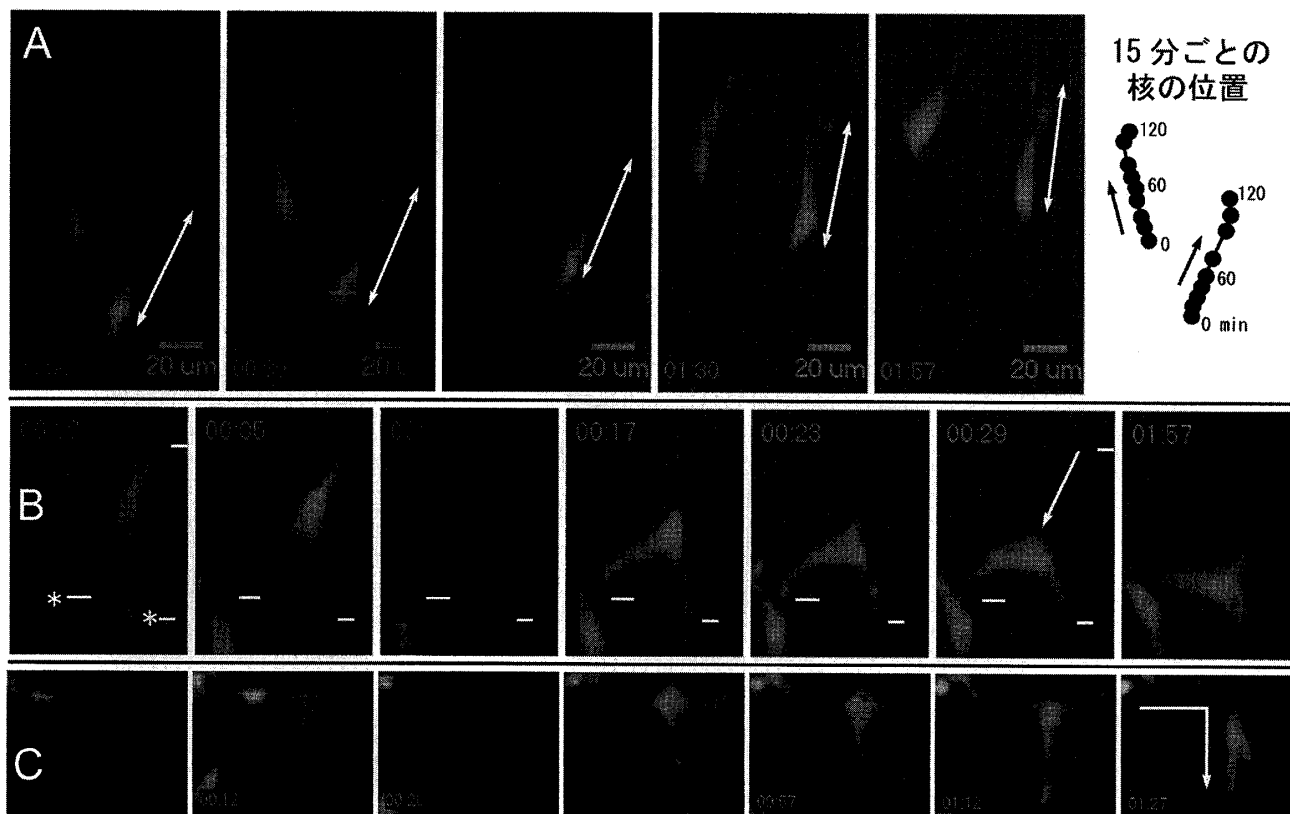


図2 グリオーマ細胞が示す様々な移動パターン

- A. 先導突起の長さを変えないこと無く（矢印の長さは同じ）、胞体と突起が同期して移動するパターン。
 B. 先導突起（ここでは2本）を収縮することにより胞体を素早く移動させるパターン（矢印が実際に移動した方向と距離）。
 C. 2本伸ばした突起の一方を選択し90度の方向転換をする細胞。

動画を観察すると、主に3パターンの動き方があった。

- 1: 先導突起の長さを変えずに胞体と突起が同期して移動するパターン（図2A）。
- 2: 先導突起を伸ばした後に、これを収縮することにより胞体を素早く移動させるパターン（図2B）。
- 3: 移動性に乏しい細胞が、突起を伸ばしたり引っ込めたりする動きや、葉状突起を出しながらゆっくりと移動する動きのパターン。

突起の多い細胞ほど移動性に乏しく、突起を伸ばしたり引っ込めたりする動きを繰り返していた。

これに対し、紡錘形の細胞は総じて移動性が高

く、前述の1や2のパターンをとって積極的に移動していた。中にはそれまでの進行方向に伸ばしていた突起と直角にもうひとつ突起を伸ばし、その後前者を縮めることにより直角に方向転換する細胞も観察された（図2C）。これらの移動動態は、発生期終脳におけるグリア芽細胞が示すそれに類似していた⁸⁾⁹⁾。

また、個々の細胞形態は刻々と変化し、紡錘形を示し移動した先で突起を多数伸ばすものや、多数の突起を伸ばしている状態から突起を縮め紡錘形になる細胞もみられた。

細胞分裂も多く観察され、これら細胞は分裂前に突起を縮め、分裂後に元々突起を伸ばしていた方向に移動していく傾向が認められた。

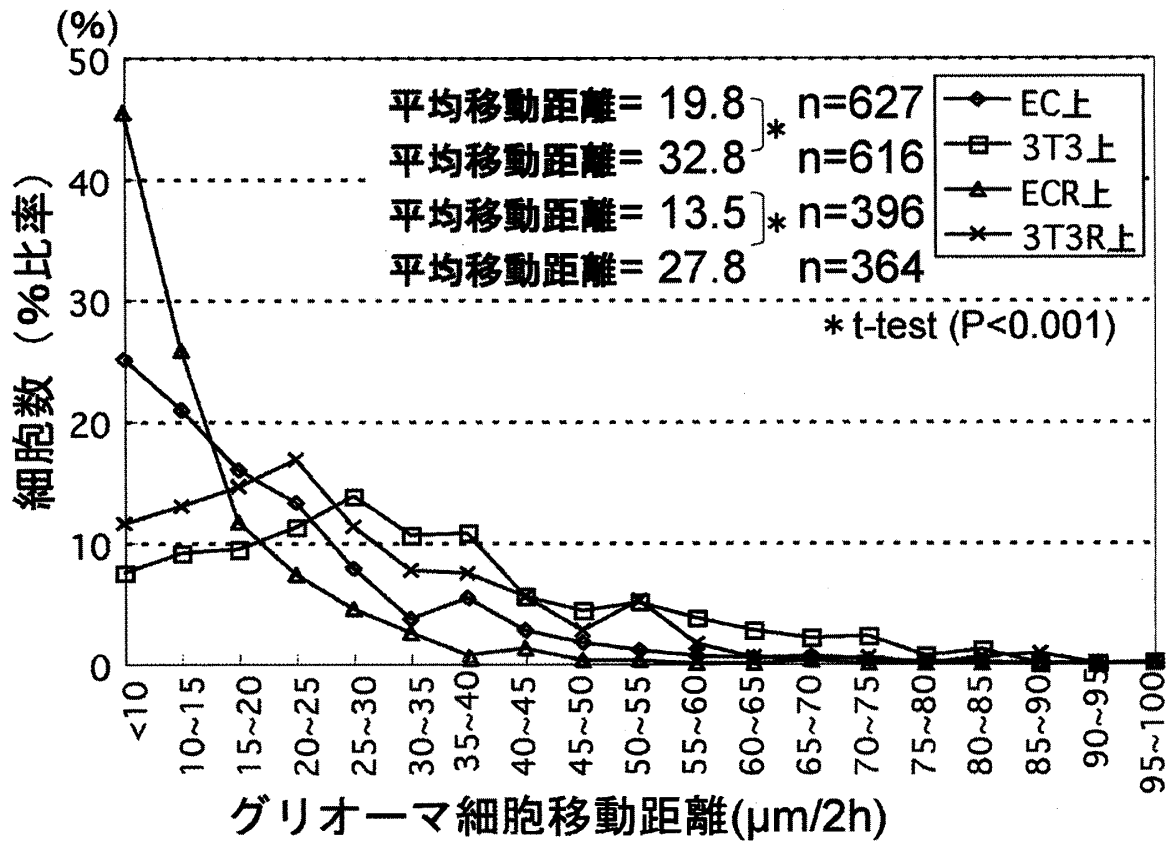


表1 血管内皮細胞 (EC) および線維芽細胞 (3T3) 上における, 2時間でのグリオーマ細胞移動距離の分布. EC上の方が移動距離の少ない細胞の割合が高い. 互いの培地上清を交換した群 (ECR, 3T3R) でも, 同様の傾向を示す.

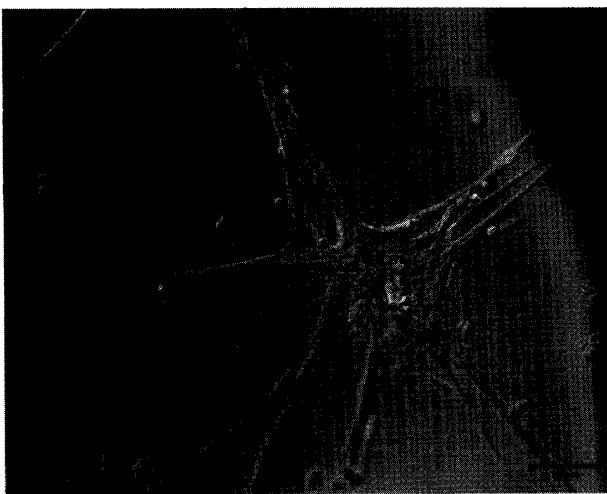


図3 毛細血管様ネットワークを形成した血管内皮細胞と, その上に乗っている白く光るグリオーマ細胞 (蛍光+微分干渉法×10).

2時間での C6 の移動距離は, EC 単層培養上 (n = 627) で平均 19.8 μm, 3T3 上 (n = 616) で平均 32.8 μm であり, 両者には t-test にて明らかな有意差 (P < 0.001) が認められた (表 1). この結果より C6 は, 3T3 上に存在するときよりも, EC 上にある時の方が核をあまり移動させずに突起を動かしている細胞が多いことがわかった.

また, 培地を交換した EC 単層培養 (ECR) 上 (n = 397) で平均 13.5 μm, 培地を交換した 3T3 (3T3R) 上 (n = 365) で平均 27.8 μm と, 培地を交換しても明らかな相違は認められなかった (表 1). この結果より, EC と 3T3 上での C6 の動きの差に最も強い影響を与えているのは, 細胞膜レベルでの因子だと推察された.

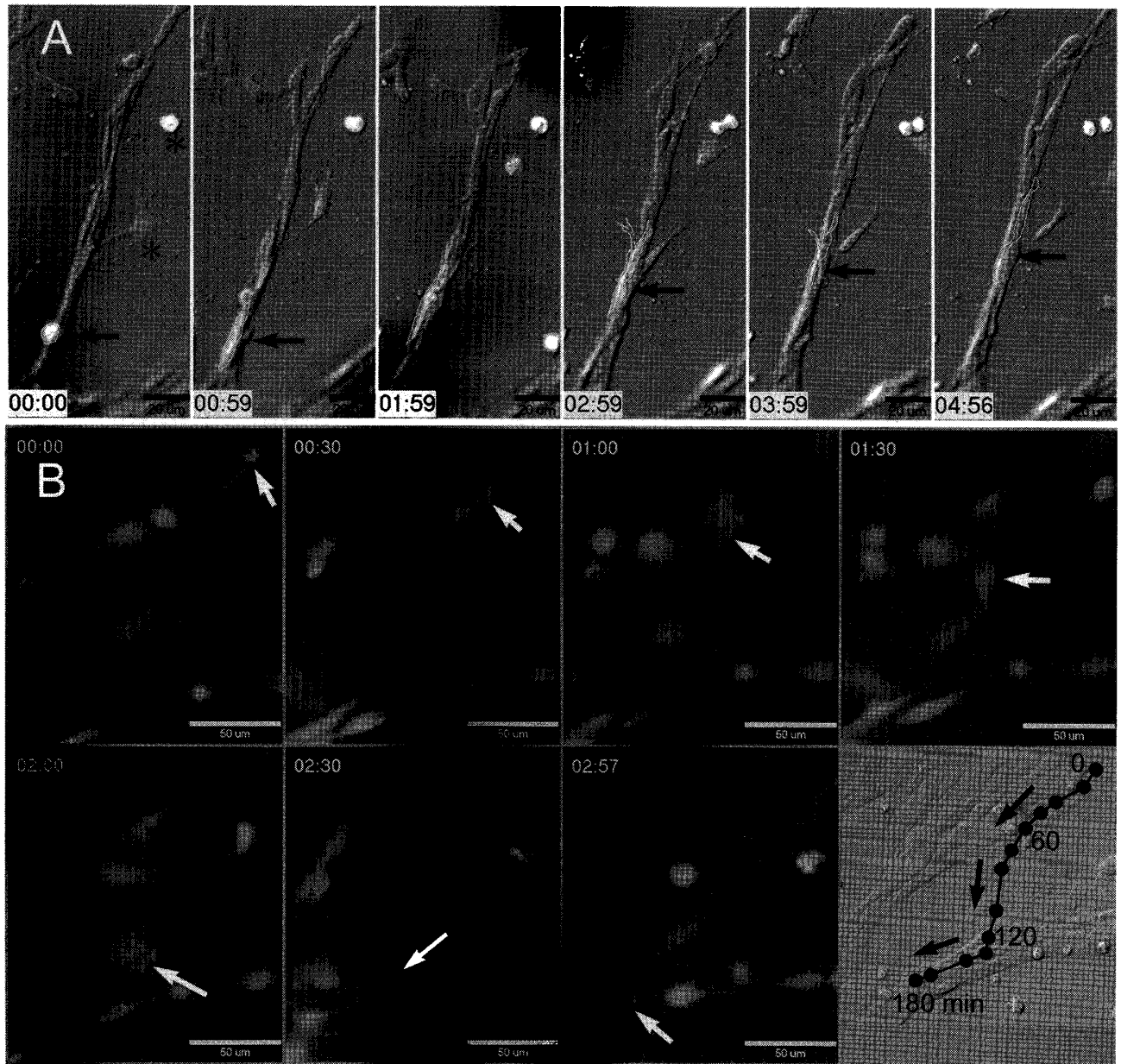


図4 ネットワーク上を動くグリオーマ細胞 (GC)

- A. 突起を伸ばし、絡み付くようにしながら移動する細胞 (矢印および白線で囲んで示す). 同視野で認められる他のGC (アスタリスク)
- B. 非常に速く移動するGC (矢印). 平均速度は $56\mu\text{m/h}$. 右下は15分ごとの核の位置を示す.

毛細血管様ネットワーク上でのグリオーマ細胞の動き

毛細血管様ネットワーク (図3) に乗っているC6は、紡錘形を示しつつネットワークに沿って移動した (図4A). 指向性は示さずに移動し、細

胞同士が交差する場面や、あるいは途中で逆行するC6も認められた. その際ここでも、単一の先端突起を収縮することにより胞体を素早く移動させるパターンと、先端突起の長さを変えずに胞体と突起が同期して移動するパターンの細胞

が認められた。

これらの C6 の中には、著しく速く ($56 \mu\text{m/h}$) 移動する細胞も存在した (図 4B)。先の実験で、EC 上での平均移動速度が $9.9 \mu\text{m/h}$ であったことを考えると、この細胞の早さが際だっていることが理解できる。

考 察

GFP-レトロウイルスで標識する最大の利点は、GFP 遺伝子を組み込まれた細胞が、分裂後も GFP 遺伝子を伝えるため、ほぼ永続的に同じ強度の蛍光シグナルを発現する点である⁸⁾⁹⁾。また、これまでの研究で GFP 遺伝子を組み込んでも、細胞毒性を与えず元の細胞性質を良く保持することも知られている¹⁰⁾¹¹⁾。今回遺伝子導入した C6 細胞株も、導入前後で明らかな違いは認められず、また非常に強い蛍光シグナルを発現させることができた。

今回の実験では、*in vitro* で他の細胞と共培養されたグリオーマ細胞は、様々な移動性を示すことがわかった。そして線維芽細胞 (NIH3T3) 上での動きよりも、血管内皮細胞上の方が突起は動かすものの、核をあまり移動させない細胞が多くなるという結果を得た。推察するに、より C6 に親和性が高いと考えられる EC 上では、C6 は突起を伸ばし定着しようとしているのに対して、3T3 上では、より良い環境を探すために動き回っているようにも思われる。

この移動性の違いに、EC から出される液性因子が関与しているかどうか確認するために、両者の上清を交換した実験系もおこなったが、両者とも明らかな差が認められず、このことから、すくなくとも 3T3 から EC から、積極的に C6 の移動に関わる液性因子は放出されていないと考えられる。すなわち、今回認められた動きの差は、互いの細胞膜レベルにおける環境の違いによると考えてよいであろう。

C6 の migration を調べた Chicoine らの報告²⁾³⁾でも、実際に single cell レベルで大脳白質への浸潤がみられており、C6 の移動速度は、*in vitro* で

$12.5 \mu\text{m/h}$ ²⁾、マウス脳内 (*in vivo*) で $48 \mu\text{m/h}$ ³⁾ と報告されている。これらの C6 の速度は、様々な条件によって異なると考えられるので、我々の結果と直接比較することはできないが、移動する場所の条件が違ってもかなり近い速さを示していることは興味深い。

これまでも、fibronectin⁷⁾, collagen¹²⁾, laminin¹³⁾などで coat された dish 上で、C6 と EC を共培養すると EC が毛細血管様ネットワークを構築することが知られている。また、matrigel 上で EC を培養すると 12-24 時間後には同様のネットワークを構築するという報告があり¹⁴⁾⁻¹⁷⁾、その際、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)などを添加すると、ネットワーク形成がさらに顕著になることも知られている。その中のいくつかの報告では電子顕微鏡を用いて、このネットワークが実際に管腔をつくり¹⁴⁾、外側に基底膜様構造が出現している¹²⁾ことも確認されている。我々は、短時間で確実に EC が毛細血管様構造をとるために、matrigel を薄くコーティングしたうえに、さらに共培養する C6 の培養上清を加えた。これにより、C6 から分泌される VEGF などの促進因子によりネットワークが形成されやすくなると共に、あとから加える C6 に与える影響を可能な限り少なくすることができた。

今回の観察の結果、血管内皮細胞が作るネットワーク上を動く C6 の中には、単層培養上を動くものよりも、明らかに速い細胞が存在することが初めて実際に確認できた。これは、ガイドとなる構造が存在することにより移動速度が速くなる特異な C6 が存在している結果であると考えられる。そう考えると、*in vivo* の実験でこれまで示されてきたように²⁾³⁾¹⁸⁾、single cell レベルで血管周囲腔や大脳白質へのグリオーマ細胞の浸潤がみられている現象も、血管や白質線維をガイドとして、より速く移動する細胞が存在するために起こるものと推察され、その関連性は非常に興味深い。

結 論

本研究から以下のことが明らかとなった。

1. グリオーマ細胞の移動動態は一様ではなく、発生期終脳におけるグリア芽細胞が示すそれと類似していた。
2. グリオーマ細胞は、線維芽細胞と共培養したときと比べ、血管内皮細胞と共培養すると移動性が乏しくなる細胞が多くなった。
3. グリオーマ細胞は、血管内皮細胞が作る管腔の存在下では、それに沿って積極的に移動し得ることがわかった。
4. 血管内皮細胞との共培養下で、著しく速く移動するグリオーマ細胞の存在することが初めて確認された。

本研究結果は、ヒト脳におけるグリオーマ細胞の浸潤メカニズムを知る上で極めて重要と考えられた。

謝辞

稿を終えるにあたり、これまで終始変わらぬ温かい御指導を賜りました 高橋 均 教授(新潟大学脳研究所病理学分野)に深謝いたします。また、共に研究しながら御指導いただきました 柿田明美 助教授(新潟大学脳研究所脳疾患リソース解析部門)に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Bernstein JJ, Goldberg WJ, Laws ER, Conger D, Morreale V and Wood LR: C6 glioma cell invasion and migration of rat brain after neural homotransplantation: Ultrastructure. *Neurosurg* 26: 622-628, 1990.
- 2) Chicoine MR and Silbergeld DL: Assessment of brain tumor cell motility in vivo and in vitro. *J Neurosurg* 82: 615-622, 1995.
- 3) Chicoine MR and Silbergeld DL: Invading C6 glioma cells maintaining tumorigenicity. *J Neurosurg* 83: 665-671, 1995.
- 4) Thorsen F and Tysnes BB: Brain tumor cell invasion, anatomical and biological considerations. *Anticancer Res* 17: 4121-4126, 1997.
- 5) Günther W, Skafnesmo K-O, Arnold H and Terzis AJA: Molecular approaches to brain tumour invasion. *Acta Neurochir (Wien)* 145: 1029-1036, 2003.
- 6) Koyama Y and Goldman JE: Formation of GFAP cytoplasmic inclusions in astrocytes and their disaggregation by alphaB-crystallin. *Am J Pathol* 154: 1563-1572, 1999.
- 7) Niida H, Takeuchi S, Tanaka R and Minakawa T: Angiogenesis in microvascular endothelial cells induced by glioma cells and inhibited by tumor necrosis factor in vitro. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 35: 209-214, 1995.
- 8) Kakita A and Goldman JE: Patterns and dynamics of SVZ cell migration in the postnatal forebrain: Monitoring living progenitors in slice preparations. *Neuron* 23: 461-472, 1999.
- 9) Kakita A, Zerlin M, Takahashi H and Goldman JE: Some glial progenitors in the neonatal subventricular zone migrate through the corpus callosum to the contralateral cerebral hemisphere. *J Comp Neurol* 458: 381-388, 2003.
- 10) Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW and Prasher DC: Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805, 1994.
- 11) Gubin AN, Reddy B, Njoroge JM and Miller JL: Long-term, stable expression of green fluorescent protein in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 347-350, 1997.
- 12) Montesano R, Orci L and 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.
- 13) Laterra J, Guerin C and Goldstein GW: Astrocytes induce neural microvascular endothelial cells to form capillary-like structures in vitro. *J Cell Physiol* 144: 204-215, 1999.
- 14) Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR and Lawley TJ: 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.
- 15) Grant DS, Tashiro K, Segui-Real B, Yamada Y, Martin GR and Kleinman HK: Two different laminin domains mediate the differentiation of

- human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. *Cell* 58: 933 - 943, 1989.
- 16) Baatout S: Endothelial differentiation using Matrigel (Review). *Anticancer Res* 17: 451 - 456, 1997.
- 17) Liu J, Wang XB, Park DS and Lisanti MP: Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation. *J Biol Chem* 277: 10661 - 10668, 2002.
- 18) Pedersen P-H, Edvardsen K, Garcia-Cabrera I, Mahesparan R, Thorsen J, Mathisen B, Rosenblum ML and Bjerkvig R: Migratory patterns of lac-z transfected human glioma cells in the rat brain. *Int J Cancer* 62: 767 - 771, 1995.
- (平成 16 年 6 月 25 日受付)
-