
シンポジウム

血管細胞生物学の進歩

Recent Topics in Vascular Biology

第 517 回新潟医学会

日 時 平成 8 年 4 月 20 日 (土) 午後 3 時～5 時

会 場 新潟大学医学部 有壬記念館

司 会 岡田正彦教授 (検査診断学), 内藤 眞教授 (病理学第二)

演 者 皆河崇志 (脳神経外科), 渡辺賢一 (燕労災病院), 追手 颯 (分子病態学分野), 藤中秀彦 (構造病理学分野), 岡田正彦 (検査診断学), 内藤 眞 (病理学第二)

発言者 山本 格 (構造病理学分野), 川崎克俊 (構造病理学分野), 木原 達 (構造病理学分野), 渡辺健寛 (第二外科)

司会 (岡田) 血管細胞生物学という言葉はあまり耳慣れないと思います。まだ、市民権を得た言葉ではございませんし、ごく一部の方が使っているだけです。先進国の死亡率を見ますと、血管障害で亡くなる方が非常に多いわけですが、それがどういう機序で起こっていくのかを細胞レベル、或いは分子レベルで解明しようという分野ではないかと理解しております。そういうお話であれば、新潟県内にも先進的なお仕事をなさっている方が多数いらっしゃるはずだと思ひまして、このようなシンポジウムを考えてみたわけです。おそらく若い方の中にも相当いらっしゃるのではないかと考えまして、新しい試みとして、演題の一般公募という形を取らせていただきました。その結果、今日、このプログラムに出ています 6 名の方が応募して下さいました。全て、自ら進んで応募して下さいました方々です。私の心積もりでは、お若い方が 1 人か 2 人くらい応募してくだされば大成功だと思っておりましたが、期待に反してと言っては怒られてしまいますが、大変嬉しい誤算で、大ベテランの方々が応募して下さいました。医学部の基礎、臨床もありますし、学内あれば、学外もあり、脳研の方もいらっしゃいます。意図してもこんなに適切なプログラムは作れないのではないと思うぐらい、うまくできました。うまく具合にと申しますよりは、応募して下さいました諸先生方

のご見識とご熱意によるものであると、厚く感謝いたしております。

本日は、お見受けしたところ、実地医家の先生方もいらっしゃると思いますが、比較的、基礎に片寄ったお話になると思います。ただし、近い将来、実地診療に役立つ技術、或いは知識がたくさん出てくると思いますので、実地医家の先生方におかれましては、多少、耳慣れない言葉が出てくるかも知れませんが、その都度ご質問をいただくことにしまして、どうか最後までご清聴いただきたいと思います。

それで今日は、まず最初に 6 名の演者の方々に一通りお話をいただき、後でまとめて会場の方々も交え、ディスカッションをしたいと思っております。前半の 3 題は私が進行役をやらせていただき、後半の 3 題は内藤教授にお願いしようと思っておりますので、よろしくご協力お願いいたします。

最初のシンポジストは、脳外科の皆河先生です。脳外科医でいらっしゃるわけですが、非常にベーシックなお仕事を前からなさっています。本日は、「脳における血管新生のメカニズムに関する検討—培養細胞 (内皮、腫瘍、アストロサイト等) を利用したアプローチ」というお話をいただきます。皆河先生お願いします。

1) 脳における血管新生のメカニズムに関する検討

—— 培養細胞（内皮，腫瘍，アストロサイト等）を利用したアプローチ ——

新潟大学脳研究所脳神経外科学教室（主任：田中隆一教授）

皆河 崇志・相場 豊隆

新井田広仁・藤井 幸彦

田中 隆一

The Mechanism of Neovascularization in Brain

— In Vitro Study Using Cultured Cells —

Takashi MINAKAWA, Toyotaka AIBA

Hirohito NIIDA, Yukihiro FUJII and Ryuichi TANAKA

*Department of Neurosurgery,**Brain Research Institute, Niigata University**(Director: Prof. Ryuichi TANAKA)*

The mechanism of neovascularization in brain was investigated in vitro. Cultured microvascular endothelial cells, astrocytes, pericytes and glioma cells from brain were used in this study. Proliferation of endothelial cells was stimulated by type 1 collagen and moderate hypoxia. Conditioned media from glioma cells failed to facilitate the growth of endothelial cells. Differentiation of endothelial cells, demonstrated by the formation of capillary-like structure was stimulated the existence of type 1 collagen. Glioma cells also stimulated the formation of capillary-like structures. Astrocytes migrated and attached to the capillary-like structures, and the formation of blood-brain barrier, proved by the induction of tight junction was observed 9 days after the attachment. Pericytes also migrated and attached to the capillary-like structures.

Key words: cultured endothelial cell, neovascularization, blood-brain barrier, brain

培養内皮細胞，血管新生，血液脳関門，脳

はじめに

血管新生は様々な病態で起こり，各臓器で固有の過程をとると考えられる。中枢神経系，特に脳においては，脳腫瘍，慢性脳虚血そして脳損傷後の修復過程で観察さ

れ，血液脳関門がいかにして構築されていくか，という興味ある問題も含まれている。脳神経外科学教室では，これまで脳微小血管の内皮細胞の生物学的特性を検索し，脳固有の細胞であるアストロサイトあるいはグリオーマ細胞との相互作用を in vitro で検討してきた。今回の

Reprint request to: Takashi MINAKAWA,
Department of Neurosurgery
Brain Research Institute,
Niigata University, Niigata City,
951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町1番町
新潟大学脳研究所脳神経外科学教室
皆河 崇志

シンポジウムでは、これまでの我々の研究成果を総括し、脳血管新生のメカニズムについて考察する。

方法と結果

脳における血管新生の過程は、(1) 内皮細胞の増殖、(2) 内皮細胞の分化（管腔形成）、(3) 血液脳関門の形成、の三段階にまとめることができる。したがって、この順に論じていきたい。本論にはいる前に培養内皮細胞について少し触れたい。使用した内皮細胞は脳微小血管由来であるが、継代した細胞では tight junction を含めその特性の多くを失っている^{1)~3)}。脳損傷後に発生する血管の内皮細胞も、初期の段階で血液脳関門を持たない⁴⁾。したがって、培養細胞を利用し脳の血管新生を検索する方法は、in vivo に近い理想的なモデルと考えられる。

1. 内皮細胞の増殖を促進する因子

(1) 細胞外基質

砂ネズミ脳微小血管由来の培養内皮細胞を I 型コラーゲンで被覆した培養皿で培養すると、コントロール（プラスチック上）に比し増殖は促進された。すなわち、一定の細胞数を I 型コラーゲン上で培養すると、培養後 6 日後の細胞数は無処置の約 1.5 倍に達した。ゼラチンにも同様の効果がみられ、これらの基質は培養細胞を長期継代させるための必要条件でもあった²⁾。

(2) 低酸素

砂ネズミ脳微小血管由来の培養内皮細胞を 1 週間低酸素状態で培養し、低酸素が内皮細胞の増殖に及ぼす影響

を ³H-thymidine の取り込みで定量し評価した。コントロールとして 3T3 細胞（マウスの線維芽細胞由来株）を同じ条件で培養した。内皮細胞は、9 から 15% の中等度の低酸素状態で有意に増殖し、11% で最も良好な増殖を示した。一方、3T3 細胞の増殖は、酸素濃度により変化を受けなかった⁵⁾。

2. 内皮細胞の分化（管腔形成）を促進する因子

(1) 細胞外基質

砂ネズミ、ラットそしてウシの脳微小血管由来の内皮細胞を I 型コラーゲン上に培養すると、一部の細胞はコラーゲン内に遊走し血管様構造（管腔）を形成した。この現象は、内皮細胞を直接コラーゲン内で培養することにより容易に誘導された¹⁾³⁾⁶⁾。

(2) グリオーマ細胞

C₆ glioma 細胞と T₉ gliosarcoma 細胞がラット脳微小血管由来内皮細胞の増殖に及ぼす影響を ³H-thymidine の取り込みで定量し評価した。両者の培養上清はともに、内皮細胞の増殖を抑制した。一方、double chamber を利用し内皮細胞とグリオーマ細胞を co-culture すると、I 型コラーゲン内で形成される血管様構造は増加し、C₆ glioma 細胞でコントロールの 7.9 倍、T₉ gliosarcoma 細胞で 2.3 倍に達した。この結果は、グリオーマ細胞が内皮細胞の分化（管腔形成）を選択的に促進することを示している⁷⁾。

3. 血液脳関門の形成を促進する因子

(1) アストロサイト

ウシ脳微小血管由来の内皮細胞をゼラチン上で培養し、

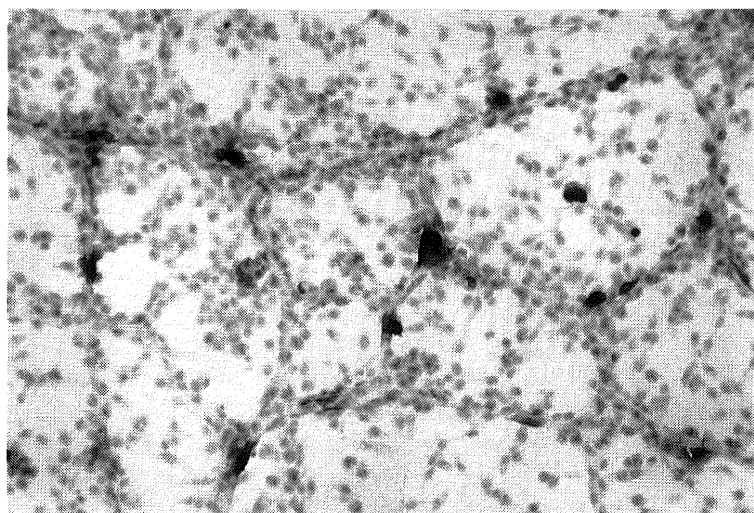


図 1 毛細血管様構造に遊走・接着したアストロサイト（GFAP 染色）

さらにI型コラーゲンで覆うことにより半三次元的に血管様構造を形成させた。この培養系にマウスのアストロサイトを散布し co-culture すると、アストロサイトは血管様構造に遊走し、24時間後には72%のアストロサイトが接着し(図1)、9日後には90%以上の細胞が胞体を広げこの構造を覆っていた。透過型電子顕微鏡で観察すると、内皮細胞同士は tight junction で接合されていた⁸⁾。

(2) ペリサイト

ペリサイトを血管様構造物と co-culture すると、アストロサイトと同様にこの構造物に遊走、接着し、さらに胞体を広げこの構造物を覆った⁸⁾。

考 察

血管新生のメカニズムに関する報告は、臓器の種類を問わず in vivo と in vitro で広く検討されている。最近のこの分野での急速な進歩は、培養細胞の利用と成長因子を含む様々なサイトカインの発見によるところが大きい。脳の血管新生に関しては、血液脳関門の形成に絞った研究が多く、内皮の増殖から分化(管腔形成)に至る過程は、我々のデータを除くとほとんど報告されていない。したがって、内皮細胞の増殖から分化に至る過程は我々のデータと文献(他臓器の培養内皮細胞での血管新生に関する)から、血液脳関門の形成に関しては我々の結果を中心に考察する。

血管内皮細胞を増殖させる因子として広く知られているのは各種の成長因子であり、代表的なものとして、basic fibroblast growth factor (b-FGF) と vascular endothelial growth factor (VEGF) が挙げられる。これらが、脳の内皮細胞の増殖に及ぼす影響は不明な点が多いが、b-FGF は脳においても内皮細胞とアストロサイトで産生されていることが知られており、オートクリンあるいはパラクリンに内皮細胞の増殖と分化に関与しているものと考えられる。VEGF に関しては、脳における産生部位が明らかにされておらず、いまだ不明な点が多い。

低酸素が内皮細胞を増殖させることはあまり知られていない。ラットの大動脈由来の内皮細胞⁹⁾は5.3%、ウシの冠静脈の内皮細胞¹⁰⁾では2%の酸素濃度で最も良好な増殖を示したという。我々の結果と濃度は異なるが、由来する臓器が異なる内皮細胞で同じ様に低酸素で増殖が増すという現象は、腫瘍や虚血時の血管新生を考える上で興味深い。

細胞外基質は、我々が示した如く一般に内皮細胞の増

殖と分化(管腔形成)をとともに促進するが、I型コラーゲンとファイブロネクチンは増殖の方向に、IV型コラーゲンとラミニンはより管腔形成の方向に働くと言われている¹¹⁾。

一方、内皮細胞の増殖を抑制する因子として、transforming growth factor- β (TGF β) と tumor necrosis factor (TNF) が知られている。TGF β は、管腔形成に関しては促進的に作用することから、内皮を増殖から分化の方向に転換する作用を持つと考えられる。しかし、内皮細胞の種類によっては TGF β が増殖を促進したという報告¹²⁾があり、脳血管の内皮にいかん作用するかは明らかでない。TNF は、in vivo の実験で内皮細胞を増殖させるという報告があるが、TNF 単独では内皮細胞の増殖を抑制すると言われている。教室の Niida らは、TNF が脳血管の内皮の増殖と分化(管腔形成)をとともに抑制することを報告している⁷⁾。

グリオーマ細胞は内皮細胞の管腔形成を促進するものの、増殖は抑制することを示した⁷⁾¹³⁾。これは、TGF β の作用と一致する。腫瘍細胞が血管新生の最初の段階を抑制するという事は理解し難いが、in vivo ではその他の細胞との相互作用、あるいは低酸素状態など特殊な条件下で内皮細胞の増殖を促進するサイトカインを放出している可能性が考えられる。

ペリサイトは内皮細胞の増殖と遊走を抑制されている¹⁴⁾。我々の結果では、内皮細胞が管腔形成するとペリサイトがこれに遊走し接着、さらには胞体を広げ被うことから⁸⁾、ペリサイトは血管新生の最終段階で働き、内皮細胞の増殖を抑えることにより血管新生を終了させる役割を果たしていると考えられる。

これまでの多くの実験結果が示す如く、アストロサイトは血液脳関門の形成に最も重要な役割を果たしていると考えられる。我々が強調した点は、分化した内皮(管腔を形成した細胞)はアストロサイトを呼び寄せる作用があるが、増殖している内皮(単層に培養した細胞)にはないという結果である。何らかの chemoattractant が分化した内皮から放出されていると考えられる。呼び寄せられたアストロサイトは血管様構造に接着し、内皮細胞間には tight junction が形成される。ペリサイトも同様に呼び寄せられ接着する。このように様々な因子が関与し脳血管が新生されていくと考えられる。この過程を図2に表してみた。下線を引いた部分は我々が実験で確認した結果である。

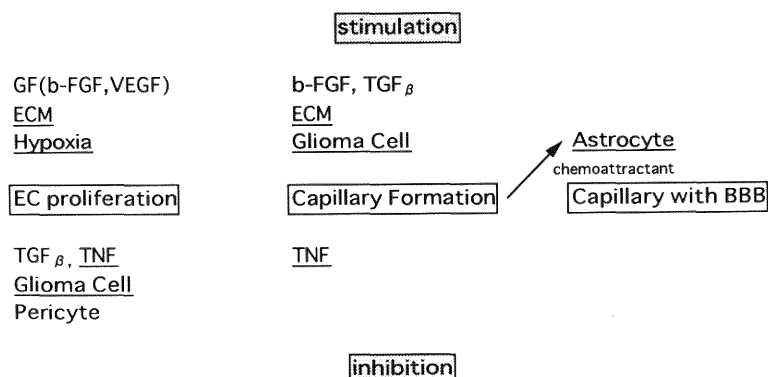


図 2 脳血管の新生に関与する因子

参 考 文 献

- 1) Minakawa, T.: Long-term culture of microvascular endothelial cells derived from mongolian gerbil brain. *Stroke*, **20**: 947~951, 1989.
- 2) 皆河崇志, 田中隆一, 佐々木修, 小池哲雄, 石井鏖二: 砂ネズミ脳微小血管内皮細胞の継代培養—培養細胞の膜酸素の染色性に関する検討—脳卒中, **11**: 89~95, 1989.
- 3) 皆河崇志, 田中隆一: 脳微小血管内皮細胞の培養法, 室田誠逸編: 血管細胞の培養とその応用 (現代化学). 東京化学同人, pp. 157~161, 1989.
- 4) Cancilla, P.A., Berliner, J.A., Bready, J.V.: Astrocytes and the blood-brain barrier: kinetics of astrocyte activation after injury and induction effects on endothelium. In *Pathophysiology of the Blood-Brain Barrier*. Amsterdam, Elsevier, pp. 31~39, 1990.
- 5) Fujii, Y., Takeuchi, S., Minakawa, T., Tanaka, R., Koike, T. and Watanabe, M.: Effect of hypoxia on proliferation of microvascular endothelial cells derived from mongolian gerbil brain. *Neurol Med. Chir.*, **34**: 799~802, 1994.
- 6) 皆河崇志, 田中隆一, Cancilla, P.A.: 脳血管の新生と分化—In vitro co-culture system を用いた研究. *脈管学*, **32**: 1235~1239, 1992.
- 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.*, **35**: 209~214, 1995.
- 8) Minakawa, T., Bready, J., Berliner, M., Fisher, M. and Cancilla, P.A.: In vitro interaction of astrocytes and pericytes with capillary like structures of brain microvessel endothelium. *Lab. Invest*, **65**: 32~40, 1991.
- 9) Smith, P.: The effect of passage number on the stimulation by hypoxia of growth and sprouting activity in cultured aortic endothelium from the rat. *Int. J. Exp. Pathol*, **71**: 479~484, 1990.
- 10) Meininter, C.J., Schelling, M.E. and Granger, H.J.: Adenosine and hypoxia stimulate proliferation and migration of endothelial cells. *Am. J. Physiol*, **255**: 554~562, 1988.
- 11) Kubota, Y., Kleinman, H.K. and Martin, G.R.: Role of laminine and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structure. *J. Cell. Biol.*, **107**: 1589~1598, 1988.
- 12) Hirai, R. and Kaji, K.: Transforming growth factor β_1 -specific binding proteins on human vascular endothelial cells. *Exp. Cell. Res.*, **201**: 119~125, 1992.
- 13) Yoshida, S., Minakawa, T., Takai, N. and Tanaka, R.: Effect of cytokines on cultured microvascular endothelial cells derived from gerbil brain. *Neurosurgery*, **25**: 373~377, 1989.
- 14) Sato, Y. and Rifkin, D.B.: Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: Activation of a latent transforming

growth factor- β_1 -like molecule by plasmin during co-culture. J. Cell. Biol., **109**: 309~315, 1989.

司会(岡田) いろいろご質問もあろうかと思いますが、さっき申し上げた通り、後でまとめて議論させていただきます。

次に、燕労災病院の渡辺賢一先生から、「自然発症高血圧ラット、心筋症ハムスター及びヒトの心筋におけるアドレナリン性 α 、 β 受容体及び Ca^{2+} 拮抗薬受容体について」というお話をいただきます。渡辺先生は、循環器の臨床に従事する一方で、基礎的なご研究をなさっていらっしゃる方です。先生よろしくお願いします。

2) 心不全モデル動物および心不全患者の成因と薬物治療について

燕労災病院循環器内科 渡 辺 賢 一

Etiology and Pharmacotherapy of Heart Failure in Disease Model Animals and Cardiomyopathic Patients

Kenichi WATANABE

Division of Cardiology, Tsubame Rosai Hospital

The norepinephrine (NE) concentration in the rat myocardium was determined. In fetus of Wistar-kyoto rat (WKY) and spontaneously hypertensive rat (SHR), cardiac epinephrine (E) concentration was high. With the growth of rats, cardiac E concentration went down, while a rapid increase of cardiac NE concentration appeared. Cardiac NE concentration of SHR became higher than that of WKY significantly in 16 week-old rats. The effects of chronic treatment with bunazosin, atenolol and verapamil on the myocardium of SHR were examined by the radioligand binding assay method using [^3H] prazosin, [^{123}I] iodocyanopindolol and [^3H] nitrendipine binding to α_1 - and β_1 -adrenergic receptors and Ca^{2+} antagonist receptors. (1) All of these drugs lowered the elevated blood pressure of the SHR. (2) Administration of atenolol to the SHR decreased the Bmax value of the β_1 -adrenoceptor. (3) Verapamil, bunazosin and atenolol also lowered the Bmax values of the Ca^{2+} antagonist receptor of SHRs. (4) All drugs except for atenolol lowered NE concentration in the myocardium of the SHR. These findings suggest that the SHR has an abnormality of the α_1 - and β_1 -adrenoceptors and Ca^{2+} antagonist receptor of the myocardium, that the drugs had a beneficial effect on these receptors, that the drugs could also lower the high NE content in the myocardium of the SHR and that some of these drugs also affected the binding characteristics of other types of membrane receptors.

Changes were examined in myocardial catecholamine content and α_1 - and β_1 -adrenoceptors and Ca^{2+} antagonist receptor during the development of cardiomyopathy in Syrian hamsters

Reprint requests to: Kenichi WATANABE,
Division of cardiology, Tsubame Rosai Hospital
Sawatari, Tsubame City, Niigata 959-12,
JAPAN.

別刷請求先: 〒959-12 新潟県燕市佐渡633
燕労災病院循環器内科 渡 辺 賢 一