

血管構成細胞増殖能および増殖メカニズムの 動物種による相違

—ラット、イヌ、ミニブタ、ヒト血管構成細胞増殖特性
の解析

課題番号：12671133

平成12年度～平成13年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書

平成14年3月

研究代表者 郷 一 知
(旭川医科大学医学部)

血管構成細胞増殖能および増殖メカニズムの動物種による相違

ーラット、イヌ、ミニブタ、ヒト血管構成細胞増殖特性の解析

課題番号：12671133

研究組織

研究代表者 郷一知 (旭川医科大学医学部助教授)

研究分担者 山崎弘資 (旭川医科大学医学部講師)
平澤雅敏 (旭川医科大学医学部研究生)
笹嶋唯博 (旭川医科大学医学部教授)

研究経費

平成12年度	1,800	千円
平成13年度	1,500	千円
計	3,300	千円

研究発表

〈口頭発表〉

1. Yamazaki, K., Hirasawa, M., Koya, A., Inaba, M., Sasajima, T.: Endothelial cell and smooth muscle cell culture as a tool for vascular research. 41th Annual World Congress International College of Angiology. 1999. 7 (Sapporo, Japan)
2. 平澤雅敏、山崎弘資、古屋敦宏、熱田義顕、笹嶋唯博：血管内皮細胞機能の特に細胞増殖能における動物種による相違. 第99回日本外科学会総会. 1999
3. 平澤雅敏、山崎弘資、古屋敦宏、稲葉雅史、笹嶋唯博：血管構成細胞再生能の動物種による相違. 第52回日本胸部外科学会総会. 1999
4. Hirasawa, M., Yamazaki, K., Koya, A., Inaba, M., Sasajima, T.: Proliferation activity in animal and human vascular cells: What are the differences? 42nd Annual World Congress International College of Angiology. 2000. 6 (San Diego, USA)
5. 平澤雅敏、山崎弘資、古屋敦宏、笹嶋唯博：血管構成細胞再生能の動物種による相違. 第53回日本胸部外科学会総会. 2000
6. 平澤雅敏、山崎弘資、古屋敦宏、山本浩史、郷 一知、稲葉雅史、笹嶋唯博：血管構成細胞増殖能の動物種および加齢による相違. 第31回日本心臓血管外科学会総会. 2001

緒言

人工血管は、生体内に埋め込まれた後、その内面が血管内皮細胞で覆われることを理想として研究が進められ、イヌではおよそ3カ月、ブタで1カ月、ゲシ類では2週間で内皮化されるが、ヒトの内皮化は極めて稀であることが明らかとなった。内径1.5 mmの人工血管は、ラットの腹部大動脈では良好に開存するが、イヌでは開存が極めて稀となり、ヒトではまったく開存例を得ることができない。このような動物種間での相違は内皮細胞、中膜平滑筋細胞など血管構成細胞機能の総合的な相違と考えられる。実験動物は研究目的となる生物学的特性がヒトと相違ないことが前提となるが、これまでの研究ではこの点が無視されてきた。その結果として小口径人工血管の開発では、臨床の求めに答え得るものはその糸口すらも示されない一方、動物種間の細胞機能の相違に関する研究は未だに着手されていない。このような背景から我々は、臨床応用可能な小口径人工血管の開発に向けて、動物種による血管構成細胞機能の相違を解析し、加えて効率的なin vitro血管内皮細胞実験システムを確立するため、ラット、イヌ、ヒトの動脈および静脈内皮細胞の初代培養系を確立した。本研究の目的は、血管構成細胞の初代細胞培養系を用い、血管内皮細胞および中膜平滑筋細胞の細胞増殖能および細胞増殖メカニズムの動物種における相違を明らかにし、小口径人工血管、さらには種々の人工臓器開発研究に寄与することにある。

材料と方法

1. 材料

5週令および50週令Sprague-Dawleyラット大静脈、幼犬・老犬（年齢不詳）頸静脈、ヒト臍帯静脈および50歳患者静脈瘤手術時採取大伏在静脈。

2. 方法

1) Primary culture (初代培養)

血管内皮細胞：ラット、イヌ、ヒトより採取した静脈内腔を洗浄後、内腔にdigestion cocktail (Collagenase, DNase, Antitrypsin)を注入し37°C、60分incubateし細胞分散後、内腔をwash outし血管内皮細胞を回収し、collagen coating 6-well plateにて初代培養した。この際、細胞の接着性の違いを利用し初回のmedium changeは24時間以内に行った。内皮細胞であることの確認には、形態、Dil-Ac-LDL uptake、マトリゲル上のtube formationで行った（図1）。

中膜平滑筋細胞：内皮細胞採取後の血管を細切し、再度digestion cocktailで37°C、60分incubateし細胞分散後、採取し6-well plate上で初代培養を行った。平滑筋細胞であることの確認は、形態、 α -actinに対するマウス抗体を1次抗体とし、抗マウスFITC抗体を2次抗体とした蛍光抗体法にて確認し

た(図2)。

2) 血管構成細胞増殖能の測定

ラット、イヌ、ヒト血管内皮細胞及び中膜平滑筋細胞を96-well Plate上に、各well 10^3 個づつ播き、Alamar Blue assayにて1, 3, 5, 7, 10, 14日目の吸光度を測定し増殖曲線を作成した。

3) co-culture assay

直接的に、動物種による血管内皮細胞増殖能の相違を検討するため、ヒト、イヌ、ラットより採取した血管内皮細胞をそれぞれ 10^4 個ずつ共培養し、動物種により核DNA量が異なることを利用してPropidium iodide染色後Flow cytometerにて、DNA histogramを作成した。

結果

1. 血管内皮細胞増殖能の動物種による相違

血管内皮細胞増殖速度はラット、イヌ、ヒトの順に速かった(図3)。若年細胞で比べると、5週令ラットの50% confluence到達時間は4日で、胎児細胞であるHUVECの50% confluence到達時間4日とほぼ同じであり、幼犬の50% confluence到達時間8日より短かった(図4)。ラットの寿命を2年、イヌ15歳、ヒト80歳とすると、大体equivalentと考えられる、50週令ラット、成犬(推定6, 7歳)、50歳ヒトを比較すると、50週令ラットの50% confluence到達時間は7日、成犬の50% confluence到達時間は14日であり、ラットが短く、50歳ヒトでは2週間でもconfluentに達しなかった(図5)。

2. 血管内皮細胞増殖能の加齢による相違

ラット、イヌ、ヒトでそれぞれ若い細胞と老化した細胞で血管内皮細胞増殖速度をみると、どの動物種においても若い細胞のほうが増殖速度は速かった(図6, 7, 8)。

3. 中膜平滑筋細胞増殖能の動物種および加齢による相違

中膜平滑筋細胞増殖速度もラット、イヌ、ヒトの順に速かった(図9)。ラットにおいては5週令ラット中膜平滑筋細胞は50週令ラット中膜平滑筋細胞より増殖速度は速かった(図10)。

4. co-culture assayにおける異なる動物種の血管内皮細胞の分離

ヒトとラット、ヒトとイヌの核DNA量の比(peak channel No. ratio)はそれぞれ1.41, 1.25であり、十分に分離可能であった。しかし、イヌとラットの核DNA量の比は1.13と近接しており、核DNA量でイヌ血管内皮細胞とラット血管内皮細胞を分離するのは困難であった(図11)。

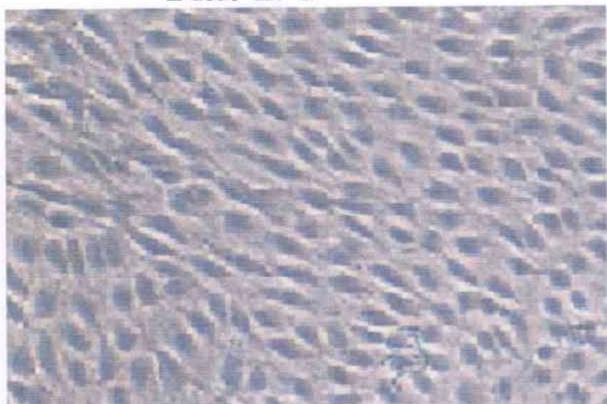
考察

血管内皮細胞増殖速度はラット、イヌ、ヒトの順に速く、動物種により血

管内皮細胞増殖能は異なっていた。中膜平滑筋細胞においても、増殖速度はラット、イヌ、ヒトの順に速く、動物種により中膜平滑筋細胞増殖能は異なっていた。この動物種による細胞増殖能の相違が、人工血管治癒過程の相違に関与していると考えられた。また、同一動物種においても、加齢により血管内皮細胞増殖能および中膜平滑筋細胞増殖能は減弱しており、細胞増殖能には年齢が影響していた。これらの結果から、ヒトへの応用を前提に動物実験を行う場合、動物種の相違および加齢の影響を考慮に入れた、実験モデルの作成が必要であると考えられた。

co-culture assayにおける異なる動物種の血管内皮細胞の分離が核DNA量により可能であるかを検討したが、ヒトとラット、ヒトとイヌの核DNA量比はそれぞれ1.41, 1.25であり、ヒトとラット、ヒトとイヌ血管内皮細胞の分離は十分に可能であったが、イヌとラットの核DNA量比は1.13と極めて近接しており、核DNA量でイヌ血管内皮細胞とラット血管内皮細胞を分離するのは困難であり、他の方法を考慮する必要がある。

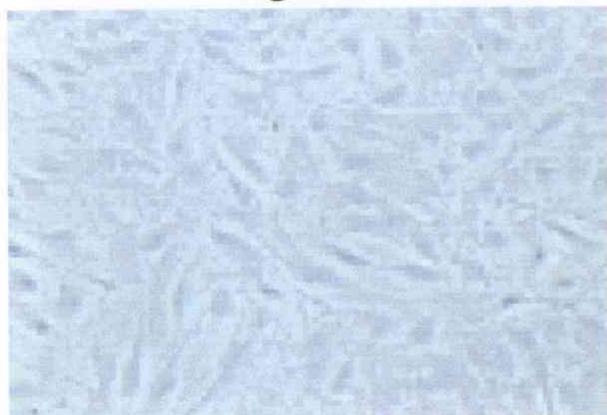
Rat EC



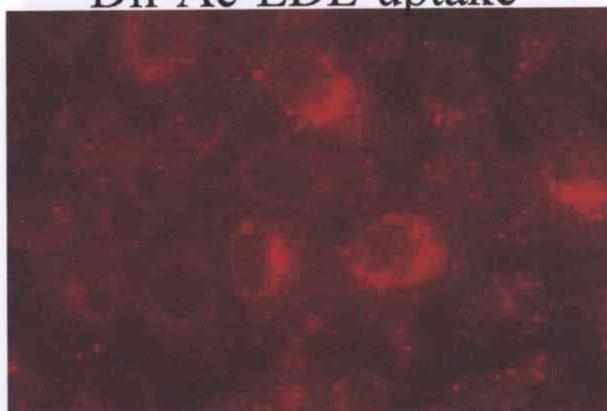
Tube formation



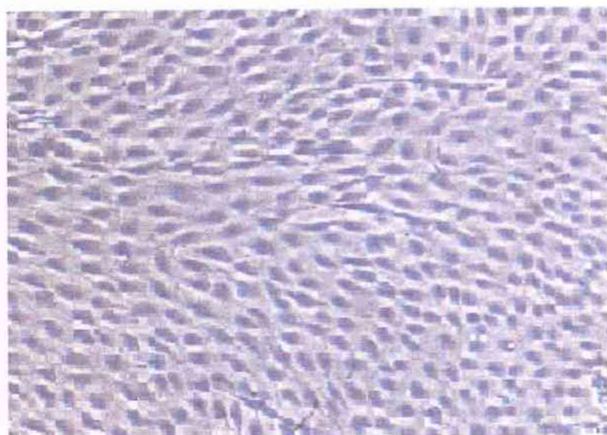
Dog EC



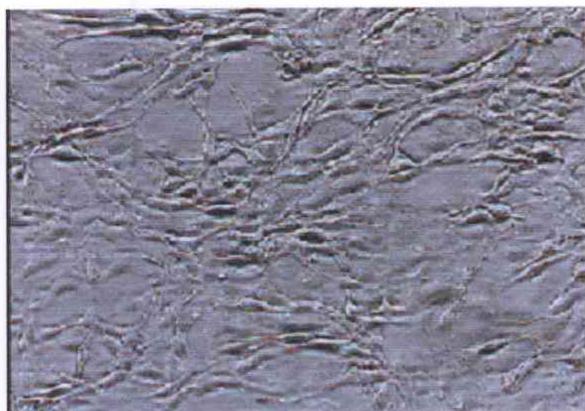
Dil-Ac-LDL uptake



Human EC



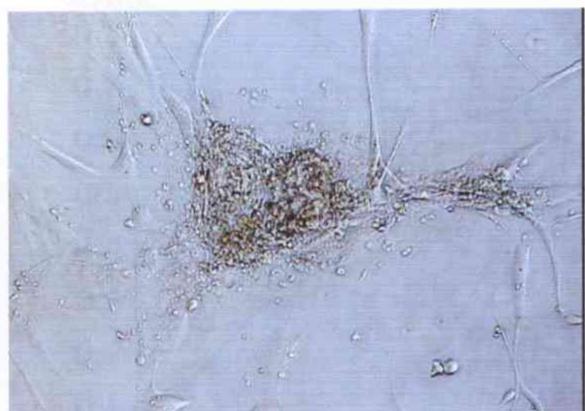
Rat SMC



Dog SMC



Human SMC



α -actin

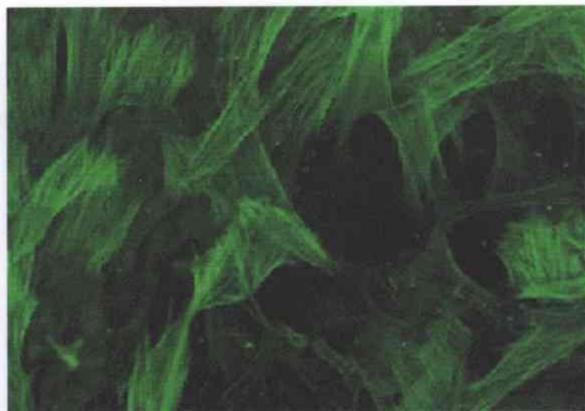


图 2

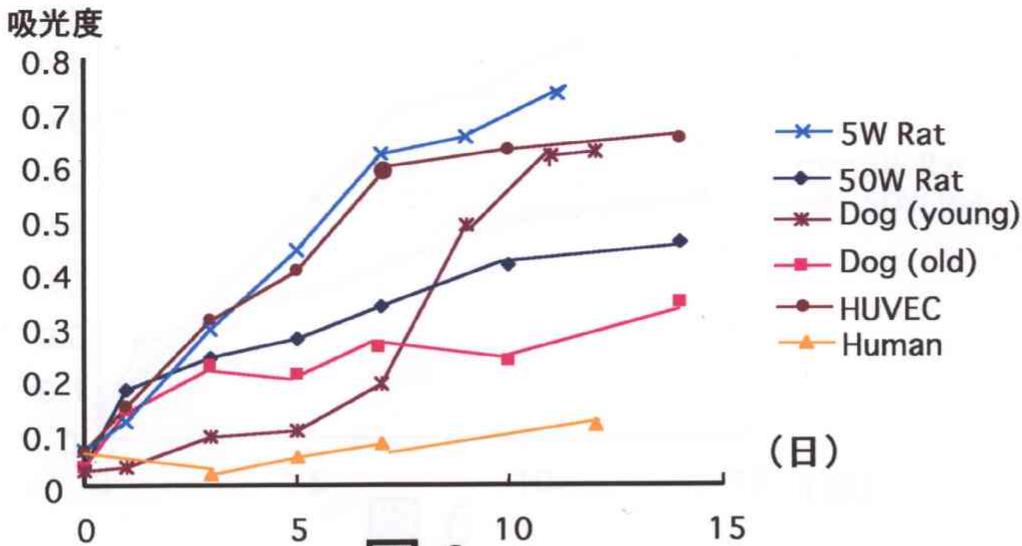


図 3

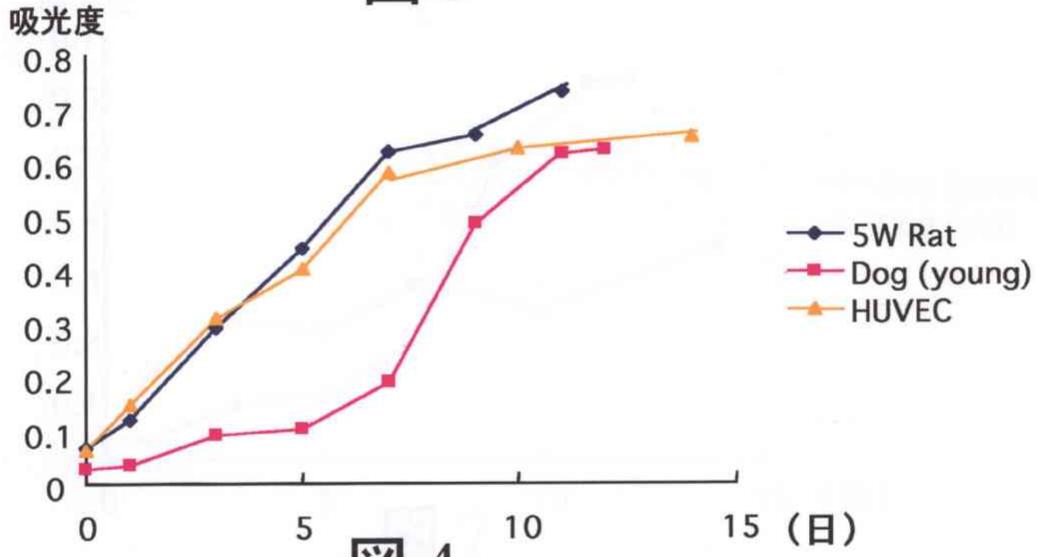


図 4

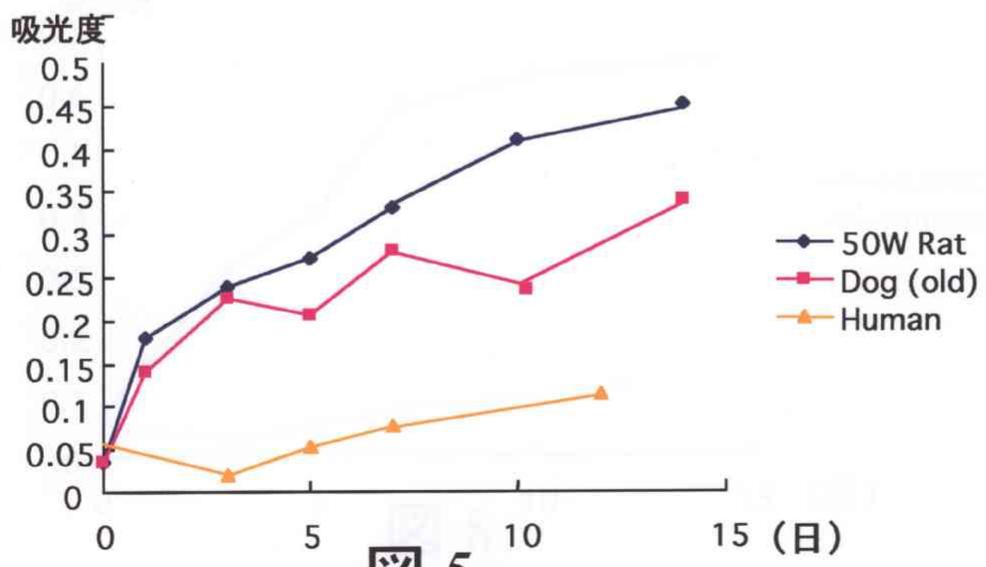


図 5

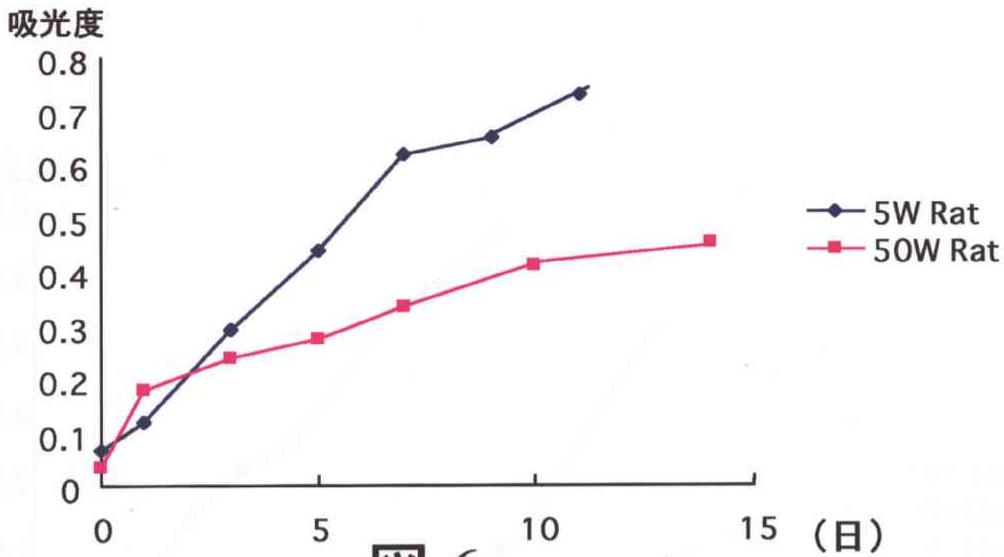


図 6

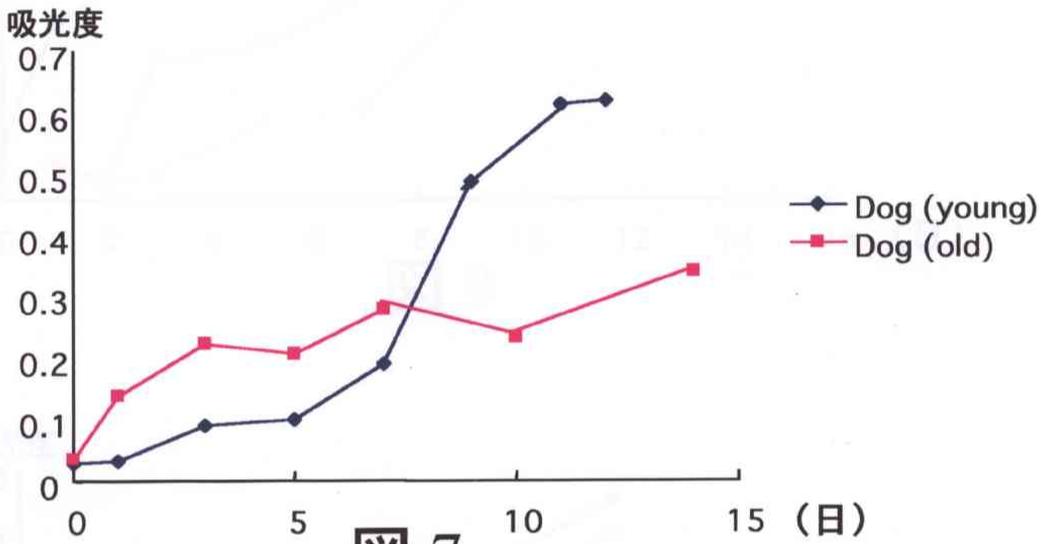


図 7

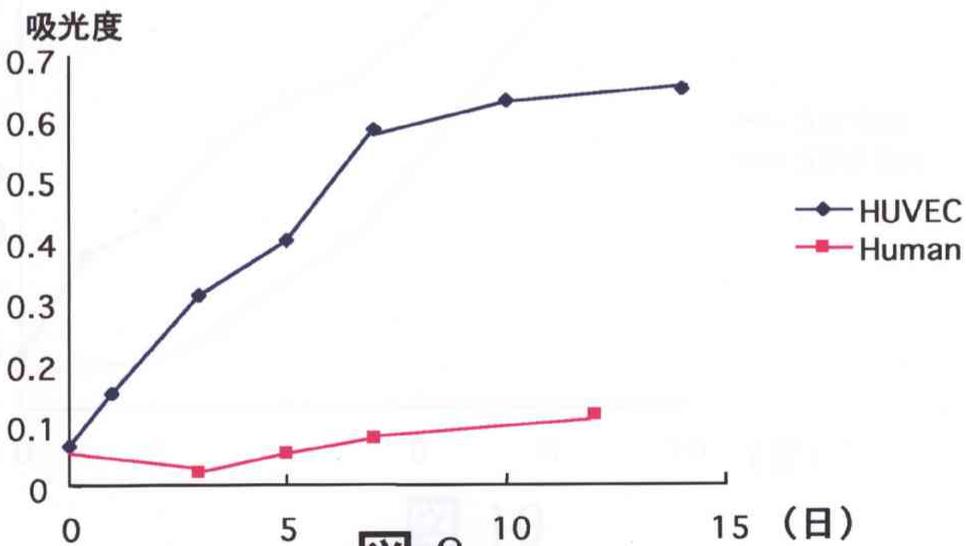


図 8

吸光度

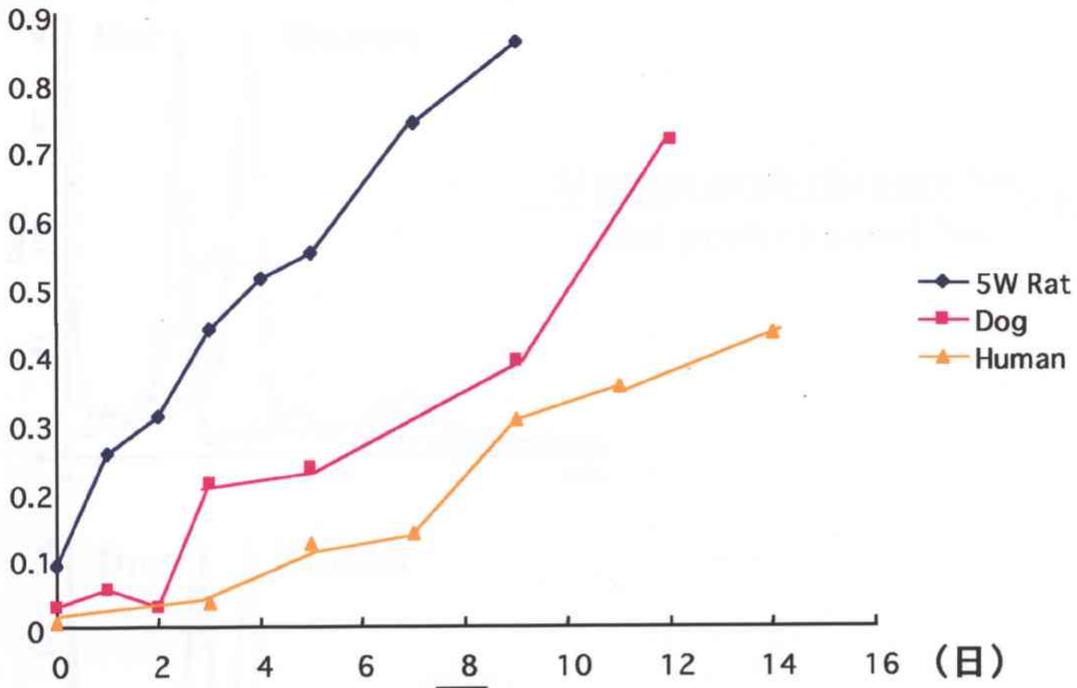


図 9

吸光度

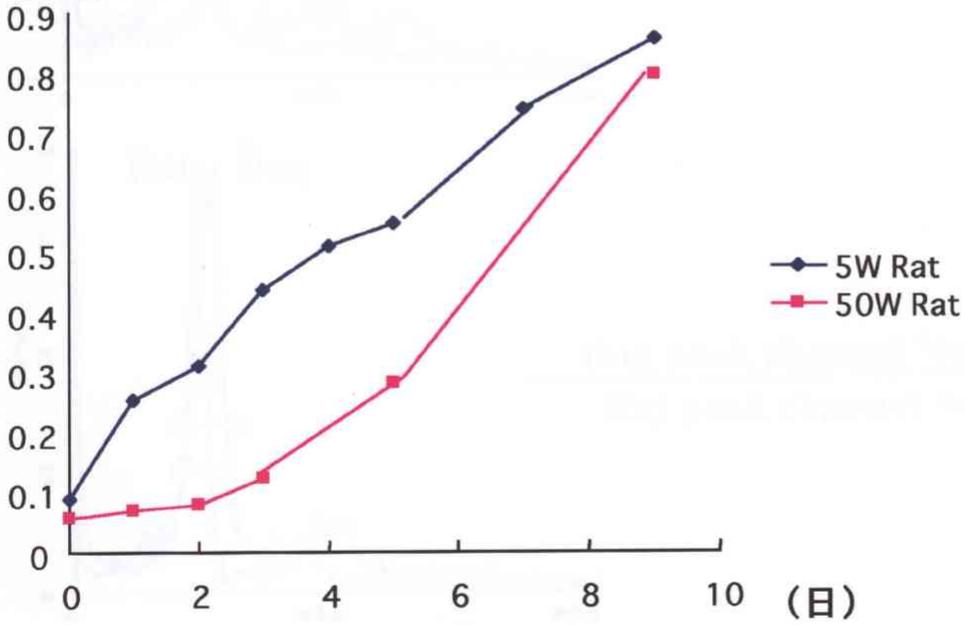
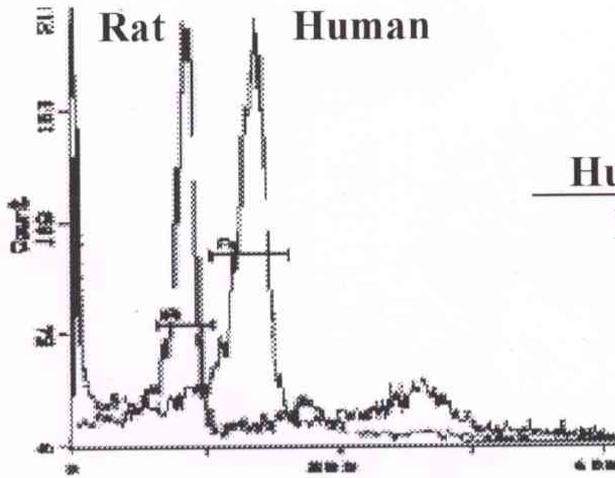
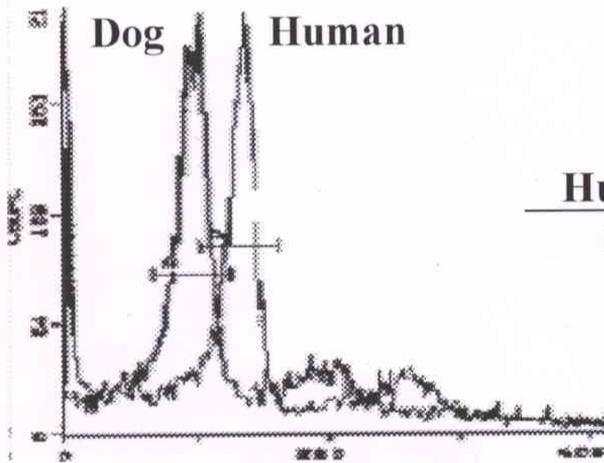


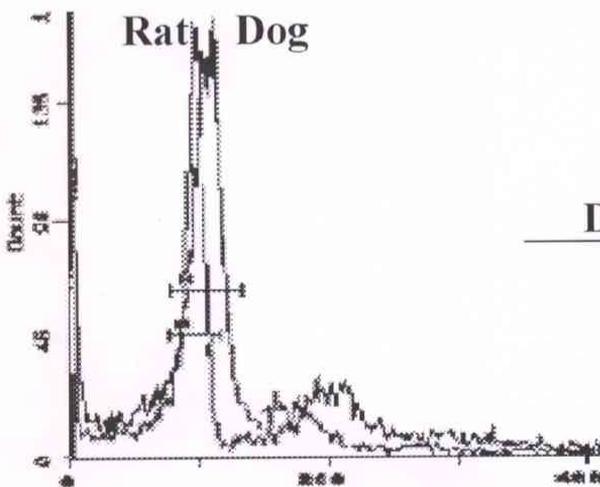
図 10



$$\frac{\text{Human peak channel No.}}{\text{Rat peak channel No.}} = 1.41$$



$$\frac{\text{Human peak channel No.}}{\text{Dog peak channel No.}} = 1.25$$



$$\frac{\text{Dog peak channel No.}}{\text{Rat peak channel No.}} = 1.13$$

图 11