

血管内皮細胞—中膜平滑筋細胞間相互のクロストーク を介した内皮細胞増殖機構の解明

課題番号：11671142

平成11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 山崎弘資
(旭川医科大学医学部)

血管内皮細胞—中膜平滑筋細胞間相互のクロストークを介した内皮細胞増殖機構の解明

課題番号：11671142

研究組織

研究代表者 山崎弘資（旭川医科大学医学部講師）

研究分担者 平澤雅敏（旭川医科大学医学部研究生）
古屋敦宏（旭川医科大学医学部医員）
赤坂伸之（旭川医科大学医学部助手）
笹嶋唯博（旭川医科大学医学部教授）

研究経費

平成11年度	2,600	千円
平成12年度	500	千円
平成13年度	500	千円
計	3,600	千円

研究発表

(1) 論文

Akasaka, N., Yamazaki, K., Ishikawa, M., Hirasawa, M., Goh, K., Sasajima, T.: Lipo-prostaglandin E1 is absorbed by vascular smooth muscle cells, and may enhance reendothelialization of vein. *submitted*

(2) 口頭発表

1) Yamazaki, Kosuke, 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) 山崎弘資、古屋敦宏、平澤雅敏、赤坂伸之、内田恒、山本浩史、笹嶋唯博: 中膜平滑筋細胞を介したPGE1の内皮細胞再生促進機序. 第11回北海道MMC研究会. 1999.

3) Koya, A., Yamazaki, Kosuke, Hirasawa, M., Akasaka, N., Inaba, M., Uchida, H., Haga, M., Sasajima, T.: Prostaglandin E1 enhances endothelial cell growth. 4th Asian Vascular Society International Congress . 2000. 5. (Manila, Philippines)

4) Yamazaki, Kosuke, Koya, A., Hirasawa, M., Akasaka, N., Inaba, M., Sasajima, T., Kubo, Y.: Prostaglandin E1 promotes endothelial cell growth. 42nd Annual World Congress Intenational College of Angiology. 2000. 6. (San Diego, USA)

5) 古屋敦宏、山崎弘資、平澤雅敏、赤坂伸之、稲葉雅史、笹嶋唯博: 中膜平滑筋細胞を介したProstaglandin E1の内皮細胞再生促進機序. 第30回日本心臓血管外科学会学術総会. 2000.

6) 古屋敦宏、山崎弘資、平澤雅敏、笹嶋唯博: PGE1の中膜平滑筋細胞を介した内皮細胞安定化作用. 第12回北海道MMC研究会. 2000.

7) 山崎弘資、平澤雅敏、古屋敦宏、赤坂伸之、稲葉雅史、笹嶋唯博: 血管内皮細胞・中膜平滑筋細胞間相互のクロストークを介した内皮細胞増殖機構. 第100回日本外科学会総会. 2000.

8) 古屋敦宏、山崎弘資、平澤雅敏、稲葉雅史、笹嶋唯博: transfilter co-culture systemを用いた内皮細胞-中膜平滑筋細胞間相互作用の解析. 第100回日本外科学会総会. 2000.

9) Koya, A., Yamazaki, Kosuke, Hirasawa, M., Akasaka, N., Inaba, Goh, K., Sasajima, T.: Prostaglandin E1 prevents apoptotic endothelial cell death. 43rd Annual World Congress Intenational College of Angiology. 2001. (Berlin, Germany)

10) 古屋敦宏、山崎弘資、平澤雅敏、稲葉雅史、笹嶋唯博: Prostaglandin E1の内皮細胞安定化作用-中膜平滑筋細胞を介した内皮細胞apoptosis抑制. 第101回日本外科学会総会. 2001.

緒言

閉塞性動脈疾患に対するバイパス手術において、自家静脈は極めて有用な代用血管であるが、5年開存率は70%で動脈グラフトに比して20%低い。その閉塞の主因は進行性内膜肥厚によるグラフト狭窄であるが、その発生機序として、移植早期に達成される再内皮化の局所的再生阻害による内皮欠損が密接に関係すると考えられる。これに対し我々は、イヌ移植実験において、Prostaglandin E1 (PGE1)が再内皮細胞化を促進すること、一方、培養血管内皮細胞株を用いたin vitroの実験でPGE1に直接的な内皮細胞増殖作用がないことを明かにしてきた。また、中膜温存内皮脱落血管モデル実験において、中膜由来のProstaglandin I2分泌が確認され、内皮再生に中膜平滑筋細胞の存在が関与することが示唆された。以上の事実からPGE1は、中膜平滑筋細胞由来の何らかのメディエーターを介して血管内皮細胞増殖に作用すると推察された。本研究では、血管内皮細胞および中膜平滑筋細胞を初代培養し、Transfilter coculture systemを用い、PGE1が中膜平滑筋細胞に作用し中膜平滑筋細胞から血管内皮細胞増殖因子を分泌させることにより血管内皮細胞増殖を起こすのか、あるいは別のメカニズムが関与しているのかを検討した。

材料と方法

1. 材料

イヌ外頸静脈

2. 方法

1) 血管内皮細胞、中膜平滑筋細胞初代培養

イヌより外頸静脈を採取し、両端をクランプして管腔内にdigestion cocktail (collagenase III, DNase I, antitrypsin)を充填、37°C1時間細胞分散させ、血管内皮細胞を採取、コラーゲンコーティド6ウエルプレート上で初代培養を行った。血管内皮細胞採取後血管壁を細切、100 μ mナイロンメッシュで濾過し、中膜平滑筋細胞を採取、6ウエルプレート上で初代培養を行った(図1)。

2) 中膜平滑筋細胞を介した血管内皮細胞増殖作用の検討

transfilter coculture systemを用い、96マルチプルウエルプレートのプレートウエルに1,000個/wellの血管内皮細胞を播き、0.2 μ mのpore sizeのmembraneを介したトランスウエルに1,000個/wellの中膜平滑筋細胞を播き培養し、トランスウエルに種々の濃度のPGE1を加え、第2、3、5日目の血管内皮細胞増殖能をAlamar blue assayで測定した(図2)。

3) 中膜平滑筋細胞を介した血管内皮細胞安定化作用の検討

上記方法と同様にtransfilter coculture systemを用い、血管内皮細胞、中

膜平滑筋細胞を共培養し、内皮細胞がconfluentになった時を開始点として、経時的に内皮細胞の減少をAlamar blue assayで測定した。

4) 中膜平滑筋細胞を介した血管内皮細胞安定化作用におけるアポトーシスの関与

方法3と同じ系を用い、血管内皮細胞のアポトーシス出現をAnnexin VおよびHoechst 33342の蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡下に経時的に内皮細胞のアポトーシス出現率を測定した(図3)。

結果

中膜平滑筋細胞との共培養群のほうが血管内皮細胞単独培養群に比して血管内皮細胞増殖能は有意に高かった。しかし、PGE1の濃度と血管内皮細胞増殖能の間に相関を認めなかった(図4)。confluent到達後の血管内皮細胞減少率は、PGE1添加中膜平滑筋細胞共培養群がPGE1無添加中膜平滑筋細胞共培養群および内皮細胞単独培養群に比して有意に低かった(図5)。PGE1添加中膜平滑筋細胞共培養群ではPGE1無添加中膜平滑筋細胞共培養群および内皮細胞単独培養群に比してアポトーシスの出現率が有意に低かった(図6)。

考察

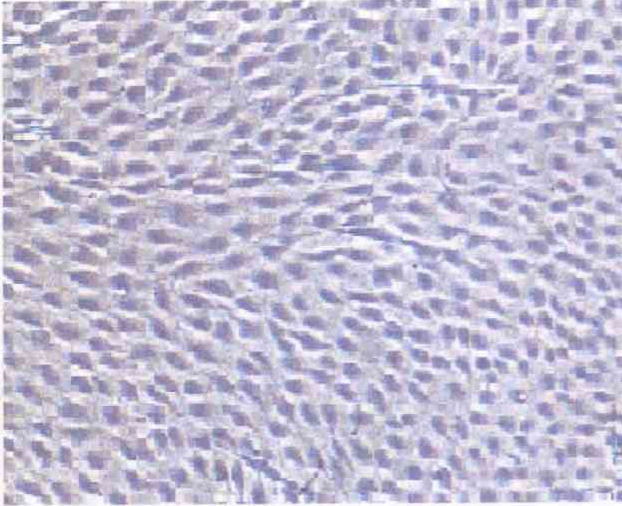
これまで、イヌ血管移植実験において、PGE1が再内皮細胞化を促進すること、一方、YPEN-1, YPBE-1などの培養血管内皮細胞株を用いたin vitroの実験でPGE1に直接的内皮細胞増殖作用がないことを明かにしてきた。また、中膜温存内皮脱落血管モデル実験において、中膜由来のProstaglandin I2分泌が確認され、内皮再生に中膜平滑筋細胞の存在が関与することを示唆してきた。さらに、lipo化PGE1は中膜平滑筋細胞には取り込まれるが、血管内皮細胞には取り込まれないことも明らかにしてきた。本研究では、中膜平滑筋細胞との共培養群のほうが血管内皮細胞単独培養群に比して血管内皮細胞増殖能は有意に高かったが、PGE1の濃度と血管内皮細胞増殖能の間に相関を認めなかったことより、中膜平滑筋細胞から血管内皮に対する何らかのgrowth factorが分泌されているが、これにはPGE1は関与しておらず、PGE1は血管内皮細胞増殖因子としての作用がないことが明らかとなった。また、血管内皮細胞減少率が、PGE1添加中膜平滑筋細胞共培養群で有意に低く、PGE1添加中膜平滑筋細胞共培養群でアポトーシスの出現率が有意に低かったことから、中膜平滑筋細胞から血管内皮細胞のアポトーシスを抑制するようなsurvival factorが分泌されており、これにはPGE1が関与していることが示唆された。このような結果から、PGE1による静脈グラフト再内皮化促進作用

は、中膜平滑筋細胞を介した血管内皮細胞増殖作用よりも内皮細胞安定化作用が関与していると考えられた。

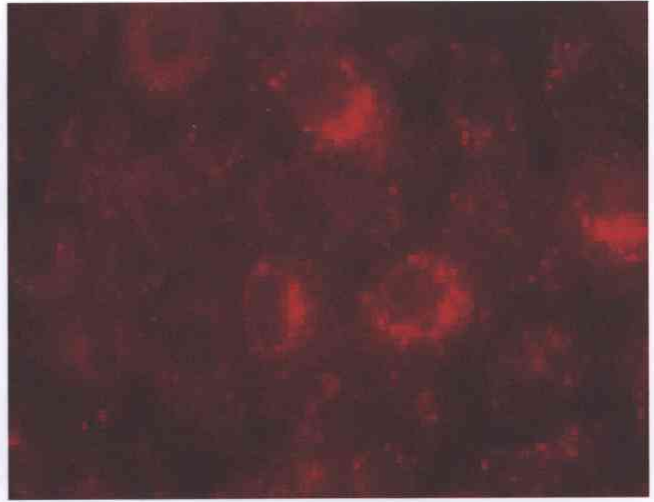
文献

1. Yamazaki, K., et al.: Establishment of an immortalized Copenhagen rat bone marrow endothelial cell line. *In Vivo*. 10; 459-462, 1996.
2. Yamazaki, K., et al.: Establishment of immortalized Copenhagen rat prostate endothelial cell lines. *In Vivo*. 9; 421-426, 1995.
3. Yatuyanagi, E., Sasajima, T., et al.: Role of medial smooth muscle cell function in antithrombogenicity of vein grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 15; 350-356, 1998.
4. Akasaka, N., Yamazaki, K., et al.: Lipo-prostaglandin E1 is absorbed by vascular smooth muscle cells, and may enhance reendothelialization of vein. *submitted*

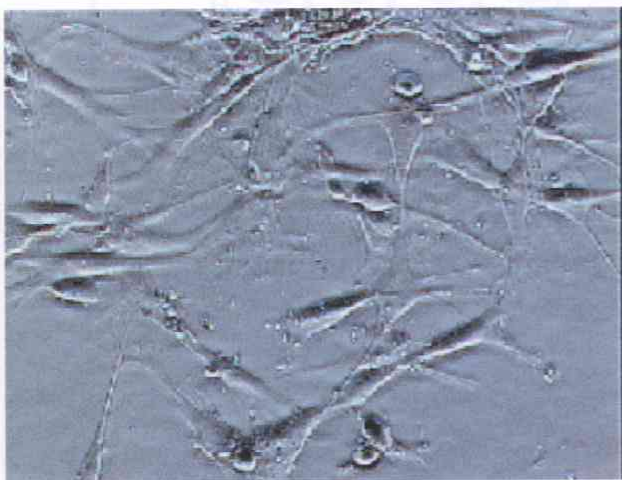
(a)



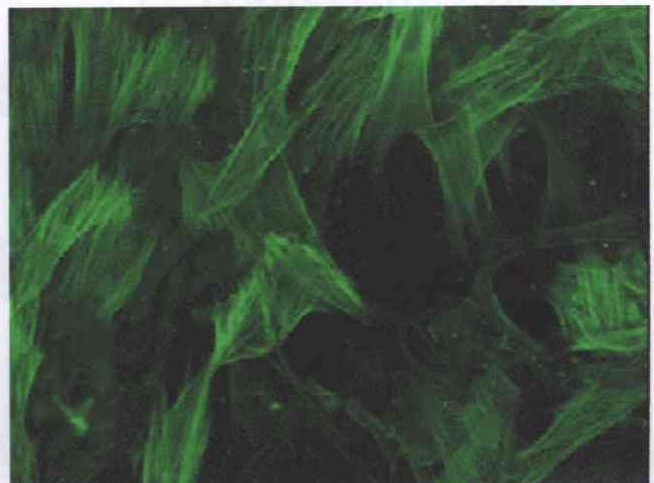
(b)



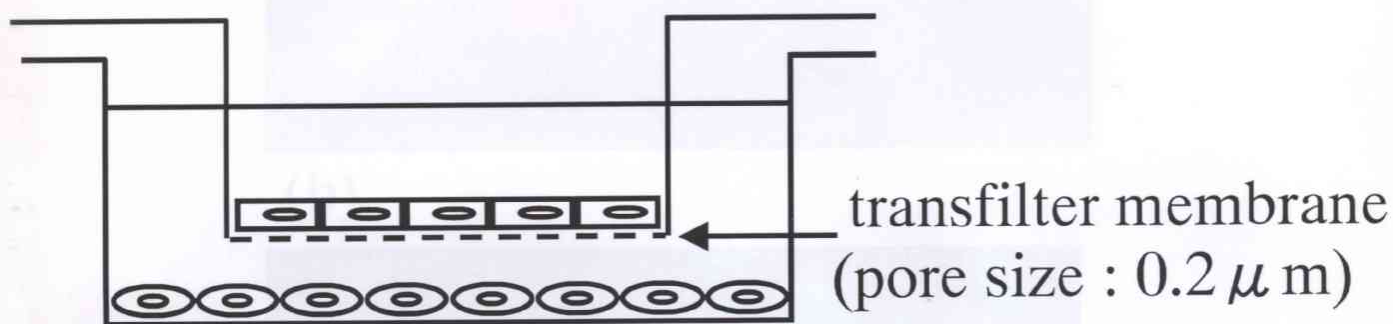
(c)



(d)



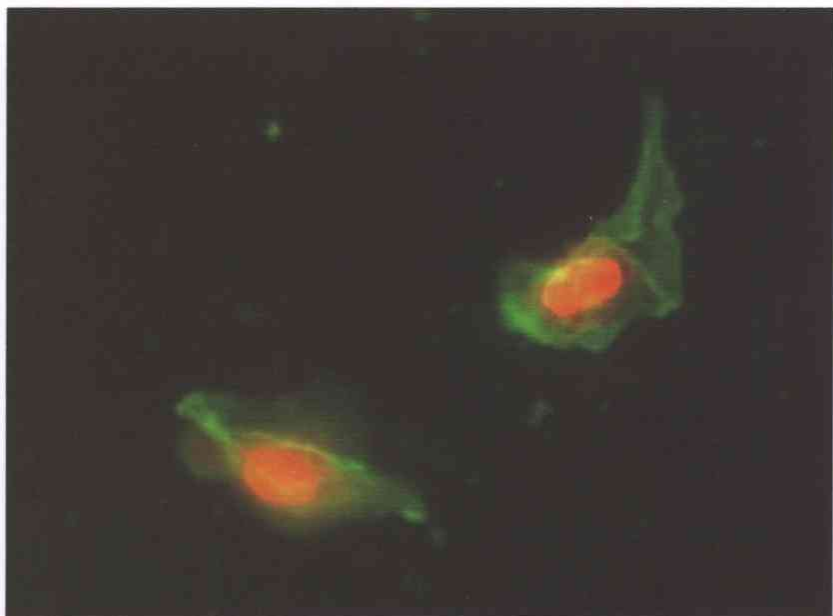
- (a) : endothelial cell
- (b) : Dil-Ac-LDL uptake in endothelial cell
- (c) : smooth muscle cell
- (d) : α -actin in smooth muscle cell



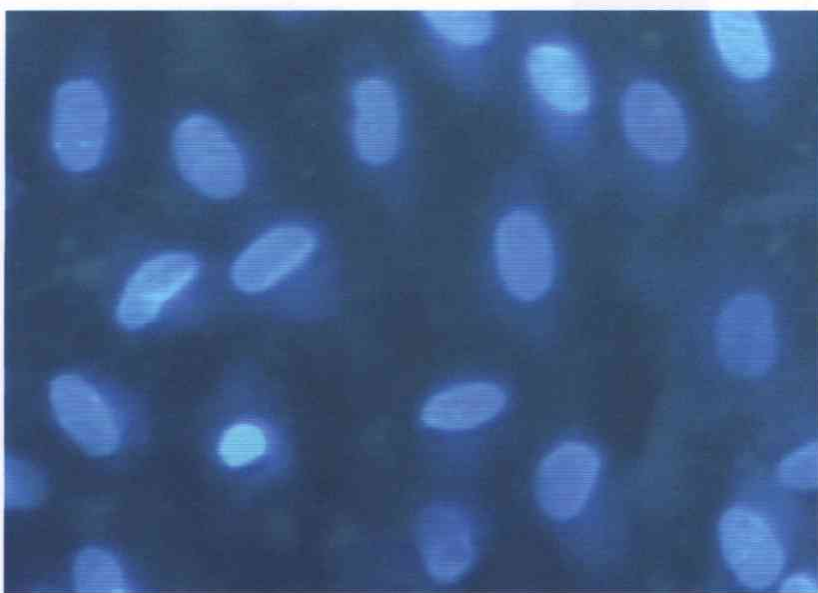
⊙ : endothelial cell □ : smooth muscle cell

図 2

(a)



(b)



(a) Annexin V /propidium iodide
(b) Hoechst 33342

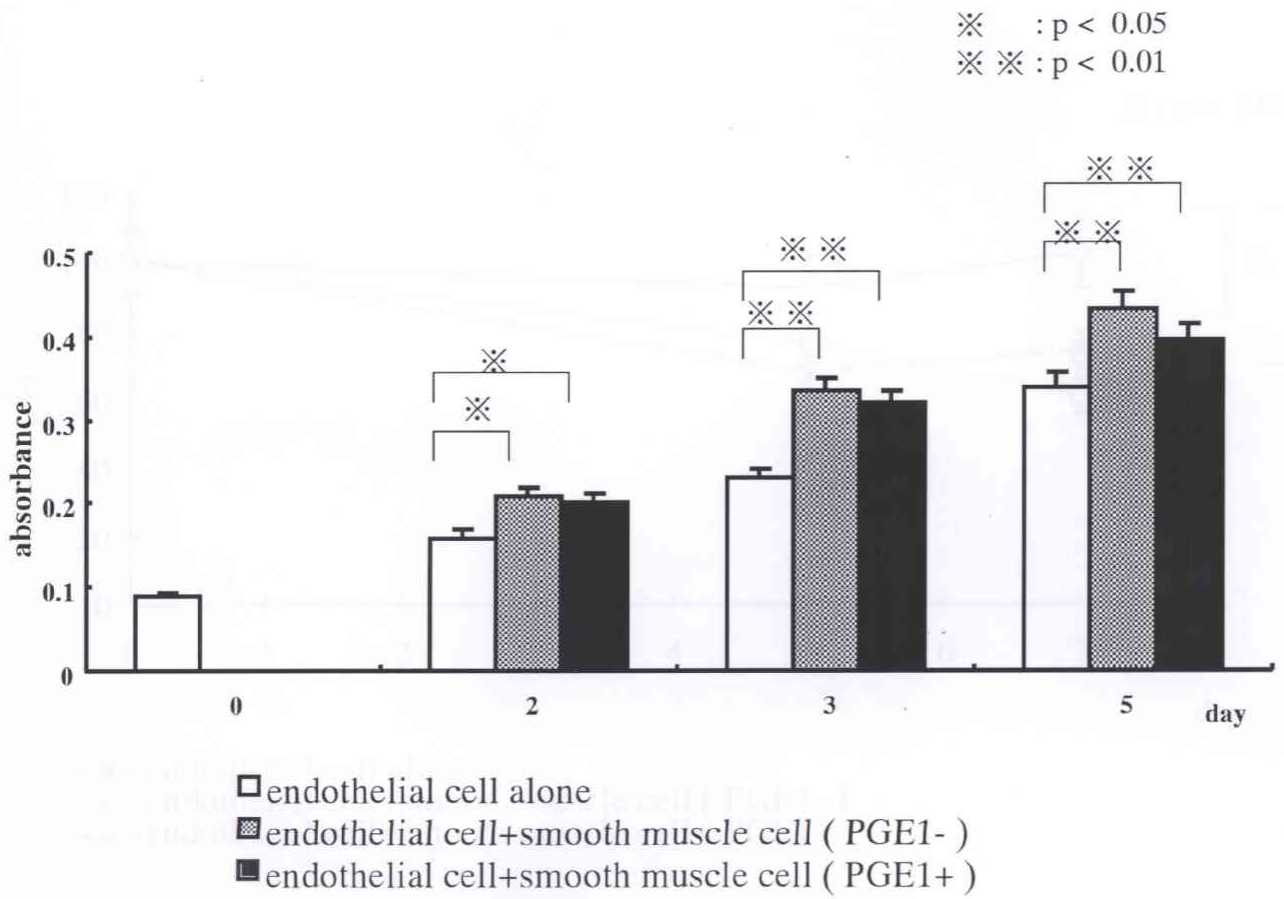


图 4

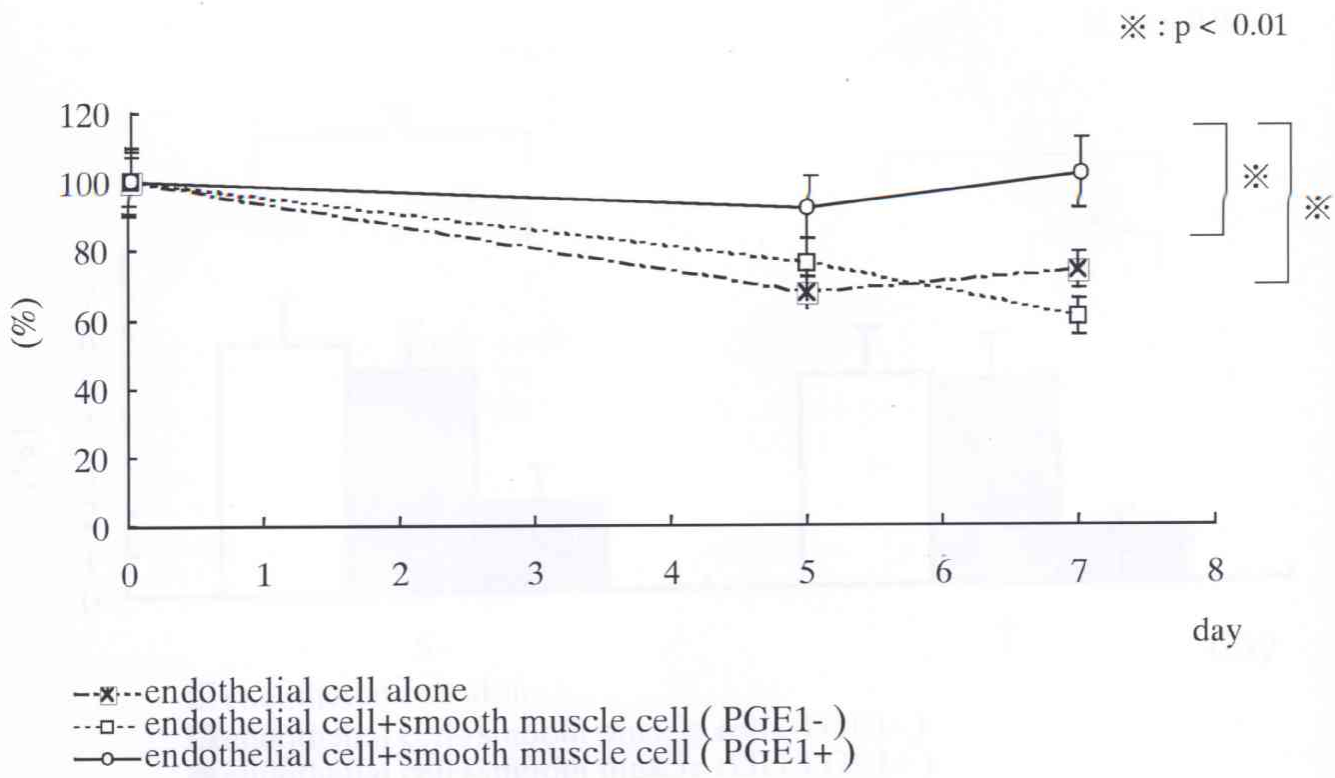


图 5

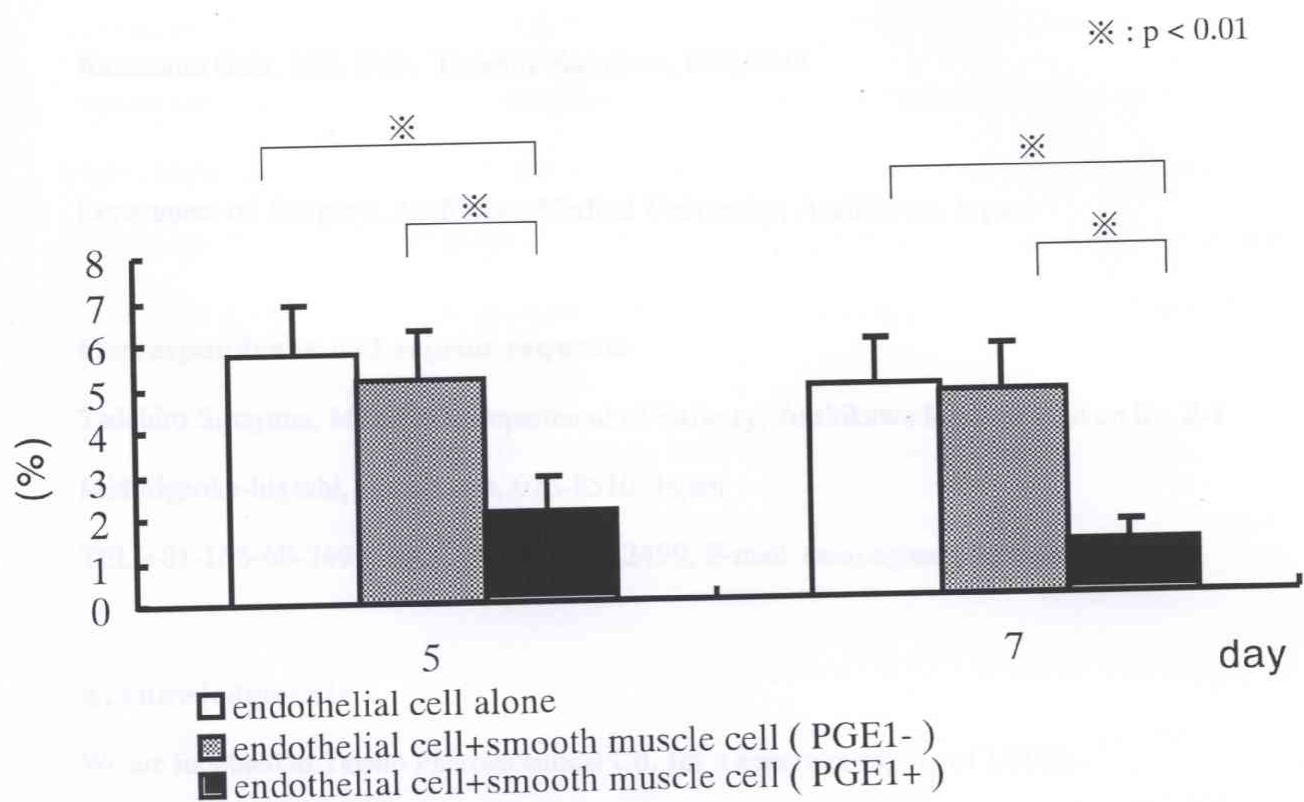


図 6