

血管組織形成を促進・抑制する因子に関する研究

日大生産工(院) ○島崎 貴大

日大生産工(日大院総科) 野呂 知加子

1. 緒言

血管新生とは、既存の血管より新しい血管が形成される現象を言い、健常者においては、個体の発生・成長、黄体形成や創傷治療など限られた生理的条件下においてのみ観察される。

近年、末梢動脈の狭窄をきたす患者に、閉塞性動脈硬化症(ASO)や閉塞性血栓性血管炎(TAO)がある。このような虚血性疾患の治療戦略として、薬物療法による内科的治療法やバイパス手術及びインターベーション治療などの外科的治療法が主流である。しかし、これら虚血性疾患の中で特に重症虚血疾患に対する治療は困難な事が多く、多くの患者が下肢切断を余儀なくされている。このような重症患者を対象に細胞治療による下肢の機能改善を目的とした血管新生療法が注目されている。一方、血管新生を伴う疾患としては、がんの増殖を始め、増殖性糖尿病網膜症、加齢黄斑変性症、未熟児網膜症などの失明を伴うような眼内血管新生病や、慢性関節リウマチなどが知られており、いずれも難病性である。特に、がん細胞は血管新生誘導因子を分泌し、固形腫瘍の周辺に新生血管が形成されると、酸素と栄養が供給されて腫瘍は大きく成長する。また、さらにがん細胞が悪性化すると、血管壁に浸潤し、血流に乗って転移する場合もある。従って、腫瘍周辺の血管新生を抑制する事が出来れば、癌細胞の増殖や転移を防ぐ事が出来ると考えられている。

血管形成を管理する重要な要因の1つは、血管内皮細胞増殖因子(Vascular Endothelial

Growth Factor:VEGF)であり、内皮細胞の増殖・移動・分化の重要な血管形成反応を管理している。大部分の癌腫瘍は VEGF が高水準で検出されている事がわかっている。VEGF は VEGFR と呼ばれるレセプターに結合し、細胞内シグナル伝達を経て、血管内皮細胞増殖と血管分化を促進する。一方、血管の構造を安定化させる重要な因子の1つは、血管新生促進因子(Angiopoetin-1:Ang-1)であり、血管壁を内皮細胞から解離させ新生血管を促進する Ang-2、新生血管組織の安定化に Ang-1 が必要であるとされており、両者とも Tie-2 レセプターに結合し、血管形成を制御する。

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(Normal Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs)は血管新生の研究において広く使用されている細胞である。我々は、HUVEC細胞を培養し、VEGF共存化で血管形成を起こさせる系に、血管構造を安定化させる効果のあるヒト Ang-1を添加して、Ang-1の血管形成促進効果について検討した。

一方、血管新生抑制効果があるという報告のあるフラボノイドについて、同じHUVEC培養血管形成系を用いて、その効果について検討した。フラボノイドとは、植物が合成する2次代謝産物であり、フリーラジカル電子対を吸収し、細胞内シグナル伝達において、酵素の阻害など様々な作用が知られている。本研究では、フラボノイドであるアピゲニンとケルセチン、ルテオリン、ポリフェノールであるレスベラトロールを用いて、血管形成抑制効果について検討した。

The Research for Inhibition and Promotion of Angiogenesis Factor

Takahiro SHIMAZAKI, Chikako YOSHIDA-NORO

2. 材料と方法

2.1 血管新生促進因子による血管形成

血管新生キット（クラボウ）を用いて、HUVECsの培養を行った。24穴ウェルプレートに、VEGF+ ヒトAng-1 Recombinantを800ng/ml・400ng/ml・200ng/ml・100ng/mlを加えた。また、VEGF+ヒトAng-1産生CHO細胞とVEGF+マウス脱分化脂肪細胞（Dedifferentiated fat cells）DFAT-D1細胞を 8.0×10^5 ・ 4.0×10^5 ・ 2.0×10^5 ・ 1.0×10^5 (cells/ml)と濃度別になるようにウェルに加えた。また別のウェルに、ヒトAng-1産生CHO細胞のconditioned medium (DMEM+10%FBS+1%PS培養3日)を200 μ l、150 μ l、100 μ l、50 μ lと添加し、11日間の培養を行った。その後、血管新生ソフトウェア（クラボウ）を用いて、血管組織構造における管腔長・管腔面積・管腔交差点数・パス本数の4種の数値解析を行った。

2.2 フラボノイドによる血管新生抑制

上記と同様に、血管新生キット（クラボウ）を用いて、HUVECの培養を行った。24穴ウェルプレートに、VEGF+アピゲニン2.0mM・1.0mM・0.50mM・0.25mMを加えた。また、VEGF+ルテオリン、VEGF+ケルセチン、VEGF+レスベラトロールを各々20mM・10mM・5.0mM・2.5mMと濃度別に各ウェルプレートに入れ、11日間の培養を行った。その後、血管新生ソフトウェア（クラボウ）を用いて、血管組織構造における管腔長・管腔面積・管腔交差点数・パス本数の4種の数値解析を行った。

3. 結果及び考察

血管新生促進因子添加の実験においては、Recombinant Ang-1、ヒトAng-1産生CHO細胞およびそのconditioned mediumの添加によって血管形成促進の効果が見られたことから、Ang-1の血管組織安定化効果が確かめられた。また間葉系幹細胞DFATにも血管形成促進効果があることが確認できた（Fig.1）。

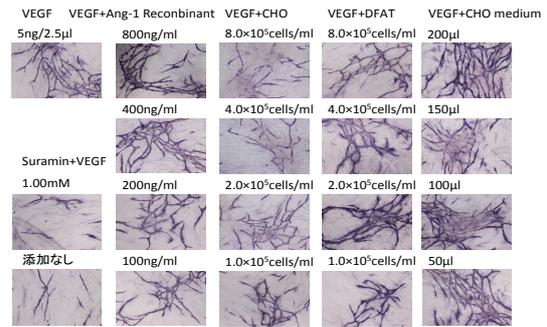


Fig.1 血管新生促進因子による血管形成

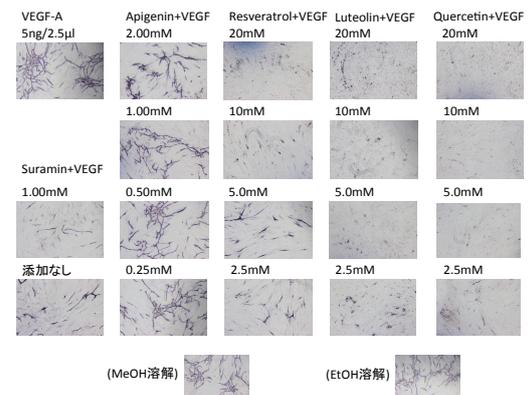


Fig.2 フラボノイドによる血管新生抑制

一方、フラボノイド添加による血管形成実験では、フラボノイドによって血管形成が抑制されることがわかった（Fig.2）。さらに、血管新生定量による数値化解析結果から、フラボノイド濃度依存的に抑制作用があることが確かめられた。特に、ルテオリンとケルセチンによる血管形成の阻害は、顕著であった。本講演会では、より詳細な血管形成促進・抑制に関する実験の結果・考察、およびその作用機序について報告する。

「参考文献」

- 1) Eleni Bagli, Maria Stefanidou, Lucia Morbidelli, *et al. Cancer Res*; **64**, 7936-7946 (2004)
- 2) Myoung H. Kim *. *Journal of Cellular Biochemistry* **89**, 529-538 (2003)
- 3) Kai Heng Lam, Deepa Alex, In Kei Lam, Stephen Kwok Wing Tsui, Zi Feng Yang, and Simon Ming Yuen Lee. *Journal of Cellular Biochemistry* **112**, 3313-3321 (2011)