

培養角膜実質細胞は、血管内皮細胞が毛細血管様 構造物を形成するよう誘導する

中安 清夫¹⁾, 林 信人¹⁾, 佐藤 昇²⁾, 沖坂 重邦¹⁾

¹⁾ 防衛医科大学校眼科学教室, ²⁾ 防衛医科大学校第2生化学教室

要 約

牛副腎皮質由来の単離された毛細血管内皮細胞を家兎角膜実質細胞と共培養することにより、血管内皮細胞が遊走・増殖して管腔を形成し、毛細血管様索状物が誘導されることを見出した。この索状物は共培養12日目までに伸展・枝分かれ・吻合し、毛細血管様のネットワークを形成した。電子顕微鏡を用いた観察では、この索状物は3～8個の血管内皮細胞によって囲まれた管腔構造を有し、重層化した角膜実質細胞の層間に位置していた。また、索状構造物の周囲には基底膜様の膠原細線維が観察された。このような培養血管内皮細胞の毛細血管様索状物への分化に対し、角膜実質細胞の産生・分泌する細胞間物質が重要な役割をはたしているものと考えられた。また、この実験系は *in vitro* における角膜血管新生の研究法として有用な方法であろうと考えられた。(日眼会誌 96: 695—701, 1992)

キーワード: 血管新生, 血管内皮細胞, 角膜実質細胞, 細胞分化, 培養細胞

In Vitro Formation of Endothelial Cells into Capillary-like Cords is Promoted by Keratocytes

Kiyoo Nakayasu¹⁾, Nobuhito Hayashi¹⁾, Noboru Sato²⁾
and Shigekuni Okisaka¹⁾

¹⁾ Department of Ophthalmology, National Defense Medical College

²⁾ Department of Biochemistry, National Defense Medical College

Abstract

When isolated bovine capillary endothelial cells were co-cultivated with rabbit corneal keratocytes, capillary-like cords extended actively from the capillary endothelial cells in multilayers of keratocytes. The developing cords continued to elongate, branch out and anastomose with each other, forming a capillary-like network by the 12th day of co-culturing. Electron microscopic observation revealed that the cords had tubular structures, which were composed of 3-8 endothelial cells in the multilayers of keratocytes, and that a basal-like matrix was situated on the outer surface of the endothelial cells. The roles of keratocytes in the cord formation by capillary endothelial cells were discussed. This simple *in vitro* experimental system is proposed as a useful tool in the study of corneal neovascularization. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 695—701, 1992)

Key words: Neovascularization, Capillary endothelial cell, Keratocyte, Cell differentiation, Culture cell

別刷請求先: 359 所沢市並木3-2 防衛医科大学校眼科学教室 中安 清夫

(平成3年10月31日受付, 平成4年1月17日改訂受理)

Reprint requests to: Kiyoo Nakayasu, M.D. Department of Ophthalmology, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa-shi 359, Japan

(Received October 31, 1991 and accepted in revised form January 17, 1992)

I 緒 言

角膜血管新生は角膜の創傷や潰瘍の治癒を促進させるという点では有益な生体反応と考えることができる。しかし、逆に角膜の透過性を減弱し、重篤な視力障害の原因とも成り得る。今日まで角膜血管新生の発症機構について多くの秀れた研究がなされており、いくつかの仮説が立てられている。1949年 Cogan¹⁾は角膜新生血管が発症する際には、小さな出血が起こり実質に浮腫が生じるため、角膜実質の膠原線維の密度が局所的に低下し、新生血管の角膜実質内侵入を容易にさせているとし、局所的な角膜実質浮腫を角膜新生血管発症の重要な要因であろうと考えた。しかし、その後、臨床的に角膜浮腫が生じなくとも新生血管が起こり得ること、逆に水疱性角膜症の様に実質浮腫があっても血管が角膜に侵入しない事があることから、必ずしも実質浮腫が角膜新生血管発症の必要条件とは言い難いとの批判を受けた²⁾³⁾。その後、角膜新生血管発症の機構解明のための研究は、主に生化学的分野に移り、角膜組織内における血管造成因子の存在^{4)~6)}、血管抑制因子の減弱化説⁷⁾、低酸素状態⁸⁾⁹⁾や乳酸の役割¹⁰⁾、炎症反応の関与¹¹⁾などが論じられてきた。しかし、いずれの説においても、Coganの浮腫説同様、1つの仮説ですべての血管新生を説明することはできず、それぞれの仮説に対し、種々の批判が指摘されている。このように角膜血管新生の発症機構について未だ不明な点が多く残されているのが現状であり、これらの解明のためには血管新生をより単純化できる *in vitro* での実験系の開発が必要と思われる。

一方、種々の血管内皮細胞を単離し、比較的長期間培養する方法¹²⁾が確立されるに及んで、*in vitro* で培養血管内皮細胞から毛細血管様構造物を作製し、新生血管発症の解析に利用しようとする試みが、Folkman¹³⁾の報告以来種々の血管内皮細胞を用いてさかんに行われつつある。今回、我々も角膜新生血管発症機構の解明を最終目的として、培養角膜実質細胞と単離した毛細血管内皮細胞を共培養することにより、血管内皮細胞から毛細血管様構造物の作製を試み、満足すべき結果を得たので報告する。

II 方 法

1. 角膜実質細胞、結膜実質細胞および血管内皮細胞の培養

角膜実質細胞および結膜実質細胞は、体重約2~3

kgの白色家兎眼球より得た。すなわち、家兎角膜の上皮細胞層および内皮細胞が付着したデスメ膜を機械的に剝離除去した後、角膜実質層を約2mm角に細切した。0.2%コラゲナーゼ(和光純薬)で30分間処理した後、35mm培養皿底に附着させ、10%牛胎児血清(以下FBS)加Dulbecco's modified Eagle Medium(以下DMEM, GIBCO, Grand Island, NY)を用いて角膜実質片から実質細胞が伸展し confluent となるまで約14日間培養した。その後、0.25%トリプシン(和光純薬)+0.05%EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid, 和光純薬)溶液で細胞を培養皿から解離させ、細胞を1:4の割合で35mm培養皿に播種し、第2代培養細胞とした。10%FBS加DMEMで confluent となるまで約20日間培養した後、実験に供した。結膜実質細胞も角膜実質細胞と同様の方法で培養した第2代培養細胞を実験に供した。

毛細血管内皮細胞は、Folkman¹³⁾の方法で牛副腎皮質より単離した。すなわち、牛副腎皮質を約1mm角に細切した後、0.5%コラゲナーゼにて室温で約1時間処理した。さらに100 μ m径のナイロンメッシュフィルター(Nitex Mono Screen Cloth, HC 3-110, Tetko, Elmsford, NY)で濾過し、110 μ m以上の組織片および大血管を除去した。フィルターを通過した毛細血管分画は、650 rpm 7分間で遠沈し、10%FBS加DMEMで3回洗浄した後、10%FBS加DMEM中に浮遊させゼラチンを塗布した60mm径の培養皿に播種した。播種2時間後に培養液を交換し、培養皿底に附着していない非血管内皮細胞を可能な限り除去した。

培養2、3日目に通常2~4個の血管内皮細胞からなるコロニーを確認し、培養皿底に附着したその他の細胞をパスツールピペットを用いて吸引またはラバーポリースマンで機械的に剝離除去した。さらに4日目には内径約5mmのガラスリングを各々の血管内皮細胞コロニーを囲むように設置し、培養液をこのリング内のみ添加し、約3日間培養した。リング内の細胞数の増加を確認し、リングをはずした後、通常の方法で10%FBS加DMEMで培養し、confluent となる約3週間に1度の間隔で継代培養した。継代培養された血管内皮細胞は、実験に供する際、acetylated low density lipoprotein labeled with dioctadecyl tetramethyl indocarbocyanine perchlorate(以下DiI-Ac-LDL)(Biomedical Tech. Inc. Stoughton, MA)(10 μ g/ml DMEM)で37 $^{\circ}$ C 4時間処理し、細胞内へのDiI-Ac-LDLの取り込みを蛍光顕微鏡を用いて

観察し、血管内皮細胞であることを確認した¹⁴⁾。

2. 角膜実質細胞または結膜実質細胞と血管内皮細胞との共培養

約20日間培養した第2代の角膜実質細胞または結膜実質細胞上に 4×10^4 個/35 mm wellの第10代から第14代目の毛細血管内皮細胞を添加し、10%FBS加DMEM培養液で培養した。共培養後倒立顕微鏡による観察は12日目まで毎日行い、培養液は2日毎に交換した。

共培養12日目に、培養細胞を0.1Mリン酸緩衝液で3回洗浄した後、1%グルタルアルデヒドと4%ホルマリンの混合液にて前固定し、電子顕微鏡用資料とした。これらの細胞はさらに1%四酸化オスミウムにて後固定した後、エタノールを用いた通常の方法で脱水し、エボン包埋した。電子顕微鏡用の超薄切片作製後、酢酸ウランおよびクエン酸鉛にて二重染色し、JEM 100 C 電子顕微鏡（日本電子）で観察した。

III 結 果

継代培養された血管内皮細胞をDiI-Ac-LDLで処理した後、蛍光顕微鏡で観察すると、DiIの赤色蛍光がすべての細胞で観察され、これらの細胞が血管内皮細胞であることを確認した(図1)。20日間培養した第2代角膜実質細胞はすでにconfluentとなっており、細胞の形状は紡錘型であった。これらの角膜実質細胞上に播種した血管内皮細胞(図2-1)は、共培養2日目には実質細胞との鑑別がやや困難となり、一見消失したかのように思われた。しかし、培養実質細胞間の所々に血管内皮細胞が伸展したと考えられる細長い細胞が数個集合している所見も観察された(図2-2)。共培養4日目になると、索状構造物は明確に観察されるようになり(図2-3)、さらにそれ以後、索状物は伸展を続け、分枝または吻合し、共培養12日目までに毛細血管様のネットワークを形成しているのが観察された(図2-4)。

結膜実質細胞上に播種した血管内皮細胞も、上記とほぼ同様の経過をたどって毛細血管様の構造物が形成された。しかし、角膜実質細胞と共培養した場合に比べ、形成された構造物はやや直線的になる傾向を示した(図3-1, 2)。

一方、同数の毛細血管内皮細胞のみを通常の培養皿で12日間培養した場合には、血管内皮細胞に特徴的とされる敷石状の配列を示す単層の細胞が観察されるのみで、索状構造物への形態的分化は認められなかった

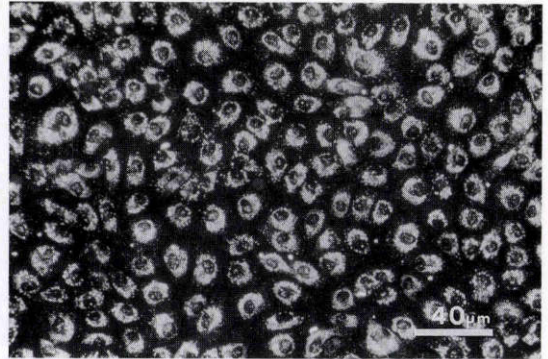


図1 牛副腎皮質由来の培養血管内皮細胞。蛍光顕微鏡写真。

Acetylated low density lipoprotein labeled with dioctadecyl tetramethyl indocarbocyanine perchlorate の取り込み。DiIの赤色蛍光がすべての細胞で観察される($\times 100$)。

(図4)。

共培養12日目の細胞を電子顕微鏡で観察すると、血管内皮細胞由来と考えられる索状構造物は、重層化した角膜実質細胞層の間にサンドイッチ状に挟まれるように位置していた。この構造物は通常3個から8個の血管内皮細胞より構成されており、中央に管腔を有する管状構造を呈していた。細胞間には所々にtight junction様の構造が観察された。また、管腔に面した細胞質には、micropinocytotic vesicleも認められた。一方、内皮細胞の外側周囲の一部には基底膜様の膠原細線維も観察された。管腔内には時に変性細胞の崩壊産物と思われる構造物が観察されることもあった(図5)。

結膜実質細胞と共培養した場合の血管内皮細胞由来と思われる索状構造物の電子顕微鏡所見も、角膜実質細胞との共培養の際得られた上記の所見とほとんど一致していた(図6)。

IV 考 按

本実験で、培養家兎角膜実質細胞とともに単離・継代された牛毛細血管内皮細胞を共培養することにより、毛細血管様の管腔構造を有する索状構造物を形成させることができた。この毛細血管様構造物が単離・継代された毛細血管内皮細胞からどのように構築されていくのかという点は、生体内における血管新生の過程との比較で、興味深い。Furcht¹⁵⁾の報告によれば、生体内における血管新生の過程は、既存毛細血管の基

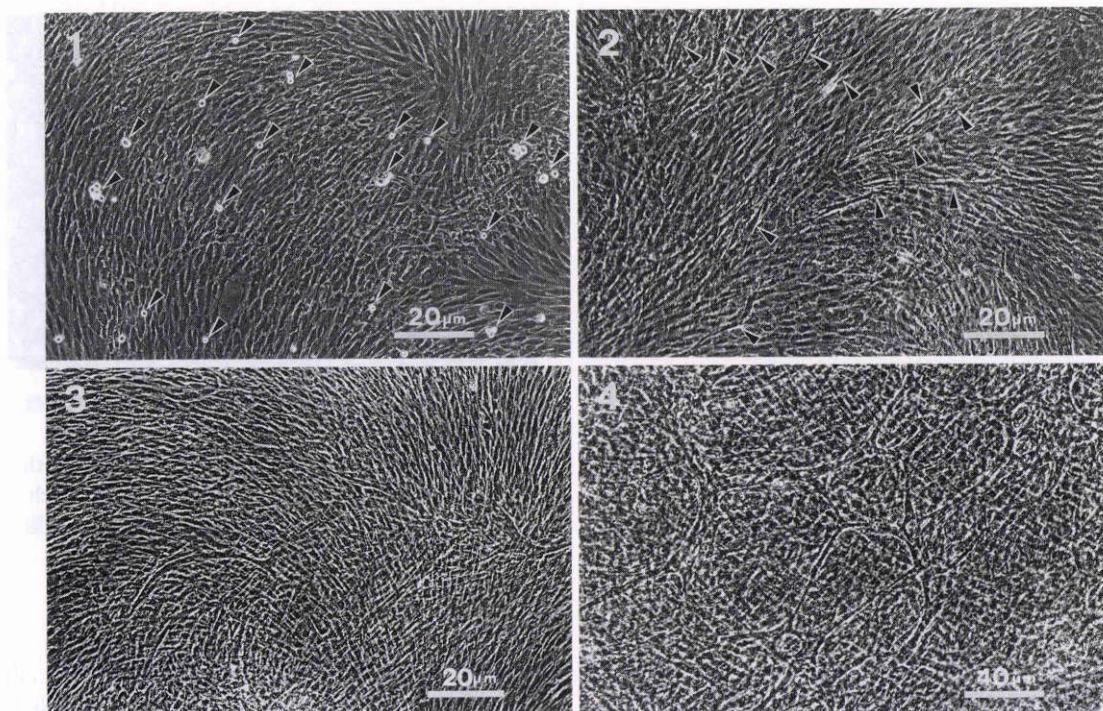


図2 家兎角膜実質細胞上に播種した血管内皮細胞の分化。倒立顕微鏡写真。

1, 共培養直後, 矢印: 血管内皮細胞($\times 50$), 2, 共培養2日目, 矢印: 集合した細長い内皮細胞($\times 50$), 3, 共培養4日目, 分枝した索状物を認める($\times 50$), 4, 共培養12日目, 毛細血管様のネットワークが形成される($\times 100$).

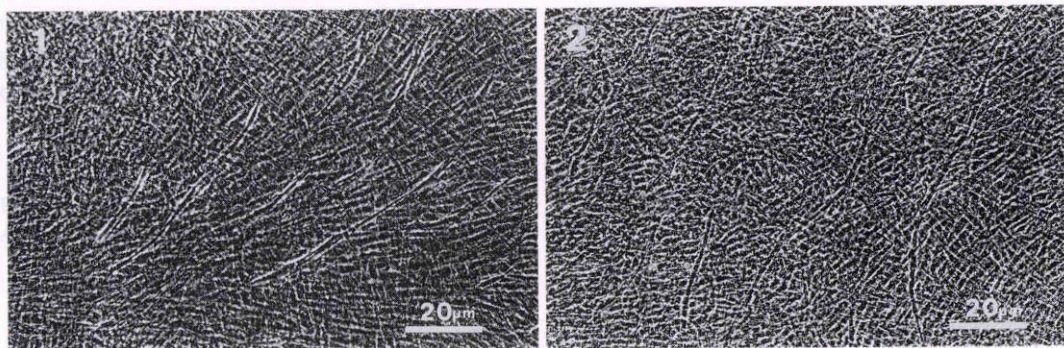


図3 家兎結膜実質細胞上に播種した血管内皮細胞の分化。

1, 共培養4日目($\times 50$), 2, 共培養12日目($\times 50$).

底膜の分解に始まり, 引き続いて血管内皮細胞が発芽するように突出し, さらに遊走と増殖による毛細血管の伸展とそれに伴う他の血管との吻合が起こる。そして, 新生毛細血管が基底膜や周皮細胞に覆われることによって成熟した血管となると考えられている。In vitro における毛細血管様構造物の形成に関してはど

うであろうか。Nicosia ら¹⁶⁾はラット大動脈由来の血管内皮細胞を凝固血漿内で増殖させる実験系で, また Sato ら¹⁷⁾¹⁸⁾はラット副睪丸脂肪組織由来の微小血管断片と筋線維芽細胞との共培養系で, それぞれ管状構造物を形成させた。彼らは, 各々の実験系で形成された管状構造物は数個の内皮細胞が集合し, 細胞間にて

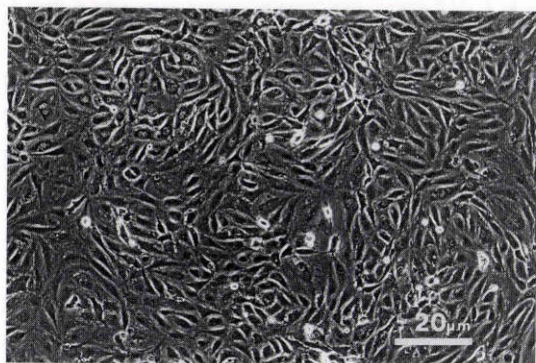


図4 牛副腎皮質由来の培養血管内皮細胞。
培養12日目(×50)。

きた間隙が拡大して管腔に発達するのであろうと推測している。今回の我々の作成した毛細血管様構造物も基本的には Nicosia らの考えと同様の過程を経て構築されると考えている。本実験系では、共培養2日目から4日目にかけての倒立顕微鏡による観察で、不明瞭ではあるものの、内皮細胞由来と思われる細長い細胞が带状に連なって認められた。これらの細胞の一部が徐々に長軸方向に伸展し、tight junction 様構造物を介して索状に連なって形成されたものと推測している。このような構築過程は、生体内において、既存血管内皮細胞が遊走・増殖・伸展し、他血管と吻合しながら新生毛細血管網を形成する過程と極めて類似して

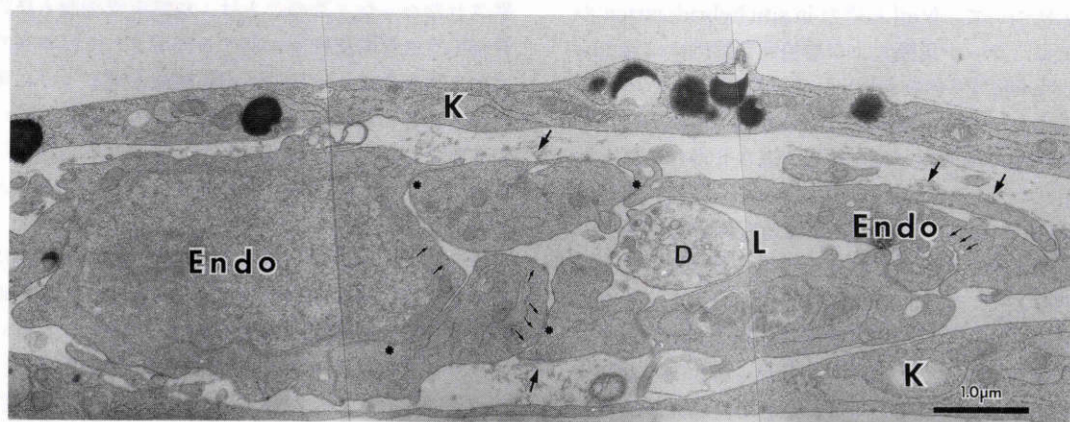


図5 角膜実質細胞と血管内皮細胞との共培養。

12日目の電子顕微鏡写真。K：角膜実質細胞，Endo：血管内皮細胞，L：管腔，D：Debri，大矢印：膠原細線維，小矢印：Micropinocytotic vesicle，*：Tight junction (×13,200)

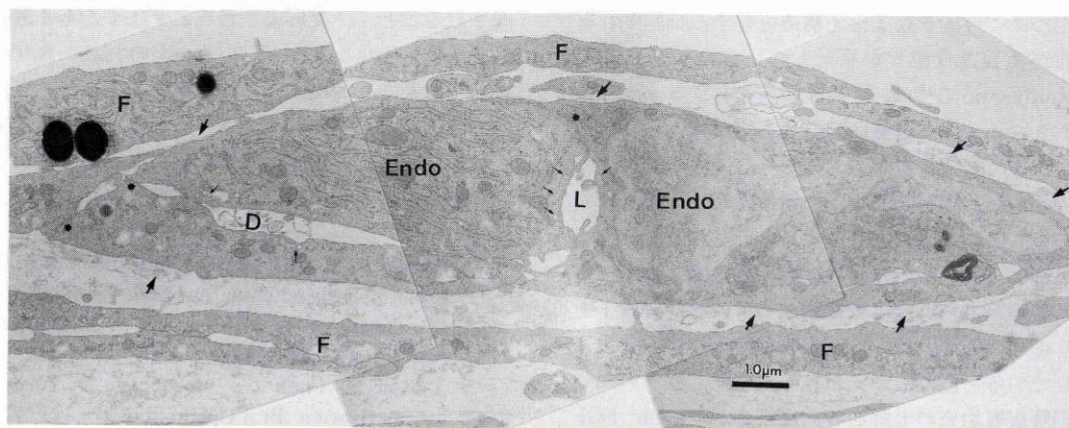


図6 結膜実質細胞と血管内皮細胞との共培養。

12日目の電子顕微鏡写真。F：結膜実質細胞，Endo：血管内皮細胞，L：管腔，D：Debri，大矢印：膠原細線維，小矢印：Micropinocytotic vesicle，*：Tight junction (×8,000)

いるものと思われる。

培養血管内皮細胞が次第に管腔構造を有する毛細血管様の索状構造物に分化していく際の角膜あるいは結膜実質細胞の果たす役割りはどのようなものであろうか。血管内皮細胞を単独で培養した場合、本実験期間内では毛細血管様構造物への分化は全く観察され得なかったことから、共培養した角膜実質細胞または結膜実質細胞が血管内皮細胞の分化に強く関与していることは明らかである。一つの可能性としては、角膜または結膜実質細胞が血管内皮細胞の増殖や分化を促進する何等かの血管造成因子を分泌しているという仮説である。しかし、代表的な血管造成因子の一つである線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor; 以下 FGF) について、Noji ら¹⁹⁾の *in situ hybridization* の報告では、ラット角膜および結膜実質細胞には acidic および basic FGF の mRNA は存在しないと述べている。また、我々も培養角膜実質細胞の培養上清が血管内皮細胞の増殖能をほとんど亢進させ得ないことを確認している (未発表データ)。従って、角結膜実質細胞が FGF を含めた何らかの血管造成因子を産生・分泌し、それが本実験系における毛細血管様構造物の形成に関与しているという仮説は否定的である。もう一つの可能性として、角・結膜実質細胞が産生分泌する膠原線維を始めとする細胞間物質が、血管内皮細胞の分化に関与していることも考えられる。角結膜実質細胞を比較的長期に培養すると、通常 2～3 層の重層構造をとり、その層間に膠原線維などの細胞間物質を分泌する²⁰⁾。本実験系で形成された毛細血管様構造物はこの実質細胞の層間に観察されており、血管内皮細胞の分化にはこのような 3 次元構造を有する細胞間物質の存在が重要な役割りを果たしているのかもしれない。Montesano ら²¹⁾は、3 次元構造を有するコラーゲンマトリックス中で培養血管内皮細胞が分化し索状構造物を形成したと報告しており、その仮説を裏付けている。しかし、細胞間物質が血管造成因子そのものであるという報告は過去に見当たらない。血管内皮細胞の増殖には、何等かの血管造成因子が必要なはずである。本実験系で角結膜実質細胞がその血管造成因子を分泌し得ないとすれば、血管内皮細胞自身が、産生・分泌している可能性が考えられる。事実、我々の用いた牛副腎皮質由来の毛細血管内皮細胞が、basic FGF を産生・分泌しているとする報告²²⁾がなされている。もう一つの血管造成因子の供給源として、培養液に加えた牛胎児血清が考えられる。血清中には種々の物質

が含まれており、当然血管造成因子と成り得る物質も含有されている可能性は十分に考えられる。従って、本実験系で観察された毛細血管様構造物は血管内皮細胞自身および血清由来の何等かの血管造成因子と角結膜実質細胞が産生・分泌した 3 次元構造を有する細胞間物質が補足的に作用して、血管内皮細胞を増殖分化させたかと仮定するのが妥当と思われる。

生体内の正常角膜は無血管組織であり、一方結膜には血管が分布している。従って、血管内皮細胞を角膜実質細胞と共培養した場合と結膜実質細胞と共培養した場合で、当然血管内皮細胞の動態が異なるものと考えられた。しかし、2つの実験系で、毛細血管様構造物の形成過程や形成された構造物にほとんど違いが観察されなかった。このことは、角膜実質細胞も結膜実質細胞も血管内皮細胞に対する作用としては本質的には何ら異なることはなく、結膜組織と同じように角膜組織も血管を角膜実質内に誘導する潜在的な作用が存在することを示しており、*in vivo* における角膜新生血管の成因を考える上で、念頭に置く必要があろうと思われた。

今回、我々の使用した血管内皮細胞は、牛副腎皮質由来の毛細血管内皮細胞であった。本実験系を角膜新生血管の *in vitro* における実験モデルとするためには、本来なら結膜由来の毛細血管内皮細胞を使用すべきであろう。しかし、我々は、結膜の血管内皮細胞の分離・培養に成功していない。このため、今回の実験では分離・培養法が確立している牛副腎皮質由来の血管内皮細胞を使用した。しかし、この実験系は短時間で比較的容易に、そして確実に毛細血管様索状物が形成されること、一度形成されると少なくとも 4 週間は培養維持可能なことなど、いくつかの利点があり、角膜新生血管の *in vitro* における実験系として、充分使用できるものと思われた。さらに、種々の物質・薬剤の血管造成に対する促進作用や抑制作用の *in vitro* における検討にも有用ではないかと思われた。

文 献

- 1) Cogan DG: Vascularization of the cornea. Its experimental induction by small lesions and a new theory of its pathogenesis. *Arch Ophthalmol* 41: 406-416, 1949.
- 2) Ashton N, Cook C: Mechanism of corneal vascularization. *Br J Ophthalmol* 37: 193-209, 1953.
- 3) Baum JL, Martola EL: Corneal edema and corneal vascularization. *Am J Ophthalmol* 65:

- 881—884, 1968.
- 4) **Maurice DM, Azuberman H, Michaelson IC**: The stimulus to neovascularization in the cornea. *Exp Eye Res* 5: 168—184, 1966.
 - 5) **Klintworth GK**: The hamster cheek pouch: An experimental model of corneal neovascularization. *Am J Pathol* 73: 691—710, 1973.
 - 6) **Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, et al**: A heparin-binding angiogenic protein-basic fibroblast growth factor-is stored within basement membrane. *Am J Pathol* 130: 393—400, 1988.
 - 7) **Kuettner KE, Croxen RL, Eisenstein R, et al**: Proteinase inhibitor activity in connective tissues. *Experientia* 30: 595—597, 1974.
 - 8) **Binder PS**: Complications associated with extended wear soft contact lenses. *Ophthalmology* 86: 1093—1101, 1979.
 - 9) **Nesburn A**: Complications associated with therapeutic soft contact lenses. *Ophthalmology* 86: 1130—1137, 1979.
 - 10) **Jensen JA, Hunt TK, Scheuenstuhl H, et al**: Effect of lactate, pyruvate and pH on secretion of angiogenesis and mitogenesis factors by macrophages. *Lab Invest* 54: 574—578, 1986.
 - 11) **Fromer CH, Klintworth GK**: An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal neovascularization. I. Comparison of experimental models of corneal vascularization. *Am J Pathol* 79: 537—554, 1975.
 - 12) **Folkman J, Haudenschild CC, Zetter BR**: Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5217—5222, 1979.
 - 13) **Folkman J, Haudenschild CC**: Angiogenesis in vitro. *Nature (London)* 288: 511—556, 1980.
 - 14) **Voyta JC, Netland PA, Via DP, et al**: Specific labelling of endothelial cells using fluorescent acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* 99: 81A, 1984.
 - 15) **Furcht LT**: Critical factors controlling angiogenesis: Cell products, cell matrix and growth factors. *Lab Invest* 55: 505—509, 1986.
 - 16) **Nicosia RF, Tchao R, Leighton J**: Histotypic angiogenesis in vitro: Light microscopic, ultrastructural and radioautographic studies. *In Vitro* 18: 538—548, 1982.
 - 17) **Sato N, Sawasaki Y, Senoo A, et al**: Development of capillary networks from rat microvascular fragments in vitro: The role of myofibroblastic cells. *Microvasc Res* 33: 194—210, 1987.
 - 18) **佐藤 昇, 後藤 完**: In vitro の血管新生. 組織培養研究 5: 81—94, 1987.
 - 19) **Noji S, Matuo T, Koyama E, et al**: Expression pattern of acidic and basic fibroblast growth factor genes in adult rat eyes. *Biochem Biophys Res Com* 168: 343—349, 1990.
 - 20) **雑賀司珠也, 金川龍一, 上野山謙四郎, 他**: 培養角膜実質細胞に対する L-アスコルビン酸-リン酸の影響 (第2報). 日眼会誌 95: 39—44, 1991.
 - 21) **Montesano R, Orci L, 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.
 - 22) **Schweigerer L, Neufeld G, Friedman J, et al**: Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature* 325: 257—259, 1987.