

ヒアルロン酸の毛細血管内皮細胞の増殖・分化に及ぼす影響

渡部 通史¹⁾, 中安 清夫²⁾, 沖坂 重邦¹⁾

¹⁾防衛医科大学校眼科学教室, ²⁾順天堂大学医学部眼科学教室

要 約

ヒアルロン酸と、角膜・硝子体に発生する新生血管との関係を調べる基礎実験として、牛副腎由来の培養毛細血管内皮細胞を用いて、ヒアルロン酸の毛細血管内皮細胞に対する影響を検索した。ヒアルロン酸を添加した培地での毛細血管内皮細胞増殖は、ヒアルロン酸濃度が高くなるにつれ、抑制された。毛細血管内皮細胞を角膜実質細胞と共培養すると、毛細血管内皮細胞は血管様構造物を形成したが、ヒアルロン酸をこの培養系に添加すると、血管様構造物の形成が対照に比べ抑制された。I型コラーゲンゲル内で毛細血管内皮細胞を培養しても毛細血管内皮細胞は血管様構造物を形成したが、ヒアルロン酸添加培地では対照に比べ、構造物の抑制傾向が認められた。由来、分子量の異なったヒアルロン酸の比較では、毛細血管内皮細胞増殖、毛細血管構造物の形成に有意差は認められなかった。(日眼会誌: 97 1034—1039, 1993)

キーワード: ヒアルロン酸, 毛細血管内皮細胞, 角質実質細胞, 細胞培養, I型コラーゲンゲル

The Effect of Hyaluronic Acid on Proliferation and Differentiation of Capillary Endothelial Cells

Michifumi Watanabe¹⁾, Kiyoo Nakayasu²⁾ and Shigekuni Okisaka¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, National Defense Medical College

²⁾Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine

Abstract

The effects of hyaluronic acid (HA) on capillary endothelial cells were studied in cell culture. The capillary endothelial cells were obtained from the bovine adrenal cortex. The proliferation of endothelial cells was inhibited by the addition of HA to the culture medium. Significant inhibition was observed consistently at concentrations of 100 μ g/ml or greater. Capillary-like networks were formed by the differentiated endothelial cells in co-culture with rabbit corneal keratocytes and in type I collagen gels. They were inhibited by the addition of HA at a concentration of 200 μ g/ml. The cell proliferation and differentiation were not significantly affected by different HA molecular weights. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 1034—1039, 1993)

Key words: Hyaluronic acid, Capillary endothelial cells, Keratocytes, Cell culture and type-I collagen gels

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 渡部 通史

(平成 5 年 1 月 28 日受付, 平成 5 年 4 月 1 日改訂受理)

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

(Received January 28, 1993 and accepted in revised form April 1, 1993)

I 緒 言

ヒアルロン酸はFeinbergら¹⁾, Orlidgeら²⁾, Westら³⁾の研究による細胞外物質として組織の血管の成長および新生血管の発生に関与していることが指摘されている。しかしながら、角膜、硝子体の無血管構造およびこれらの新生血管の発生にヒアルロン酸が関与しているかどうかは十分な報告はされておらず、Feinbergら¹⁾の胎生期の鶏に角膜および他の臓器、またはヒアルロン酸重合体を移植し、移植部位での血管の形成が抑制されたという報告があるのみである。そこで今回、我々は角膜、硝子体の新生血管とヒアルロン酸との関係を調べる手がかりとして、培養毛細血管内皮細胞を用いてヒアルロン酸の血管内皮細胞増殖能、分化能に及ぼす影響を調べ、若干の知見を得たので報告する。

II 方 法

牛副腎由来の毛細血管内皮細胞(BCEC)はFolkmanら⁴⁾の方法で分離し、第5～10代の継代培養されたものを使用した。角膜実質細胞(RK)は成熟白色家兎から採取し、第2～4代の継代培養細胞を使用した。ヒアルロン酸は豚皮膚由来(PHA, 分子量4～6万, 生化学工業), 人臍帯由来(HHA, 分子量80～120万, 生化学工業), 牛硝子体由来(BHA, 分子量未測定, SIGMA)の3種類のヒアルロン酸を使用した。培地はDulbecco's modified eagle medium (DMEM) 溶液に牛胎児血清(FCS)を10%の濃度で添加し、さらに抗生剤(ペニシリン, ストレプトマイシン), 抗真菌剤(アムホテシリンB)を添加したものを使用した。I型コラーゲンゲルはセルマトリックス Type IA® (新田ゼラチン)を使用した。

実験1

(1) BCECを35 mmの培養皿に各々 3×10^4 /well播き, PHA, HHAのヒアルロン酸を20 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ の4段階, BHAでは50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ の3段階の濃度に分けて添加した培地(DMEM+10% FCS)で5日間培養し, 培養後, 細胞数自動血球測定器(エルマ社製)にてヒアルロン酸無添加の対照と比較した。

(2) RKについても同様の実験を行った。ただし、ヒアルロン酸濃度は100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ の2段階とした。

(1), (2)とも各群のサンプル数は4とした。

実験2

RKを35 mmの培養皿に2週間培養した後, その上にBCECを 5×10^4 /well播き, 通常培地(対照), PHA, HHAの2種類のヒアルロン酸をそれぞれ100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加した培地で4週間培養し, 形成された毛細血管様構造物を観察した。培養皿は各群ともそれぞれ2枚ずつとした。各培養皿で形成された毛細血管様構造物を任意の3部位でそれぞれ写真撮影し, 各群で得られた合計4枚の写真についてコンピュータ画像処理装置(SPICCA II, 日本アビオニクス)を使用して各々の毛細血管様構造物の総延長距離を測定し, その平均を各群毎に比較した。印画紙は89倍に拡大したものを使用した。

実験3

I型コラーゲンゲルを35 mmの培養皿に敷き, ゲル化させた後, その上にBCECを 1×10^4 /well播いた。さらにその上にI型コラーゲンゲルを敷き, BCECがサンドイッチ状になるようにして, 通常培地, PHA, HHAの2種類のヒアルロン酸をそれぞれ200 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加した培地で3週間培養し, 形成された毛細血管構造物を観察した。培養皿は各群とも2枚ずつとした。実験2と同様の方法で, 毛細血管様構造物の総延長距離を測定し, 比較した。

III 結 果

培養後5日後のBCEC数は, どのヒアルロン酸についても濃度依存的に減少し, 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上ではいず

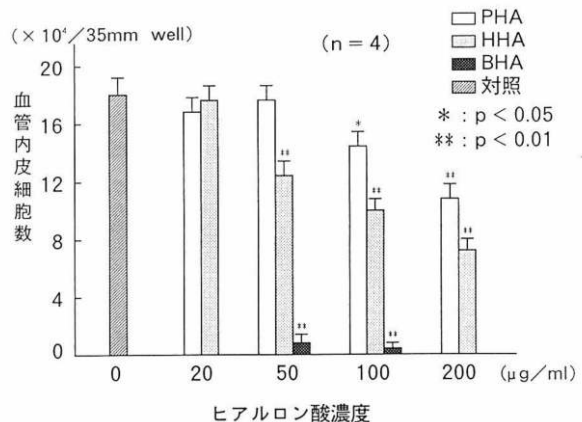


図1 実験1結果. PHA(豚皮膚由来ヒアルロン酸), HHA(人臍帯由来ヒアルロン酸), BHA(牛硝子体由来ヒアルロン酸)を各々20 $\mu\text{g/ml}$ ～200 $\mu\text{g/ml}$ 添加し, 5日間培養した後の血管内皮細胞(BCEC)数。

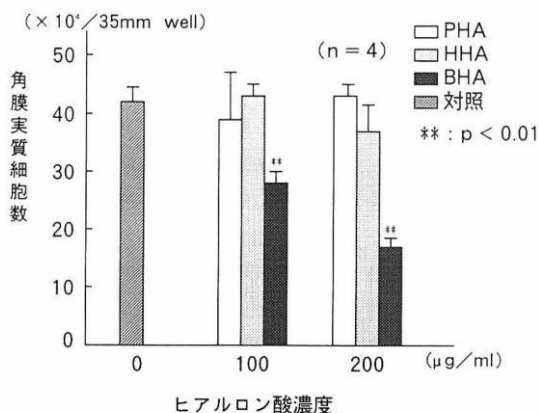


図2 実験1結果. 培養5日後における各群ごとの角膜実質細胞(RK)数.

れのヒアルロン酸でも通常培地に比べ統計学的に有意に減少し、細胞増殖は抑制されていた(図1). しかし、BHA添加群については細胞減少が著明で、細胞増殖の抑制というよりはむしろ細胞障害のための細胞数の減少が考えられた. また、PHA添加群とHHA添加群を比較すると、50 µg/ml から200 µg/ml の範囲でHHA添加群がやや強い抑制傾向を示した(図2). RKでは100 µg/ml から200 µg/ml の範囲でPHAおよびHHA添加群と無添加の対照群では、RK数に有意差はなく、ヒアルロン酸は角膜実質細胞増殖能にほとんど影響を与えなかった. しかし、BHA添加群では100 µg/ml, 200 µg/ml で、いずれも対照群に比べRK細胞数は有意に減少していた(図2).

実験2

共培養4週間後では対照群、PHA、HHA添加群と

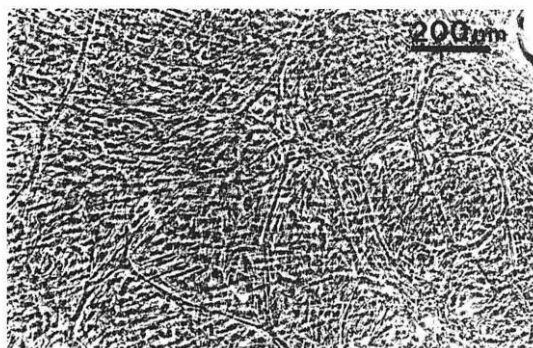


図3 実験2結果. 角膜実質細胞(RK)と4週間共培養した血管内皮細胞(BCEC)の毛細血管様構造物形成. 対照群.

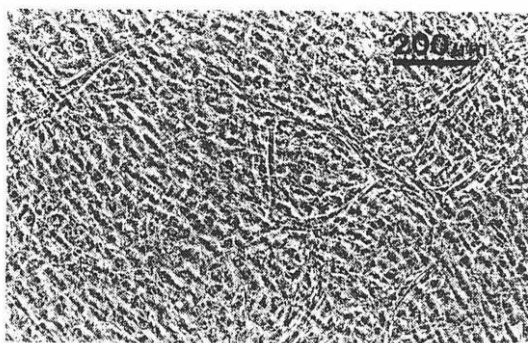


図4 実験2結果. PHA(豚皮膚由来ヒアルロン酸)100 µg/ml 添加培地で角膜実質細胞(RK)と4週間共培養した血管内皮細胞(BCEC)の毛細血管様構造物形成の状態.

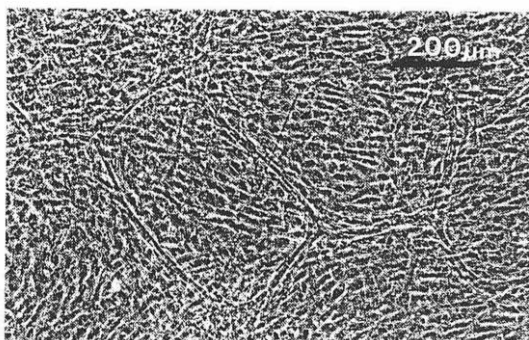


図5 実験2結果. HHA(人臍帯由来ヒアルロン酸)100 µg/ml 添加培地で角膜実質細胞(RK)と4週間共培養した血管内皮細胞(BCEC)の毛細血管様構造物形成の状態.

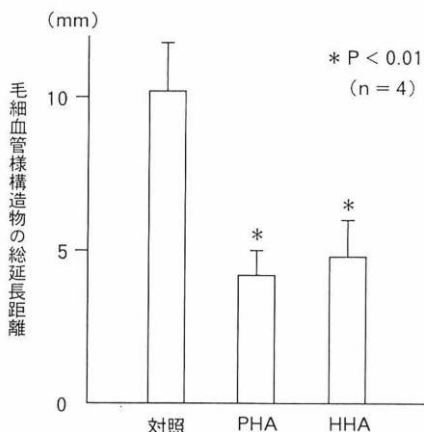


図6 実験2結果. 各群ごとの毛細血管様構造物の総延長距離.

も BCEC による毛細血管様構造物が認められた。しかし、対照群ではネットワークを形成し、よく発達していたが、2 種類のヒアルロン酸添加群では対照群と比

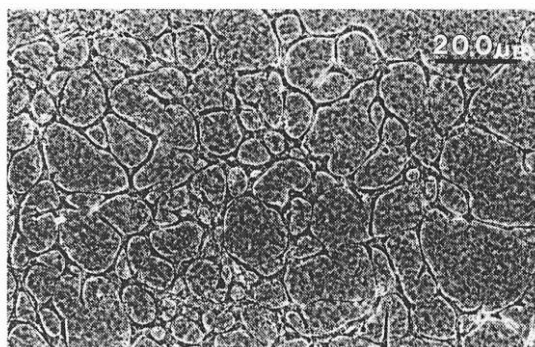


図 7 実験 3 結果。コラーゲンゲル内における培養 4 週間後の血管内皮細胞 (BCEC) の毛細血管様構造物形成。対照群。

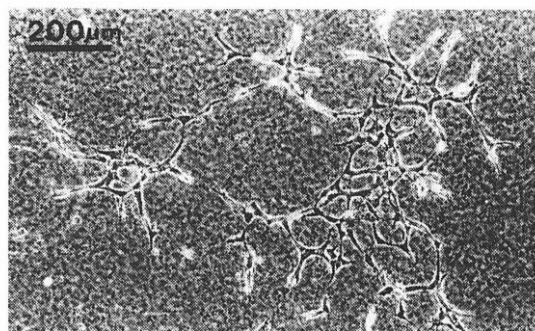


図 8 実験 3 結果。PHA (豚皮膚由来ヒアルロン酸) 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加培地における血管内皮細胞 (BCEC) のコラーゲンゲル内毛細血管様構造物形成の状態。

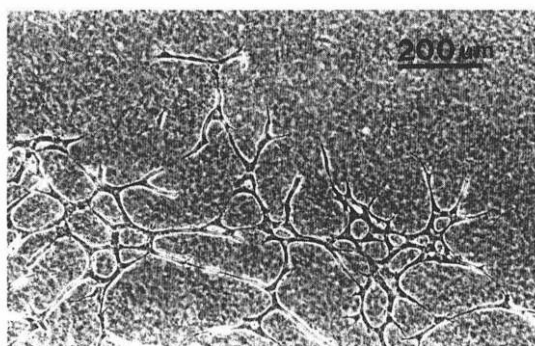


図 9 実験 3 結果。HHA (人臍帯由来ヒアルロン酸) 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加培地における血管内皮細胞 (BCEC) のコラーゲンゲル内毛細血管様構造物形成の状態。

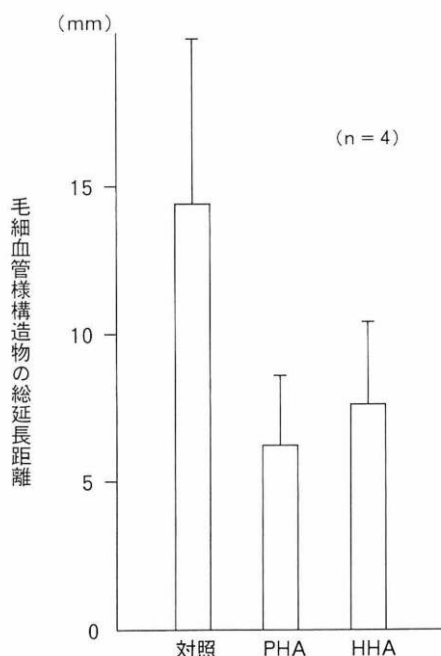


図 10 実験 3 結果。各群ごとの毛細血管様構造物の総延長距離。

べ、いずれも毛細血管様構造物の形成が少ない傾向が認められた (図 3 ~ 5)。画像処理による毛細血管様構造物の総延長距離は、PHA、HHA 添加群でいずれも対照群の 1/2 以下と有意に短くなっており、角膜実質細胞間での BCEC の分化および増殖が抑制されていた。また、PHA、HHA 添加群の間では総延長距離に有意差は認められなかった (図 6)。

実験 3

コラーゲンゲル層間で 3 週間培養した BCEC は、いずれの群においても毛細血管様構造物を形成した。対照群で BCEC は長軸方向に伸展し、互いに結びついてよく発達していた。また、2 種類のヒアルロン酸添加群では対照群と同様の毛細血管様構造物が認められたが、そのネットワーク形成は対照群よりもやや未発達のように思われた。画像処理による毛細血管様構造物の比較では、2 種類のヒアルロン酸添加群では対照群に比べ毛細血管様構造物の形成が約 1/2 であったものの、SD 値が大きかったためか有意差は認められなかった。また、PHA、HHA 添加群の間では総延長距離に有意差は認められなかった (図 9, 10)。

IV 考 按

実験1で使用したヒアルロン酸は、豚皮膚由来(PHA, 生化学工業), 人臍帯由来(HHA, 生化学工業), 牛硝子体由来(BHA, SIGMA)の3種類である。このうちBHA 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加培地で培養したBCECは、培養5日間ではほとんど消失した。また、角膜実質細胞(RK)の増殖に対しても有意に抑制されており、BHAが血管内皮細胞の増殖能を特異的に抑制しているとは考え難く、BHA製剤中に細胞外毒素(エンドトキシン)などの混入物が存在し、これが非特異的に細胞を傷害し、細胞数の減少をもたらしたと考えた方が妥当のように思われた。一方、PHA, HHAを添加した場合は、BCECは濃度依存的に細胞数が抑制されていた。また、同様の濃度範囲でRKの増殖能には全く影響を与えていないことから、PHA, HHAは一定の特異性を持ってBCECの増殖能を抑制しているものと考えられた。以上のことから、BHAは本実験には有用でないと考え、以下の実験2, 3についてはPHA, HHAについてのみ検索することとした。

RKとの共培養およびコラーゲンゲル内で培養細胞が毛細血管様構造物を形成することは、中安ら⁶⁷⁾, Montesanoら⁸⁾が報告しており、またFolkmanら⁵⁾はゼラチンを塗布した培地においても長期間培養すると毛細血管様構造物を形成すると報告している。実験2, 3においては、これらの*in vitro*における実験系を用いてヒアルロン酸のBCECの三次元的分化能に対する影響を観察した。しかしながら、これらの実験系では、BCECの分化能のみならず、増殖能をも含めたBCECから毛細血管様構造物への三次元的な発達、成長過程を反映している。したがって、本実験系は*in vitro*系でありながら、*in vivo*の状態に極めて近い実験系と思われる。しかし、逆に本実験系に何らかの血管成長因子あるいは抑制因子を添加した場合、種々の血管新生過程のどの過程のどの部位に添加物質が作用しているのか判断が困難となる。今回の実験2, 3においてもヒアルロン酸は、BCECの毛細血管様構造物への発達、成長を抑制する傾向を示していたものの、その作用機序は不明であった。実験1の結果から、ヒアルロン酸がBCECの増殖能に対して抑制的に作用していることは見出せたものの、BCECの三次元構造への分化能に対する直接的な作用については、今回の実験のみで結論付けるのはやや早計であると思われた。しかし、細胞外物質が血管内皮細胞の分化に重要

な役割を果たしていることは、これまで報告されており⁶⁷⁾、ヒアルロン酸も細胞外物質の1つとして血管の三次元構造への分化と何らかの形で関与しているものと推測される。

血管新生とヒアルロン酸との関係については、*in vivo*においてFeinbergら¹⁾がヒアルロン酸重合体を胎生期肢芽の有血管領域に移植し、移植部位が無血管領域に変化したとする報告がある。*in vitro*においては、血管内皮細胞とヒアルロン酸の関係についてOrlidgeら²⁾がヒアルロン酸をあらかじめ培養皿に塗布した培地で培養毛細血管内皮細胞の培養皿への接着がよくなったと報告しており、Westら³⁾は高分子、高濃度のヒアルロン酸を添加した培地で培養大動脈血管内皮細胞の増殖が抑制されたとしている。今回の実験では、分子量の異なるPHA, HHAの2種類のヒアルロン酸について比較したが、実験1でHHAがやや強い抑制傾向を示したものの、実験1~3を通じて両者の間に明らかな差を認めず、ヒアルロン酸分子量の違いが毛細血管内皮細胞に与える影響は見出せなかった。しかし、濃度については実験1より濃度依存的に毛細血管内皮細胞数が減少し、Westら³⁾の結果と一致した。Westら³⁾は培養大動脈血管内皮細胞を使用しているが、我々は培養毛細血管内皮細胞を使用しており、今回の実験で、ヒアルロン酸分子量の違いによる結果に差を見出せなかったのは培養血管内皮細胞の種類の違いも1つの理由ではないかと考えられた。ヒアルロン酸がどのように血管内皮細胞に作用するのかについては不明な点が多い。Antonelliら⁹⁾は、牛大動脈由来の培養血管内皮細胞を使用した実験で、血管内皮細胞にヒアルロン酸に特異的なリセプターの存在を認めており、このリセプターを介してヒアルロン酸が血管内皮細胞に働きかけているものと推測している。しかし、その詳細については不明な点が多く、ヒアルロン酸の分子量の違いによる影響の点も含め、今後の検討課題であると思われる。

今回の実験は*in vitro*での実験結果を報告したが、今後*in vivo*においてヒアルロン酸が角膜や硝子体を発生過程で無血管組織化するためにどのような役割を果たしているか、また、これらの眼球内無血管組織に新生血管が発症する際のヒアルロン酸の挙動などについて検索する必要があると思われる。この意味で、今回の実験結果が多少とも基礎的データとして役立つものと考えられた。

文 献

- 1) **Feinberg RN, Beeb DC**: Hyaluronate in vasculogenesis. *Science* 220: 1177—1179, 1983.
 - 2) **Orlidge A, D'Amore MA**: Cell specific effects of glycosaminoglycans on the attachment and proliferation of vascular wall components. *Microvasc Res* 31: 41—53, 1986.
 - 3) **West DC, Kumar S**: The effect hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Exp Cell Res* 183: 179—196, 1989.
 - 4) **Folkman J, Handenschild C, Zetter BL**: Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc Natl Aca Sci* 76: 5217—5221, 1979.
 - 5) **Folkman J, Handenschild C**: Angiogenesis *in vitro*. *Nature (London)* 288: 511—556, 1980.
 - 6) 中安清夫, 林 信人, 佐藤 昇, 沖坂重邦: 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に誘導する. *日眼会誌* 96: 695—701, 1991.
 - 7) **Nakayasu K, Hayashi N, Okisaka S, Sato N**: Formation of capillary-like tubes by vascular endothelial cells co-cultured with keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 3050—3057, 1992.
 - 8) **Montesano R, Orci L, Vasalli P**: *In vitro* rapid organization of endothelial cell into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J Cell Biol* 97: 1648—1652, 1983.
 - 9) **Antonelli A, Patricia A, D'Amore**: Density-dependent expression of hyaluroic acid binding to vascular cells *in vitro*. *Microvasc Res* 41: 239—251, 1991.
-