

血管内皮細胞の培養

技術センター 医学部等部門

総合薬学科技術班 阿武 久美子

ANNO Kumiko : *In Vitro* Culture of Endothelial Cell

1. はじめに^{1), 2), 3), 4), 5), 6), 7)}

現在、世界中で多種多様の細胞が体外の培養器内に於いて培養されている。

動物細胞の入手手段としては、1) 細胞バンク、2) 市販品の購入、3) 細胞を既に保有する研究者からの譲渡、4) 自分で開発する、の4つの経路が主に挙げられる。特にヒト細胞の場合は、倫理審査の有無、安定した性質の細胞株樹立の困難さ、知的財産権等の諸問題の複雑さから、細胞の単離或いは培養自体が研究対象でない場合は1) か2) より入手が一般的である。おもな細胞バンクとしては、理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室 (<http://www.brc.riken.jp/lab/cell/>), JCRB 細胞バンク (厚生労働省生命科学研究所資源, <http://cellbank.nihs.go.jp/>), ATCC(American Type Culture Collection, <http://www.atcc.org/>)等が挙げられる。

細胞を入手した後、保存と培養が始まる。細胞は細胞内氷結保護剤(ジメチルスルフォキシド等)を加えて徐々に温度を下げ凍結させると、超低温冷凍庫(-80℃, 一年程度)や液体窒素タンク(-196℃, 半永久的)で長期保存することが出来る。

凍結保存を行わない場合は細胞の増殖に合わせて継代培養を行うことになる。動物細胞を培養する場合、おおむね以下の器具が必要となる。クリーンベンチ、培養器(CO₂インキュベーター)、位相差顕微鏡、遠心機、滅菌機器(紫外線照射、オートクレーブ、乾熱滅菌、火炎滅菌等)、滅菌済培養器具(ピペット、ディッシュ、フラスコ、チューブ等)、ピペッター、アスピレータ

一、等々。加えて、細胞を維持するための適正な培地(アミノ酸、ビタミン、糖、塩類、血清などを含む)、分散に用いる消化酵素液(トリプシン等)、洗浄等に用いる生理食塩水も必須である。

細胞は培養法において非接着細胞と接着細胞に分類できる。血液細胞、癌細胞等は非接着細胞で、液中に浮遊状態で培養でき、継代は物理的に均一に分散させ分配することで容易に行える。その他の多くの正常組織由来細胞は培養器壁に足場を求め、単層で増殖し密度が飽和すると足場の確保が出来ないために増殖停止する。これらの接着細胞は、細胞間や細胞-培養基質間で蛋白質を介して接着しているので、継代を行うためには、まずトリプシン等の消化酵素を用いて剥離させ分散した後、分配する。

この様に細胞は分散・分配を繰り返し、継代培養を行うことにより分裂増殖させることが可能であるが、正常体細胞の場合は分裂継代数の限界が存在する。これを細胞の分裂寿命といい、限界の原因は、予めある決まった分裂寿命がある為という説と、時間経過に伴う修復不能な障害の蓄積によるものという説で説明されている。分裂寿命を越えて延命、または不死化する場合は、がん遺伝子の発現、またはがん抑制遺伝子の欠失・失活による形質転換(個体でのがん化に相当する)、或いは細胞分裂に伴い短縮する染色体末端テロメア DNA を延長するテロメラーゼの発現が起きている(図1)。生体内の細胞が分裂限界に達した場合、器官を構成する部分の欠落が起これば機能不全へと進む。

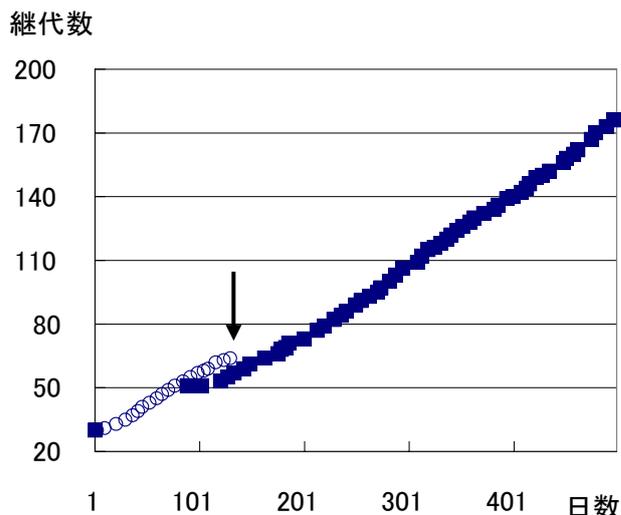


図1 単層培養のヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞の継代寿命. コラーゲンタイプ1コート培養器内. ○. 正常細胞. ■.テロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子導入後. 正常細胞は矢印(→)で示した約60継代で分裂寿命を迎える. テロメアを延長するテロメラーゼ酵素を発現する遺伝子を導入すると継代寿命が延長する.

2. 血管内皮細胞の培養

血管内皮細胞は血管の最内部, つまり直接血液に接する面を覆っている細胞である. 血管内皮細胞が形成する管腔(内膜)の周囲を大血管では血管平滑筋細胞(中膜)が, 毛細血管では周皮細胞が取り囲んでいる. 血管内皮細胞は血圧上昇作用のあるエンドセリンや血圧降下作用を持つNO等を分泌しパラクライン機構で平滑筋等に作用させ血管の収縮弛緩を調節している.

(平滑筋細胞は交感神経系の調節を受けるなど, 神経系の標的細胞でもある.) また, 肺組織の内皮細胞はアンジオテンシン変換酵素(ACE)を細胞膜上に発現しており, 血圧の調節にも関与している. このように, 血管組織は単なる血液の流れる導管ではなく, 多細胞で構成される非常に動的で複雑な組織である. 血管内皮細胞同士は特殊な細胞間接着を持ち, 物質の血管内外への透過を調節する. 炎症や動脈硬化の際にはマクロファージなどが侵入する. 血管内皮細胞は通常, 基底膜という細胞外基質に接着している. 培養する場合もコラーゲン等の細胞外基質による培養器壁のコーティングが必要となる. また血管内皮増殖因子(VEGF; vascular endothelial growth factor)は血管内皮細胞が特異的に発現する受容体を介して増殖を引き起こし, 血管新生, 血管透過性亢進を誘導する. 固形癌の低酸素化した部位ではVEGFの発現が上昇し血管内皮細胞の遊走を促し血管新生する事で癌

部への栄養供給が行われることから, 抗癌剤の標的因子にもなっている.

ヒトの血管内皮細胞はコラーゲン1またはゼラチンコートされた培養器で良い接着を示す. MCDB131 培地に10%のウシ胎児血清, Endothelial cell growth supplement (EGF含有), heparinを添加した混合培地を用い, 20%酸素・5%二酸化炭素・75%窒素の混合空気下, 37°C加温の条件で良好に培養することが出来る. ヒト臍帯静脈由来のHUE101-1株では倍加増殖速度は2倍加/3~4日で, 分裂寿命は約60継代である(図1). 敷石状の形態で単層で増殖する(図2). 細胞外基質をコートしたマトリゲル培養器の上では血管内皮細胞の分化形態の特色である網目状の構造を取り(図3), 3次元培養を行うと管腔を形成することが知られている.

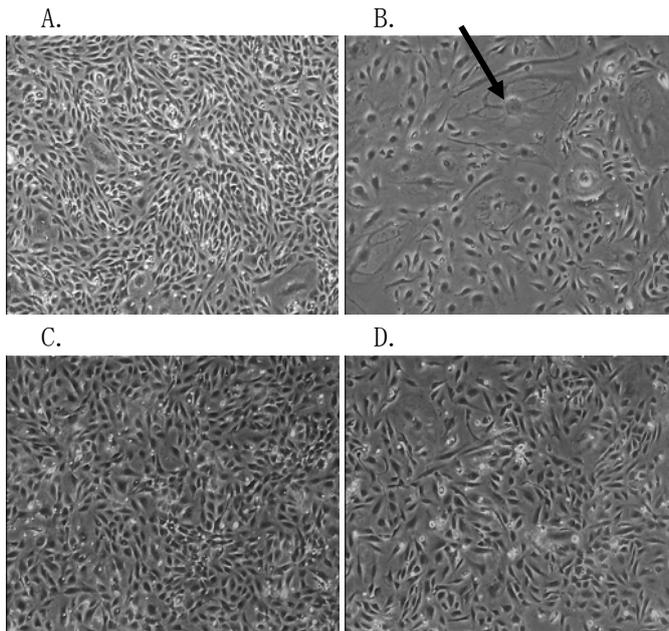


図2 単層培養のヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞. コラーゲンタイプ1コート培養器内. **A.** 正常細胞培養早期(36継代). 敷石状の単層で増殖し, 接触阻害が起きる. **B.** 正常細胞培養後期(64継代). 扁平で巨大化した(←), 老化期に特徴的な形態を示す. **C.** DNA型がんウイルスSV40大型T抗原遺伝子+テロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子導入後(162継代). 非常に強い増殖能を持つ. **D.** テロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子導入後(164継代). 正常細胞の分裂寿命を越えて延命するが, 形態は正常細胞の培養早期に近い.

3. 老化研究

衛生や栄養状態の向上につれて, ヒトの寿命の延長が見られているが, それでも老化は起こりやがて死に至る. 原因として組織・器官を成す個々の細胞の不全があり, 概略, 増殖不能, 異常増殖(癌化), 機能不全に分けられると考えられる.

培養血管内皮細胞でも老化期に相当する継代後期では細胞分裂が止まり(図1), 細胞の形態が変化し(図2, 矢印), 分化能である網目構造の形成も非常に頼りないものになる(図3). これらは動脈硬化や滲出液の増加, 血管新生の異常, 不能を反映していると言えるであろう. 適正な細胞増殖条件を知ることは, より良い質の生活への道筋の一つである.

正常体細胞は細胞分裂に際して全く等しい各染色体の複製を作って娘細胞に分配するはずだが, 機構上の問題により, 末端部分は複製されずに短縮していく. この末端部分にはテロメアDNAと名付けられた塩基配列の繰り返し部分が存在する. 体細胞ではほとんど活性がない「テロメアDNA延長酵素=テロメラーゼ」のサブユニットhTERT遺伝子を外来遺伝子として細胞に導入するとテロメラーゼが発現しテロメアDNAの延長, 細胞の分裂寿命の延長が見られる(図1). これらの細胞は正常細胞の培養早期に

近い形態を示す(図2). マトリゲル上でも太く強固な網目を形成する(図3).

一方DNA型がんウイルスのSV40大型T抗原遺伝子を細胞に導入すると, RB(retinoblastoma原因遺伝子;細胞周期を調節する. がん抑制遺伝子でもある)蛋白質の働きが阻害されて, 細胞周期が止まらないため, 細胞寿命の延長が見られる. しかしこれらの細胞はがん細胞のように脱分化してしまってマトリゲル上での網目も形成しなくなる.(図3)

この様にある程度の細胞分裂寿命の制御は行うことが出来る. 個体の老化期や創傷治癒時に不足する細胞を補うことが出来れば再生医療の一端にもなりうる.

4. おわりに

日本語で「バイオテクノロジー」と表現するとき, そこには何か怪しげな錬金術の雰囲気が漂うように思う. しかしその基礎にあるのは地道な生命科学研究である. 生命科学研究を行うとき, その手法は様々である. 行動・生態学等では生物の個体・集団を扱い, 或いは筆者の様に分子・細胞生物学等では個体を形成する細胞, さらにその構成分子を試料とする. 延々と時間を掛けて観察を続けてある傾向を見出すこともあるし, 多種多様の物理・化学的刺激を

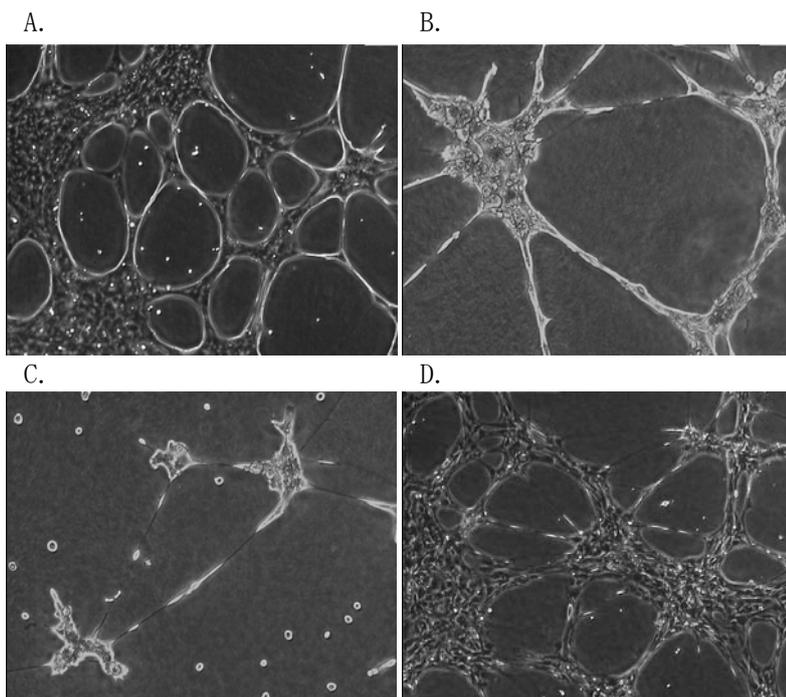


図3 細胞外基質(マトリゲル)上培養のヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞。マトリゲルコート培養器内。A. 正常細胞培養早期(36継代)。太い網目状構造を形成する。B. 正常細胞培養後期(64継代)。細い網目状になる。C. DNA型がんウィルスSV40大型T抗原遺伝子+テロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子導入後(162継代)。ほとんど網目を作らない。脱分化の可能性が高い。D. テロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子導入後(164継代)。正常細胞の培養早期に近い太い網目構造を形成する。

与えて瞬時の反応を見出すこともある。これらはとても地味な作業である。日々渡っている便利な橋に強固な地盤と橋梁と最適のバランスがある様に、生命科学の恩恵を受ける時にはそれを支える為に日々地道に地固めの研究に携わる人々が存在する。筆者はこの事を心に留め、地固めの一部となるべく技術員の仕事に邁進している。

文献・参考図書

- 1) 渋谷正史 編(1999) 血管研究の最前線に迫る:(羊土社)
- 2) 日本人工臓器学会 編(2003) 人工臓器は今:(羊土社)
- 3) 立花隆(2000) 人体再生:(中央公論社)
- 4) 小原収, 他 編(2004) バイオ高性能機器・新技術利用マニュアル(蛋白質核酸酵素 臨時増刊号):(共立出版)
- 5) 井出利憲(1999) 細胞培養入門ノート:(羊土社)
- 6) 小山秀樹 編(1999) 細胞培養ラボマニュアル:(シュプリンガー・フェアークラーク東京)
- 7) 黒木登志夫, 他 編(2004) 培養細胞実験ハンドブック:(羊土社)