

原 著

毛細血管新生と細胞外基質、特に多糖類
との関連性についての形態学的研究

大 滝 洋

岩手医科大学歯学部口腔解剖学第一講座

(主任 : 野坂洋一郎教授)

抄録 : 血管新生中の毛細血管内皮細胞の細胞外基質における glycosaminoglycans (GAGs) の微細構造的分布を, chick chorioallantoic membrane (CAM) を用いて組織化学的に *in vivo* と *in vitro* で検索した。*in vitro* の検索のため, 血管新生の単純なモデルをコラーゲン・ゲル培養法によって準備した。*in vitro* で新しく形成された内皮細胞による管腔構造は, *in vivo* における脈管と類似していた。*in vivo* と *in vitro* における管腔を, 過ヨーン酸 hexamethylenetetramine 銀 (PAM), Ruthenium Red (RR) と Alcian Blue (AB) で染色し, GAGs を同定するため 4 種の酵素 (羧丸 hyaluronidase, 放線菌 hyaluronidase, chondroitinase ABC, chondroitinase AC) で消化した。その結果, hyaluronic acid が血管新生の初期において細胞外基質の構成要素の細い collagen 線維に蓄積し, 血管の成長とともに硫酸化 GAGs, 特に dermatan sulfate に置きかわることが示唆された。

Key words : angiogenesis, extracellular matrix, glycosaminoglycans, collagen gel.

緒 言

血管新生は生理的には生物の発生過程において, また, 病的状況では癌あるいは炎症の進行過程において重要な意味を持つことが報告されている¹⁾。さらに近年, 血管新生因子あるいはその調節因子が *in vivo* と *in vitro* の両方で研究され, これらの因子による血管新生誘導の概念が確立されつつある²⁻⁶⁾。

従来, *in vivo* における血管新生モデルに rabbit cornea⁷⁾, chick embryo chorioallantoic membrane⁸⁾などが用いられ, 血管新生因子あるいはその調節因子の研究が進められてきた。しかしながら, これら *in vivo* のモデルは, 再現性, 定量性あるいは生体反応の有無

に問題があり, *in vitro* における血管新生モデルの確立が望まれている。

Folkman と Haudenschild⁹⁾が *in vitro* における内皮細胞の管腔形成を報告して以来, 細胞分離, 培養技術の進歩とあいまって, *in vitro* における血管新生の研究が可能となった。さらに, Nicosia ら¹⁰⁾と Montesano ら¹¹⁾は単離した内皮細胞ではなく, 血管を含む組織片を基質中に包埋することによって, 三次元的な管腔形成を観察している。一方, 細胞外基質の情報は細胞骨格系を利用して伝えられ, 細胞の分化や機能発現に関わることが特に近年注目されてきている¹²⁾。細胞外基質のうちでも, collagen, glycosaminoglycans (GAGs) と fibronectin は細胞の増殖, 移動, 接着, 分化において重要

The histochemical study on the distribution of glycosaminoglycans in the environment of neovascularization *in vivo* and *in vitro*.

Hiroshi OHTAKI

(First Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 14 : 179-194, 1989

な役割をもつ¹³⁾と言われており、特に、GAGsは細胞の運動と分化の調節に関連することがin vivoで示されている^{14,15)}。Ausprunkら¹⁶⁾はin vivoにおいて、chick embryo chorioallantoic membrane (CAM)の血管新生の調節機構解明のため、血管周囲のGAG解析を行ない、hyaluronic acid並びに硫酸化GAGsの量と分布が血管成長にしたがって変化することを示した。しかしながら、in situにおける研究では、内皮細胞の合成したGAGsと体液由来のGAGsの区分が難しく、in vitroでの血管新生時におけるGAGsの動態を観察する必要がある。

そこで血管新生の調節における血管内皮細胞産生のGAGsの関連性をより明らかにするため、collagen gelに、血管の豊富なchick embryo chorioallantoic membrane (CAM)を包埋することによってin vitroの三次元血管新生モデルを作製し、伸展した血管内皮細胞の細胞外基質におけるGAGsの組成を組織化学的手法を用いて検索し、血管の成長に伴った内皮細胞周囲の基質におけるGAGsの変化を検索した。

材料と方法

1. 実験材料

種卵 (White Leghorn) を37°C、相対湿度60%でインキュベートした7~8日目のchick embryo, stage 30-35からchorioallantoic membrane (CAM)を無菌的に約20mm平方の大きさで採取した。

2. 実験方法

1) 培養方法

無菌的に採取した約20mm平方のCAMをCalciumとMagnesiumイオンfreeのリン酸緩衝食塩水 (CMF-PBS) で3回洗浄を行った。洗浄後、1% EDTAを含むCMF-PBS中に4°C、3~4時間浸漬し、次いで、37°Cで10分間インキュベートした後、軽くピペティングし、上皮をはがした。上皮を除去したCAMを50% fetal bovine serum (Gibco Laboratories

Gland Island, NY) を含む199培地 (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd. Tokyo) で洗浄し、外科用メスで約1mm平方に細切した。

培養用collagenにはCellmatrix Type I-A (Nitta Gelatin Co., Ltd. Osaka) を用いた。Cellmatrix (0.3%, pH 3.0) と10倍濃度の199培地および再構成用培地 (0.08N NaOH, 4.77% HEPES) を8:1:1の割合で混合し、collagen溶液 (pH 7.4) を作製した。この際、調製は氷上で行い、collagenのゲル化を防いだ。先に調整しておいたCAM組織片をcollagen溶液中に入れピペットで攪播し、35mm径 plastic dishに1mlずつ分注し、直ちに37°C、10分間インキュベートしてゲル化させた。その後、100 µg/ml ECGS¹⁸⁾ (Endothelial Cell Growth Supplement, Collaborative Research, Inc. Lexington, MA), 100 µg/ml Heparin³⁾ (sodium salt, Sigma Chemical Company St. Louis, MO) と50% FBSを含む199培地を注ぎ、注射針でcollagen gelをdish面からはがし、5% CO₂, 95% airで1週間浮遊培養した。

2) 位相差顕微鏡及び透過型電子顕微鏡による観察

培養期間中 (1週間) は、位相差顕微鏡 (DIAPHOT-TMD, Nikon, Tokyo) にて細胞の増殖と伸展の状況を毎日観察し、写真撮影を行ない記録した。電子顕微鏡による観察に際しては、7~8日目CAMと1週間培養したcollagen gel中の新生血管を0.1M cacodylate buffer (pH 7.3) で調整した2.5% glutaraldehydeで4°C、1時間前固定した。その後2% 四酸化オスミウムで4°C、1時間後固定し、Grinnellら¹⁹⁾の方法に準じてエタノール上昇系列で脱水、エポキシ樹脂 (ルベアック-812) に包埋した。ダイヤモンドナイフを用いてultra-microtome (LKB 2088 ULTRATOME V) にて超薄切片を作製し、formvar-coated grid (1-slotted) に載せ、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色し、透過型電子顕微鏡 (Hitachi H-700H) にて観察した。

3) GAGsの組成と分布の組織化学的検索

7~8日目CAMとin vitroにおいて形成さ

れた新生血管を用いて、内皮細胞が産生した細胞外基質のGAGsの組成と分布を検索するために、過ヨウ素酸 Hexamethylenetetramine 銀 (PAM), Ruthenium Red (RR) と Alucian Blue (AB pH 6.5) で GAGs を視覚化し、さらに酵素処理後、同様に AB, RR と PAM 染色を施し、両者を比較することにより GAGs の同定を行なった。

(1) PAM 染色

7~8日目CAMと1週間培養したcollagen gel中の新生血管を0.1M cacodylate buffer (pH 7.4) で調整した2% paraformaldehyde と2.5% glutaraldehyde で1時間前固定し、2% 四酸化オスミウムで4℃, 1時間後固定した後、エタノール上昇系列で脱水し、通法に従ってエポキシ樹脂に包埋した。厚切切片にて新たに形成された管腔様構造を確認後、ultra-microtomeにて作製した超薄切片は、1%過ヨウ素酸水溶液に室温、10~15分間浮かせ、その後蒸留水にて洗浄を3回繰り返した。次に3% Hexamethylenetetramine (Kanto Chemical Co., Inc. Tokyo) 50ml, 5% AgNO₃ 5mlに蒸留水を加えて100mlとした後、5%ホウ砂6mlを混合したHexamethylenetetramine 銀液に移し、water-bath中で58~60℃, 50分間加温し、切片が黄褐色になるのを確認した。変色後の切片を蒸留水で2度洗い、1% formaldehyde 原液を含む2% シュウ酸水溶液に30秒間浸した後、再び蒸留水で洗浄した。その後、5% チオ硫酸ナトリウム液に30秒浸し、蒸留水で2度洗浄した後にformvar-coated gridに載せ、無染色でTEMで観察した。

(2) RR 染色

Luft²⁰⁾の方法に従って市販のRR粉末(Nakarai Chemicals, Ltd. Kyoto)より0.15% RR原液を準備した。7~8日目CAMと1週間培養したcollagen gel中の新生血管を0.15% RR原液, 3.6% glutaraldehyde水溶液と0.1M cacodylate buffer (pH 7.4)の等量混合した固定液中で室温で1時間前固定した。さらに、5% 四酸化オスミウム水溶液, 0.1M cacodylate

buffer (pH 7.4) と0.15% RR原液の等量混合液中で室温, 1時間後固定した。0.1M cacodylate buffer (pH 7.4) で洗った後、エタノール上昇系列で脱水し、通法に従って、エポキシ樹脂に包埋した。厚切切片にて新たに形成された管腔様構造を確認後、超薄切片をダイヤモンドナイフを用いてultra-microtomeで作製し、formvar-coated gridに載せ、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色を施し、TEMで観察した。

(3) AB 染色

7~8日目CAMと1週間培養したcollagen gel中の新生血管を0.1M cacodylate buffer (pH 6.5) で調整した4% glutaraldehydeにて室温で1時間前固定した。固定液には0.1% AB-8GN (Nakarai Chemicals, Ltd. Kyoto)を加えた。cacodylate bufferで洗い、0.1M cacodylate buffer (pH 6.5) で調整した4% 四酸化オスミウムで4℃, 1時間後固定した。エタノール上昇系列で脱水後、RR染色で述べた方法と同様な手順により、TEMで観察した。

(4) 酵素処理

上記の手法によって染色された管腔周囲のGAGsを詳細に同定するため Ausprunk¹⁶⁾の方法に従って、7~8日目CAMと1週間培養したcollagen gel中の新生血管をGAGs分解酵素で以下に述べる方法で処理した。0.1M cacodylate buffer (pH 7.4) で調整した2% paraformaldehyde と2.5% glutaraldehyde で標本を30分間前固定した。bufferで洗った後、各々の酵素で37℃, 1時間消化を行った。0.05M acetate buffer (pH 5.2) で調整した100 (TRU)/ml Streptomyces hyaluronidase (Seikagaku Kogyo Co., Ltd. Tokyo) [S.H.] ; NaCl-acetate buffer (pH 5.6) で調整した400U/ml Testicular hyaluronidase (Sigma Chemical Co., ST Louis. MO) [T.H.] ; Enriched tris buffer (pH 8.0) で調整した0.15U/ml chondroitinase ABC (Seikagaku Kogyo Co., Ltd. Tokyo) [ABC] ; Enriched tris buffer (pH 7.4) で調整した0.15U/ml chondroitinase AC (Seikagaku Kogyo Co.,

Ltd. Tokyo)〔AC〕で標本の酸性ムコ多糖類を消化した。0.1% α -amylase リン酸塩緩衝塩化ナトリウム液 (α -amylase 0.1%, NaCl 0.8%, リン酸-ナトリウム 0.08%, リン酸二ナトリウム 0.13% 含有液, pH7.0)²¹⁾で glycogen ならびに中性多糖類を消化した。消化後の全標本を 0.1M cacodylate buffer で洗い, 前述の RR, AB, PAM で染色を施し, TEM で観察した。

結 果

1) 位相差顕微鏡による観察

collagen gel 内に包埋し浮遊法で培養した CAM 組織片より伸展する細胞を培養直後から 1 週間にわたり位相差顕微鏡で観察した。培養 1 日目: CAM 組織片から周囲の collagen gel 中に紡錘状の細胞の伸長が認められた。3 日目: 紡錘状の細胞に比較して, 幅が広く移植片に連結したまま伸長している細胞が, CAM 組織片の周囲に放射状に出現し, 一部は途中で分岐を示すものも存在した。その伸長の長さはほぼ 60 μ m であった (Fig. 1 a)。5 日目: 連続した細胞の伸長が増加し, 互いに吻合して 3 次元的網目構造を形成し, 一部には管腔様構造を認めた (Fig. 1 b)。7 日目: 細胞の放射状に伸長した吻合部には管腔様の空隙が著明に認められ, 網目構造も複雑になった (Fig. 1 c)。

2) 透過型電子顕微鏡による観察

位相差顕微鏡の像で CAM より伸展し管腔様構造を認める部分を透過型電子顕微鏡で観察したところ, 管腔構造を有する毛細血管構造が認められた (Fig. 2 a)。2~5 個の細胞で囲まれた最大 2~5 μ m の直径の管腔が形成されていた。管腔をとり囲む細胞には類円形の核が一個存在し, 一個の核小体をもっていた。細胞質内には多数の粗面小胞体と若干の遊離リボソームと微細管, さらにやや大型のライソソームが認められた。隣接する細胞間には結合装置として閉鎖帯が認められる (Fig. 2 b) とともに弱いながら指状嵌合も認められた。管腔内には壊死した細胞のものと思われる細胞質塊, あるいは, CAM 組織片に近接する部位では赤血球細胞が

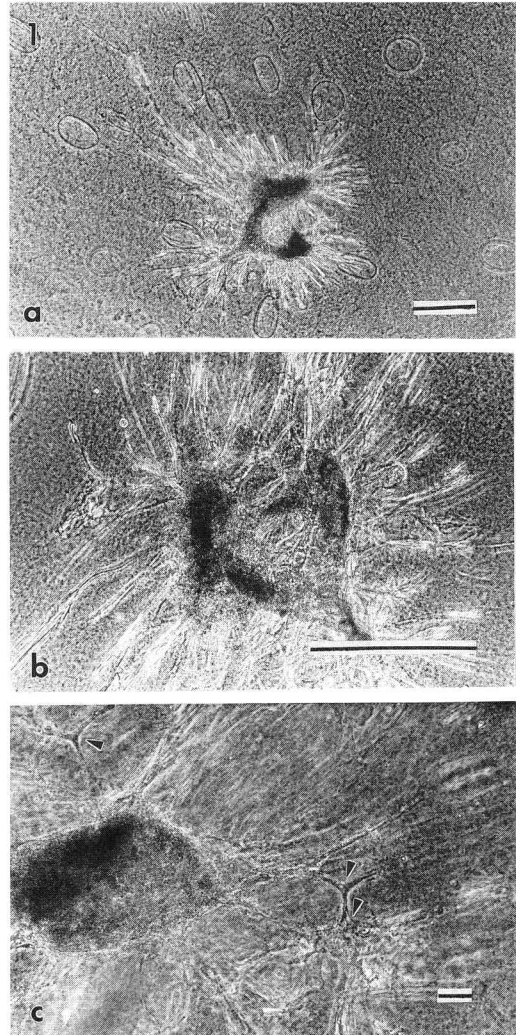


Fig.1 Phase-contrast microscopy of CAM explant cultures in collagen gel.
 a) CAM segment on day 3 of culture. Numerous branching cellular outgrowths were observed. Bar=100 μ m.
 b) On day 5 of culture. Continuous cellular cords formed 3-dimensional cellular network. Bar=100 μ m.
 c) On day 7 of culture. At higher magnification, neovascular sprout and formed dense network. Arrowhead indicated capillary lumina. Bar=10 μ m.

認められた。伸長した毛細血管の非管腔側細胞表面は波状を示し, 基底膜は認められず, 周囲の collagen 線維と密着する部分とわずかに

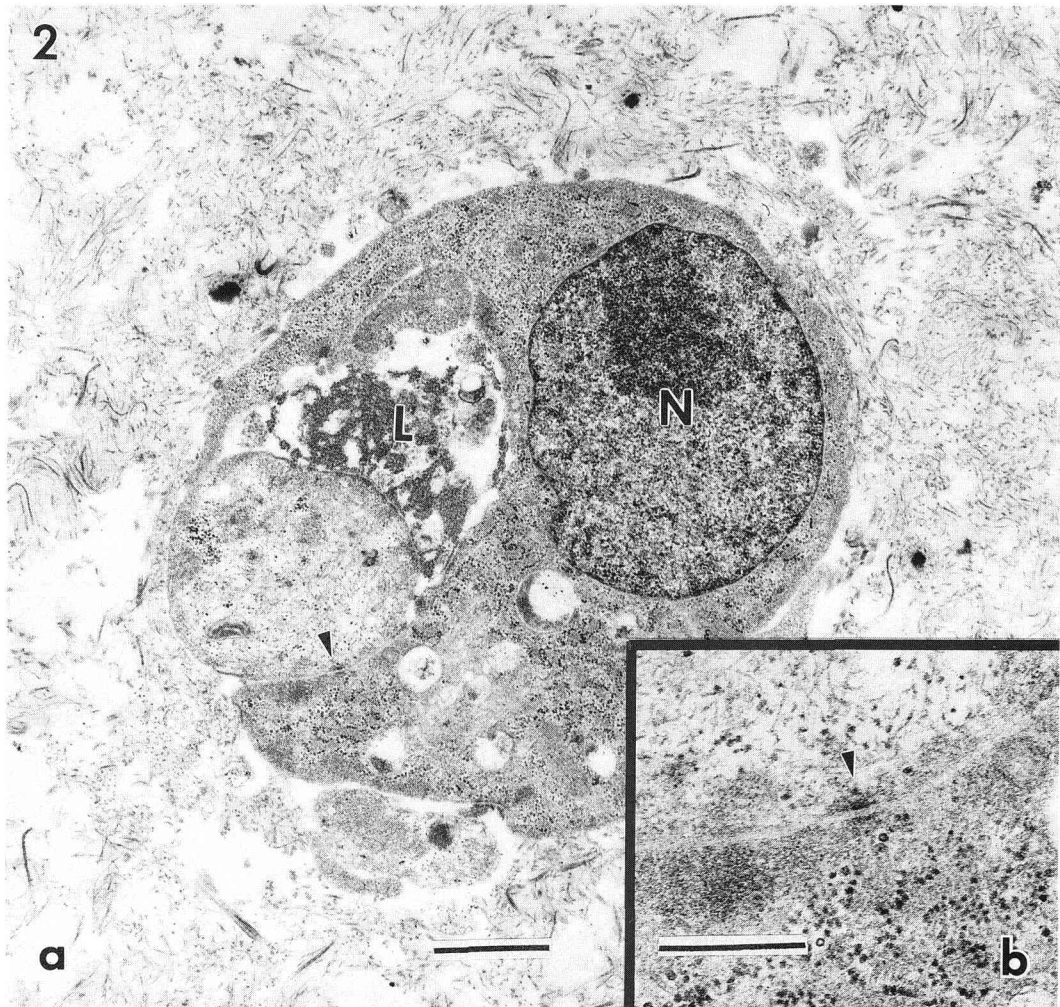


Fig.2 A newly formed endothelial tubular structure on day 7 of culture.
 a) In the lumen, amorphous and electron dense materials were observed. Basal lamina-like materials were not observed. Surrounding collagen fibers consisted of striated and non-striated fibrils with dense aggregation and irregular arrangement. Bar=1 μ m. L : lumen ; N : nucleus
 b) Higher magnification of contact endothelial cells. Typical endothelial tight junction was observed. Bar=0.5 μ m. Arrowhead showed tight junction.

間隙のある部分とが認められた。細胞周囲の collagen は走行が不規則であり、横紋が認められる太い線維と横紋の認められない細い線維で構成され、細い線維は細胞周囲において特に緻密であった。

7~8日 chick embryo CAM の毛細血管において、管腔を形成している内皮細胞の細胞質内には若干のミトコンドリアと微細管、隣接す

る細胞との接合装置として閉鎖帯が認められ、指状嵌合を示していた。管腔内には血球細胞が認められたが、一部の内皮細胞間には接合を欠き、開放している部分も認められた。この時期では内皮細胞の基底膜は認められないが、上皮と血管周囲細胞の基底膜は認められた(Fig. 3)。

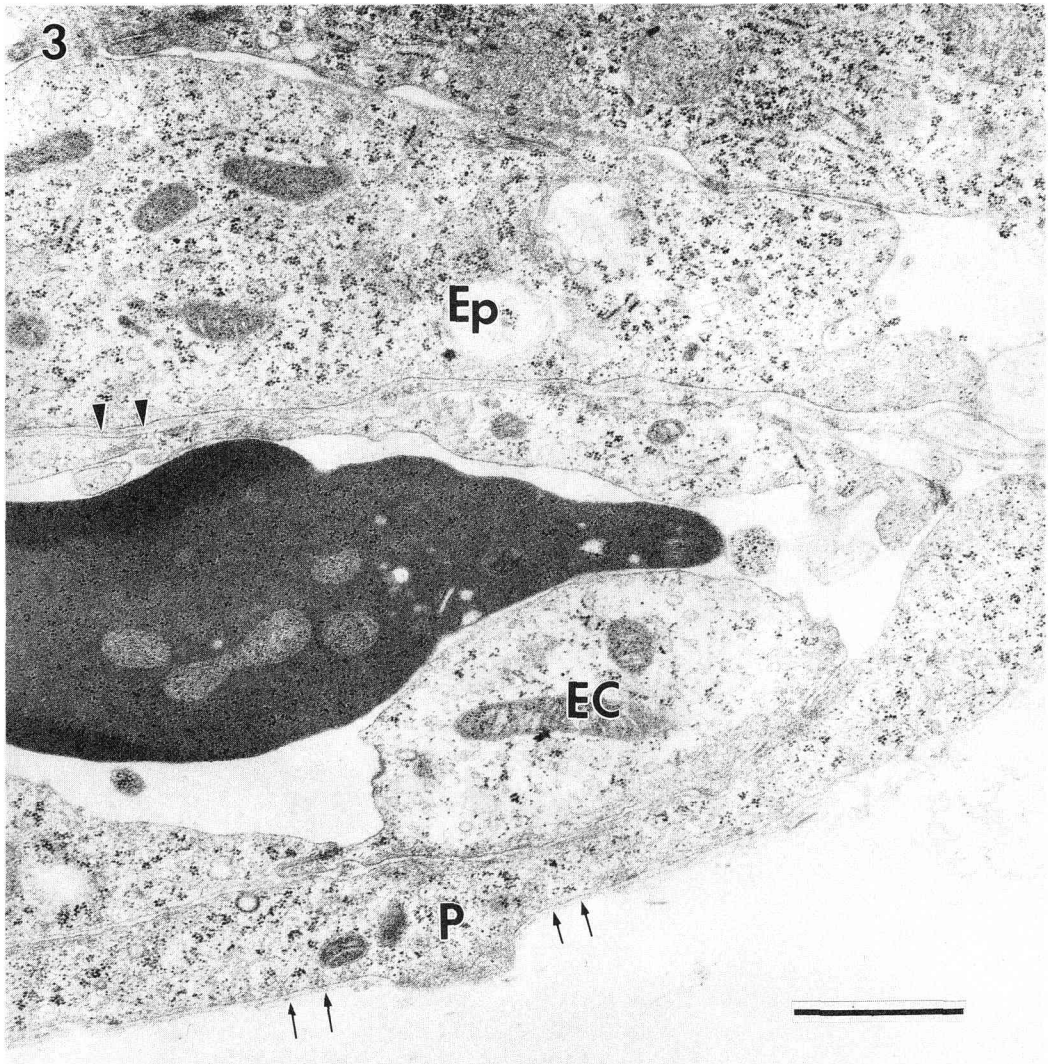


Fig.3 Electron micrograph of the CAM capillary on day 7 of incubation. Capillary wall consisted of a single layer of endothelial cells and closely apposed pericyte and ectodermal epithelial cells. Endothelial basal lamina was not observed. Arrow showed basal lamina of pericyte. Arrowhead showed epithelial basal lamina. Bar = 1 μ m. EP : epithelial cell ; EC : endothelial cell ; P : pericyte

3) 多糖体の組織化学的観察

(1) PAM 染色 ;

7~8日目のCAMにおいては、特に銀粒子の沈着がcollagen線維と毛細血管が隣接する上皮の基底膜に強く、その他ライソゾーム、核、細胞膜に認められた (Fig. 4 a)。GAGsと同様にPAM陽性を示すglycogenを除去するためにamylaseで処理した後にPAM染色を施し

たCAMにおいても、上皮下基底膜、collagen線維またライソゾームの陽性反応は残存していた。(Fig. 4 b)。

管腔形成を示す内皮細胞においては、細胞周囲のcollagen線維上には著明な銀粒子の沈着が認められた (Fig. 5a)。amylaseで処理した後にPAM染色を施した管腔形成を示す内皮細胞においても、同様に細胞周囲のcollagen線

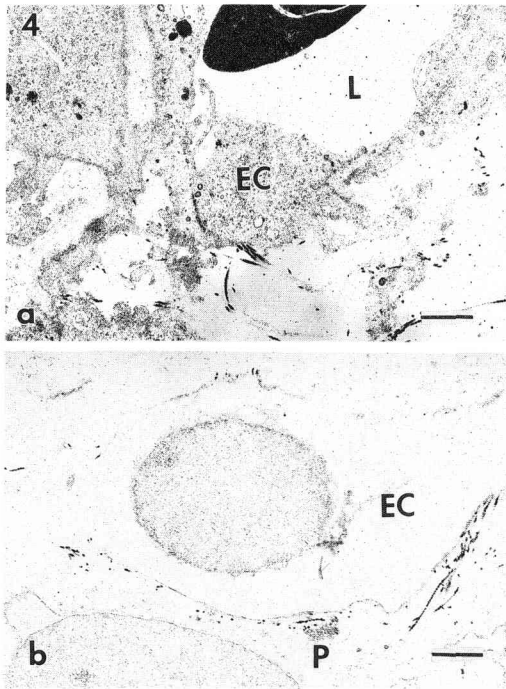


Fig.4 a) On day 7 CAM stained with PAM. Strong PAM positive granules were evident on striated collagen fibers surrounding capillary.
b) On day 7 CAM treated with amylase before staining with PAM. Strong PAM positive granules were evident on striated collagen fibers similar in fig. a. Bar = 1 μ m. EC : endothelial cell ; P : pericyte

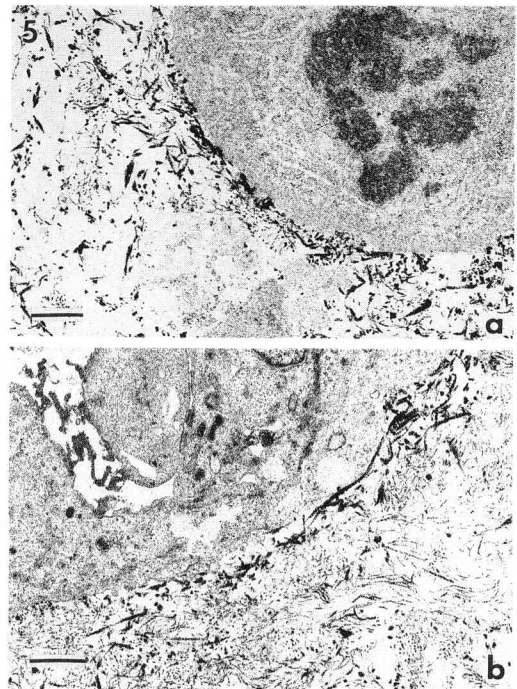


Fig.5 a) On day 7 of culture. Sprouts were stained with PAM. Strong PAM positive granules were evident on surrounding striated collagen fibers.
b) On day 7 of culture. Sprouts were treated with amylase before staining with PAM. Strong PAM positive granules were evident on surrounding striated collagen fibers and abluminal surface of endothelial cell were similar in fig. a. Bar = 1 μ m.

維に銀粒子の沈着が認められた。特に、非管腔側の細線維と管腔側の細胞表面には著明な沈着が認められた (Fig. 5 b)。

(2) RR 染色 ;

7~8日目のCAMにおいて、RRの沈着は内皮細胞表面、血管周囲細胞表面、内皮細胞に隣接する上皮細胞直下の基底膜と毛細血管周囲のcollagen線維上にamorphousな電子密度の高い物質として認められた。しかしながら、内皮細胞の非管腔側への突出部分と管腔内面には認められなかった (Fig. 6 a)。酵素処理後の観察において、RRの沈着は細胞表面においてABCとAC処理後も著明に認められた。T.H.とS.H.処理後においては、血管周囲細胞の表面に較べて沈着は弱かった。内皮細胞周辺の太

いcollagen線維においては、RRの沈着は、全ての酵素処理後も認められた。しかし、細線維においては、ABC処理後はほとんど認められず、T.H.処理後ではやや弱く、AC、S.H.処理後では著明に認められた (Fig. 6 b c d e)。なお、上皮細胞の基底膜は、全ての酵素処理後も弱い沈着を認めた。

管腔形成を示す内皮細胞においては、非管腔側細胞表面、細胞間のスペース、管腔側表面と管腔周囲のcollagen線維において同様のamorphousな物質が認められた (Fig. 7 a)。内皮細胞表面のRRの沈着は、全ての酵素処理後に認められ、ABCとAC処理後においてむしろ増強された。管腔側表面においては、全て

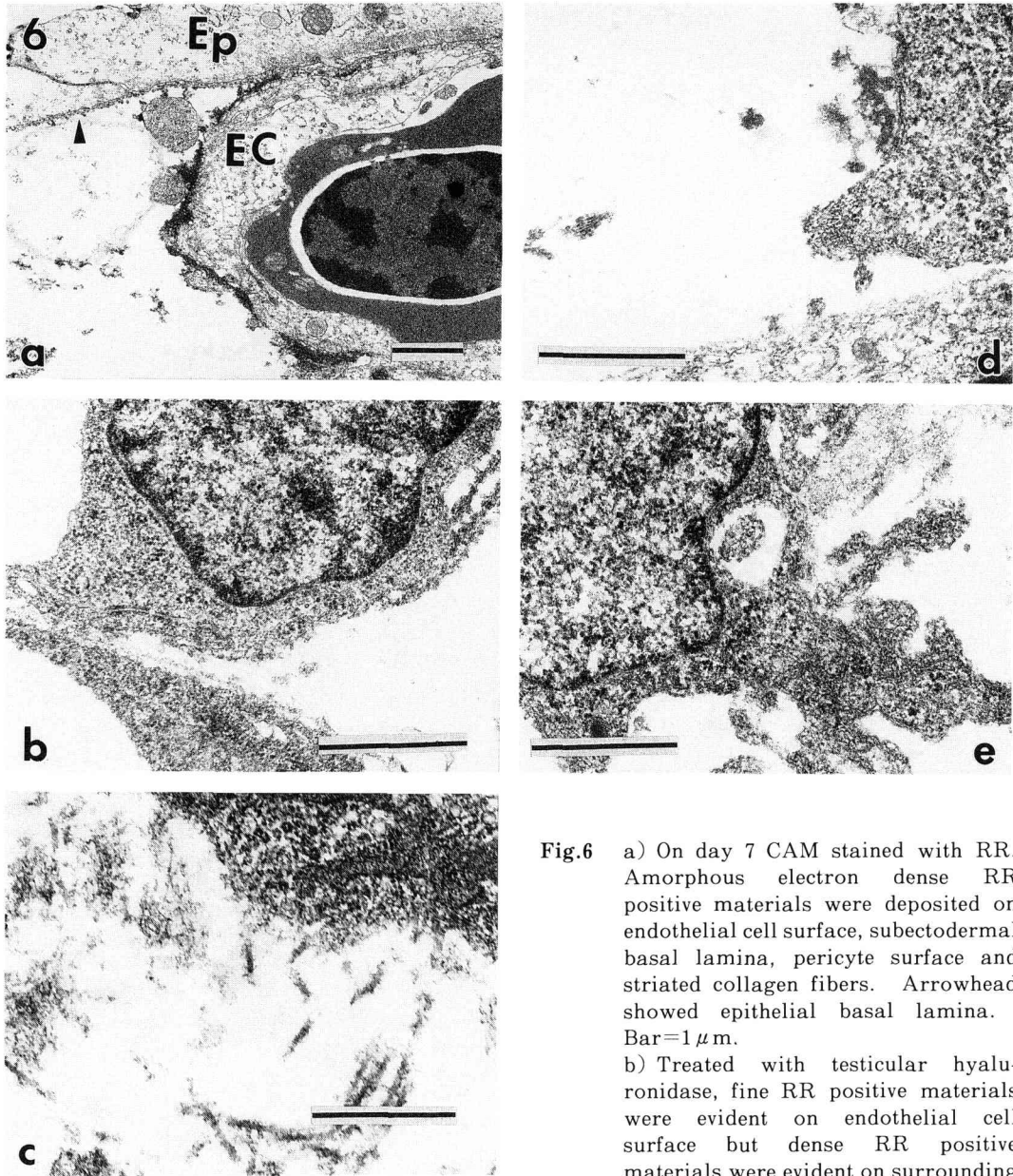


Fig.6 a) On day 7 CAM stained with RR. Amorphous electron dense RR positive materials were deposited on endothelial cell surface, subendothelial basal lamina, pericyte surface and striated collagen fibers. Arrowhead showed epithelial basal lamina. Bar=1 μ m.

b) Treated with testicular hyaluronidase, fine RR positive materials were evident on endothelial cell surface but dense RR positive materials were evident on surrounding striated collagen fibers. Bar=1 μ m.

c) Treated with streptomyces hyaluronidase, fine RR positive materials were deposited on the same positions as fig.6 b. Bar=1 μ m.

d) Treated with chondroitinase ABC, dense RR positive materials were evident on endothelial cell surface and pericyte surface. But non-striated fine collagen fibrils were not stained. Bar=1 μ m.

e) Treated with chondroitinase AC, dense RR positive materials were evident on endothelial cell surface and non-striated fine collagen fibrils. Bar=1 μ m.

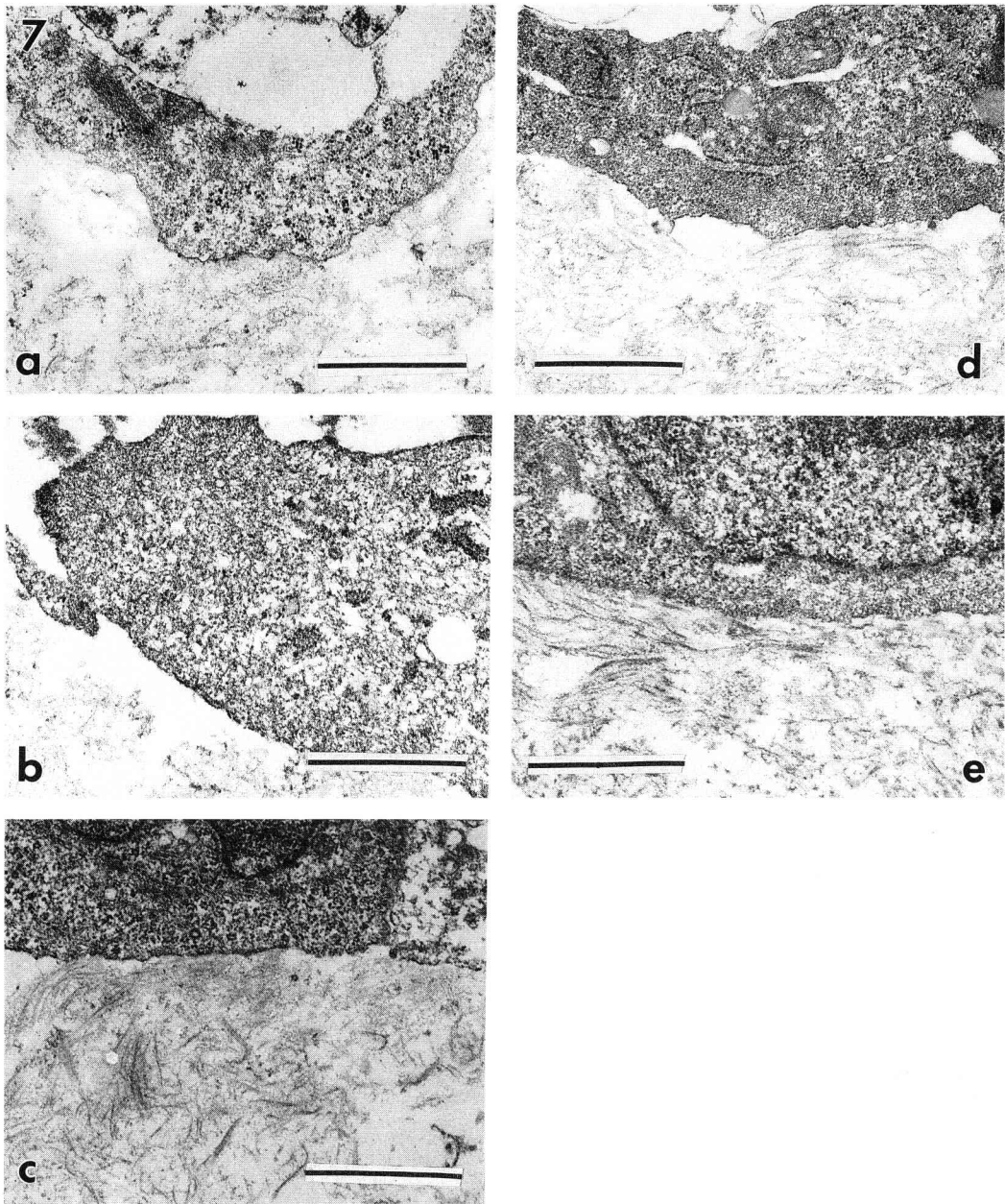


Fig.7 a) On day 7 of culture. Sprouts from CAM were stained with RR.
 b) Treated with testicular hyaluronidase,
 c) Treated with streptomyces hyaluronidase,
 d) Treated with chondroitinase ABC,
 e) Treated with chondroitinase AC,

Amorphous electron dense RR positive materials deposited on the endothelial cell surface and surrounding striated collagen fibers. Dense positive materials on endothelial cell surface were not removed with all enzyme treatment. Dense positive materials on non-striated fine collagen fibrils were removed in fig.7 c. Bar=1 μ m.

の酵素処理後, RR の沈着は著明であった。細胞間スペースにおいては, 全ての酵素処理後で RR の沈着は認められなかった。管腔周囲の collagen 線維上の RR の沈着は, 全ての酵素処理後で弱まった。しかし, 細線維においては, S.H. 処理後には全く認められなかった (Fig. 7 b c d e)。

(3) AB 染色 ;

7~8日目の CAM において, AB の沈着は, 内皮細胞表面, 毛細血管周囲の上皮細胞の基底膜と collagen 線維上に電子密度の高い物質として認められた。内皮細胞表面では沈着の非常に著明な部分が散在するが, 内皮細胞に隣接する上皮細胞の基底膜では一様に沈着していた (Fig. 8 a)。酵素処理の観察において, 内皮細胞表面の AB の沈着は, 全ての酵素処理後において認められた。血管周囲の太い collagen 線維における AB の沈着は, 全ての酵素処理後も認められた。しかし, 細線維において, ABC 処理後のみ AB の沈着が認められなかった。なお, 細胞表面ならびに太い collagen 線維上の AB の沈着は, S.H. 処理後最も著明であった (Fig. 8 b c d e)。

管腔形成を示す内皮細胞において, AB の沈着は, RR の沈着に比べ電子密度の低い物質として, 細胞表面と周囲の collagen 線維上に認められた (Fig. 9 a)。酵素処理後においては, 管腔形成を示す内皮細胞表面, その周囲の太い collagen 線維上および細い collagen 線維上とも全ての酵素処理後に, AB の沈着が認められたが, S.H. 処理後は, 細胞表面ならびに細い collagen 線維上には沈着がやや弱かった (Fig. 9 b c d e)。

考 察

1. 培養内皮細胞の管腔形成について

血管新生因子あるいはその調節因子の研究は, 従来, rabbit, rat, mice の角膜⁷⁾や chick chorioallantoic membrane⁸⁾を用いる in vivo の実験系が主で, 血管新生因子となる物質を浸したペレットを角膜や CAM に埋め込み, その

作用を検討するものであった。しかしながら, 血管新生は内皮細胞の増殖, 接着, 分化, 遊走という様々な因子が組みあわさり, 非常に複雑多岐にわたっている。そのため, 生体を用いた方法は観察の簡便さ, 定量性, 再現性, 特異性の点で問題がある。さらに, in vivo では, 挿入操作により非特異的な炎症が起こり, 血管新生が誘導されるため, 起炎物質が新生因子と誤認される恐れがある。

近年の細胞分離と培養技術の進歩に従って, 血管内皮細胞が単離され, in vitro で内皮細胞の増殖, 移動が観察できるようになり, 内皮細胞増殖因子が多数報告された^{2~6)}。しかしながら, 増殖因子が, そく, 血管新生因子とはなりえないため²⁾, in vitro での血管新生モデルが要望されてきた。1980年に Folkman と Haudenschild⁹⁾が単離した毛細血管内皮細胞を用い in vitro における管腔形成を報告したことは画期的なことであった。彼らが培養液に ECGS あるいは tumor conditioned medium (TCM) を加えて培養することによって得た管腔構造は次のような特徴を示した。すなわち, 内皮細胞単独で形成され, in vivo における毛細血管構造に類似していること, さらに, 細胞内の空胞が, 隣接する空胞と癒合して管腔構造を形成することであった。しかし, 彼らの方法は管腔形成に4週間, あるいはそれ以上を要し, 必ずしも管腔が形成されない例も存在した。その後, in vitro における内皮細胞の管腔形成法が次々と報告され^{23~27)}, ECGS の添加量を変化させ, TCM とか他の内皮細胞成長因子を加え, さらに生物学的基質上あるいは基質中で内皮細胞を培養することによって, 管腔形成までの期間の短縮がはかられている。また, Nicosia ら¹⁰⁾と Montesano ら¹¹⁾は単離した毛細血管内皮細胞ではなく, 毛細血管を含む組織片を生物学的基質に包埋培養することによって管腔形成を得る簡便な方法を報告した。移植片の材料としては, 筋, 脂肪組織¹¹⁾, rat 大動脈輪¹⁰⁾など血管の豊富な組織が用いられているが, 本研究で用いた CAM についてはまだ報告がない。しか

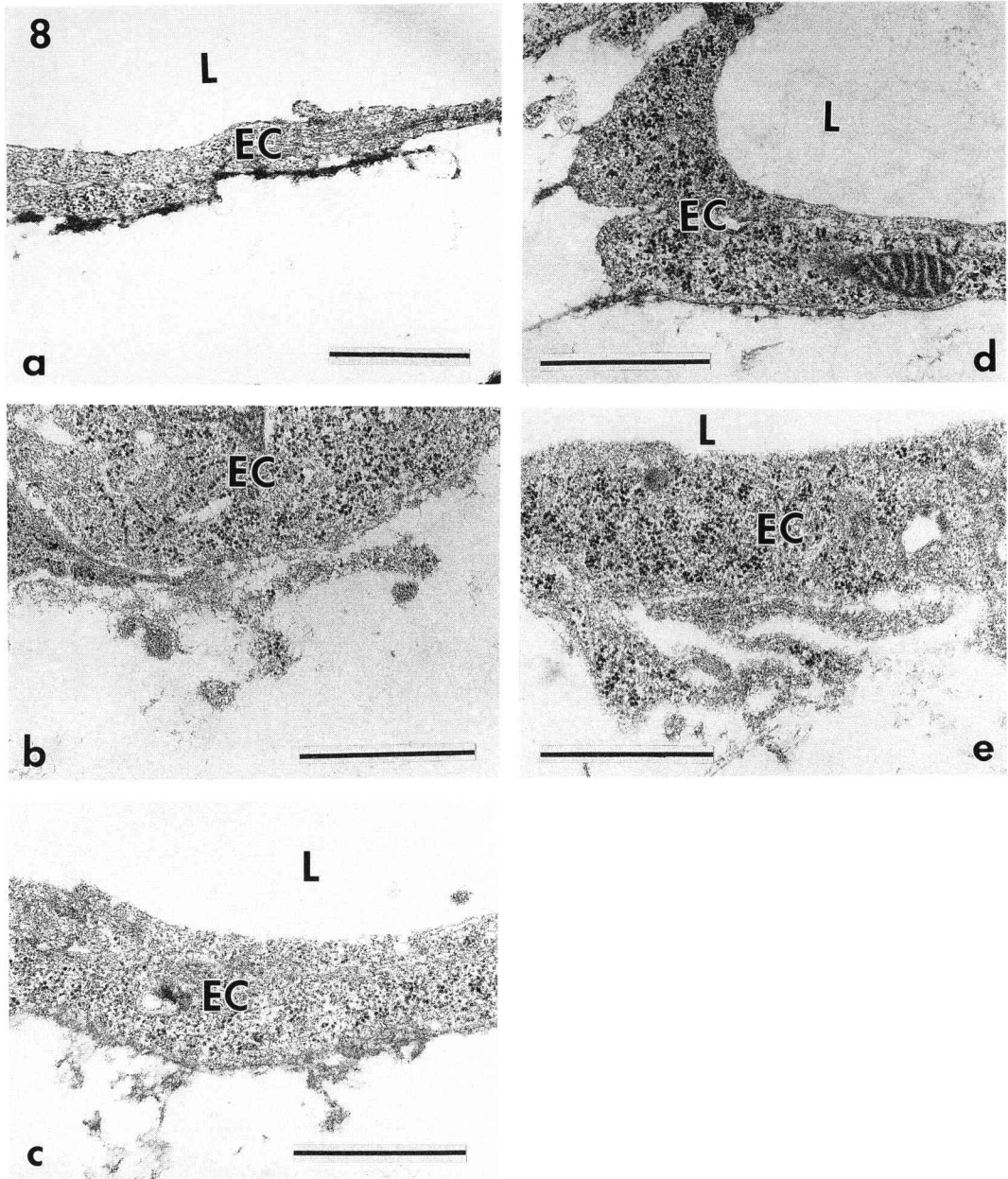


Fig.8 a) On day 7 CAM stained with AB.
b) treated with testicular hyaluronidase,
c) treated with streptomyces hyaluronidase,
d) treated with chondroitinase ABC,
e) treated with chondroitinase AC,

AB positive granules were observed as well as RR positive materials. Dense positive reactions were evident on epithelial cell luminal and abluminal surface and striated collagen fibers. AB positive materials on endothelial cell surface were not removed by all enzyme treatment. But AB positive granules on non-striated fine collagen fibrils were removed in fig. d. Bar=1 μ m. L : lumen ; EC : endothelial cell

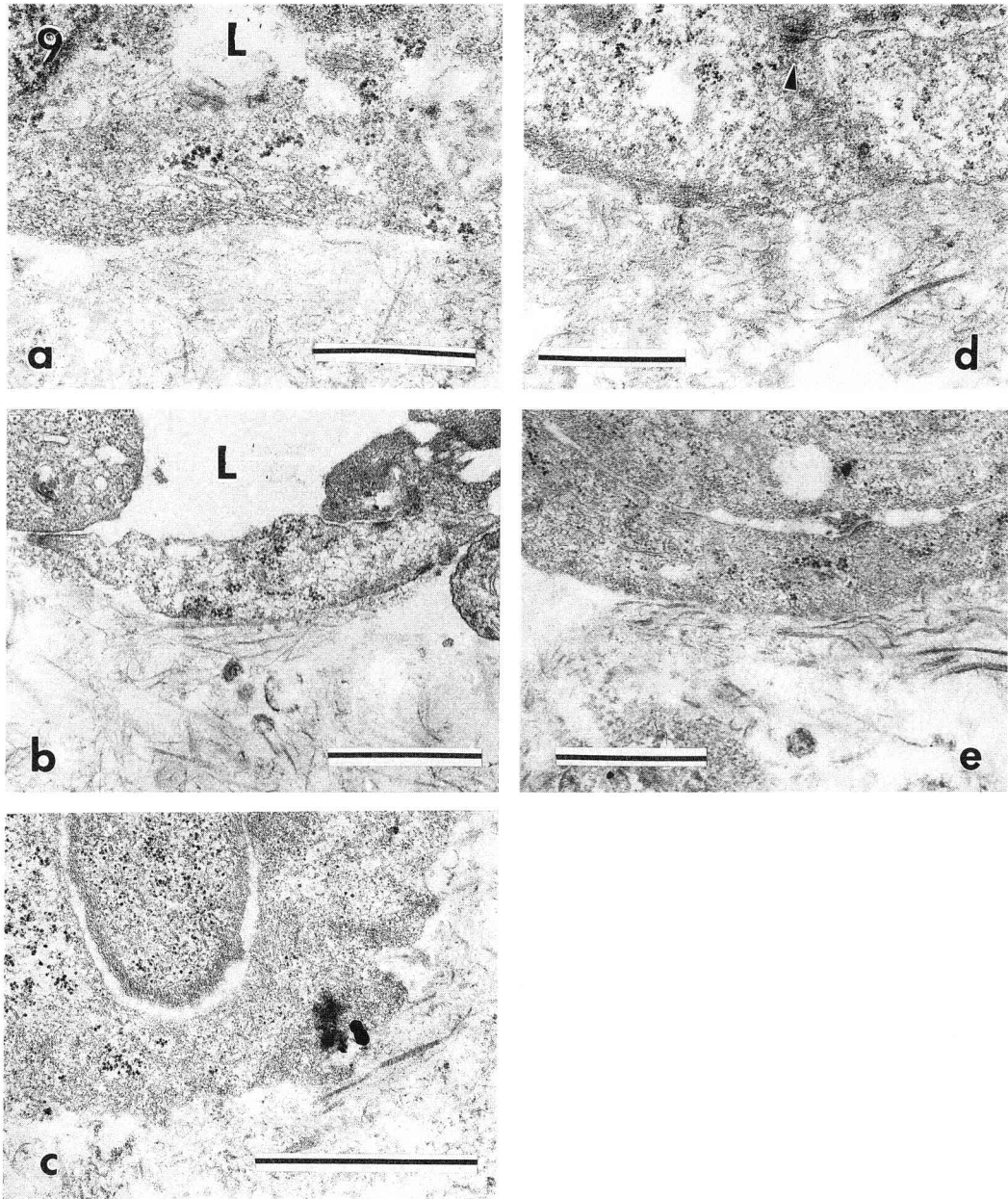


Fig.9 a) On day 7 of culture. Sprouts from CAM were stained with AB. Bar=1 μ m.
 b) treated with testicular hyaluronidase, Bar=1 μ m.
 c) treated with streptomyces hyaluronidase, Bar=0.5 μ m.
 d) treated with chondroitinase ABC, Bar=1 μ m.
 e) treated with chondroitinase AC. Bar=1 μ m.

AB positive granules on endothelial cell surface, non-striated fine collagen fibrils surrounding striated collagen fibers were not removed by all enzyme treatment. But AB positive granules showed moderate expression. L : lumen

Table 1 Distribution of RR-and AB-stained materials after anzyme treatment.

	enzyme	7-8 days CAM				7 days of culture		
		EC sureface	EpC BL	striated col.	fine fibrils	EC sureface	striated col.	fine fibrils
RR	control	++	+	++	+	+	+	+
	T.H.	+	+	+	±	±	±	±
	S.H.	+	+	+	++	-	+	-
	ABC	++	+	+	-	++	±	+
	AC	++	+	+	++	++	±	++
AB	control	++	+	++	+	+	+	+
	T.H.	+	+	+	+	+	+	+
	S.H.	++	+	++	++	±	±	±
	ABC	++	+	+	-	+	+	+
	AC	++	+	+	+	++	+	+

T.H. : testicular hyaluronidase, S.H. : streptmyces hyaluronidase, ABC : chondroitinase ABC, AC: chondroitinase AC, EC: endothelial cell, EpC BL: epithelial cell basal lamina striated col.: striated collagen fibils, fine fibrils: non-striated fine fibrils
 ++ : strong + : moderate ± : fine - : negative

し、CAM は CAM アッセイ法⁸⁾に用いられる程、血管が豊富で短期間に新生血管を形成する。また Moscatelli ら²⁸⁾は、新しく出芽する毛細血管は基底膜が消失した位置から派生すると述べており、図3に示したように、7~8日目のCAMの内皮細胞は全周にわたって基底膜を欠き、血管新生には非常に有利な形状をしている。さらに、発生の途上であるため、上皮が薄く、容易に剥離出来るため、上皮を除いた移植片の調整が簡便で培養系に適している。Michaelopoulos と Pitot²⁹⁾が肝実質細胞を collagen gel 上で培養を行って以来、collagen gel は乳腺細胞^{12,30)}などの培養に利用され、細胞の三次元的増殖や機能分化に大きな効果を挙げている。そこで、本研究においても、生物学的基質としての collagen gel 内に CAM を包埋し、gel を浮遊させ、内皮細胞成長因子として ECGS と heparin を併用することによって、1週間という短期間で管腔形成を得た。管腔形成を示した本研究の血管新生モデルは、管腔を取り囲む複数の内皮細胞は隣接する細胞間に閉鎖帯による接合が認められ、管腔内には細胞成分あるいは amorphous な物質を含んでいた。この管腔形成を行った新生血管は Nicosia¹⁰⁾,

Maciag²⁸⁾, Montesano²⁶⁾と Olander²⁴⁾の所見と類似しているが、Nicosia¹⁰⁾と Montesano²⁶⁾が述べている非管腔側における基底膜様物質 (lamina densa 様物質) は認められなかった。このことは、本新生血管内皮細胞の極性が乱れているというより、7~8日目CAMの毛細血管には基底膜構造が認められず、CAM毛細血管内皮細胞の特性と考えられる。

2. 血管新生と細胞外基質について

近年動物組織の形成と維持のためのシグナルネットワークとしての細胞外基質の役割が注目されてきている¹²⁾。細胞外基質の内でも、形態学的に組織を観察したときに最もよく目にする collagen 線維は単なる線維として存在している構造支柱と考えられていたが、Montesano³¹⁾は in vitro で生物学的基質として collagen gel を用いて種々の細胞を培養し、細胞の分化に伴う形態形成における細胞外基質としての collagen の重要性について記述した。培養乳腺上皮細胞の分化においても、浮遊させた collagen gel の収縮による細胞形態の変化が必要条件であると述べられている¹²⁾。本実験においても collagen は培養細胞の支持体としての働き以上に、gel を浮遊させることにより管腔形成が著明に認め

られたことは乳腺上皮細胞と同様に、細胞の形状が扁平から立方状に変形するような形態変化が、細胞分化に必要な因子と考えられる。図2に示すように、新生血管の管腔周囲のcollagen線維は、管腔から離れた部位に存在するcollagen線維に較べ、横紋が無く、微小で密な線維として認められ、新たに合成されたcollagen線維より構成されている。NicosiaとMadri³²⁾は新たに合成されたcollagen線維とglycoproteinの蓄積が血管形成の重要な調節効果をもつことを、in vitroの血管新生モデルを用いて免疫組織化学的に検索した。その結果、最初に出現するcollagen type Vとtype IVは、新生した血管を安定させるのに必要な基底膜を形成させると述べている。この基底膜成分の蓄積は血管新生の必要条件では無くむしろ抑制に働くと考えられる。

Buonassisi³³⁾, Gamse³⁴⁾とOohira³⁵⁾は大動脈と臍帯静脈の血管内皮細胞を単層培養し、合成された硫酸化GAGsの組成と分布を検索した。その結果、細胞表面と細胞間にはheparan sulfateが主成分として80%を占め、培養液中にはchondroitin sulfateが60%以上存在していると述べている。本研究においては表1に示すように、in vivo並びにin vitroの内皮細胞表面には、使用した全ての酵素による消化後も陽性を示していることより、heparan sulfateの存在が推察できる。in vitroの管腔周囲の微細な横紋のない線維は、S.H.で消化されていることより管腔周囲の微細なcollagen線維と培養内皮細胞表面にhyaluronic acidの存在が類推された。しかし、in vivoの管腔周囲の微細な横紋のない線維は、S.H.で消化されず、むしろABCで消化されていることよりdermatan sulfateの存在が類推された。図5b, 7bに示すように、PAM染色による銀粒子の沈着、RRの沈着には管腔側と非管腔側に差が認められ、細胞に極性が生じていることが窺われた。Wight³⁶⁾は内皮細胞が増殖と移動を刺激されたとき、proteoglycan sulfateとhyaluronic acidとわずかのproteochondroitin sulfateを

合成、分泌すると記述している。Ausprunk¹⁶⁾は、血管形成におけるGAGsの動態についてのToole^{14,15)}が述べた仮説にもとずいて、CAMにおけるGAGsの組成と分布を3段階に分けて検索し、形成初期にはhyaluronic acidが存在し、分化が進むにつれて硫酸化GAGsが増加することを示した。内皮細胞は継代培養を続けていくと、hyaluronic acidが減少し、heparan sulfateが増加すると述べられている³⁶⁾。本研究において、7~8日目CAMの毛細血管周囲のcollagen線維にdermatan sulfateの蓄積が認められたことは、毛細血管の成長が未成熟から成熟の段階へと移行する時期であることを推測させ、さらに、in vitroにおける管腔周囲のhyaluronic acidの存在は、毛細血管形成の初期段階であることが推測された。

今回の検索により新生血管の管腔形成に際し、基底膜の欠如、細胞の形態変化、GAGsの種類、細胞の極性の変化のうち、どれが本質的に分化誘導に関っているかを決定することは困難であった。今後、単離した内皮細胞の無血清培養における血管新生モデルを工夫することにより、さらに精密な分析が必要と思われる。

結 論

7~8日目のCAMをcollagen gelに包埋し、浮遊法で培養することによって、in vitroにおける単純な毛細血管新生モデルの作製が可能となった。このモデルを用いて血管新生時における培養内皮細胞の管腔形成に関連するGAGsの組成と分布を組織化学的に検索した。管腔形成にはcollagen gelの収縮による細胞の形態変化が必要であると考えられた。管腔形成を示した内皮細胞の周囲には基底膜は認められなかった。管腔形成を示した内皮細胞表面と周囲の微細な横紋のないcollagen線維上に、hyaluronic acidの存在が認められた。さらに、7~8日目CAM毛細血管周囲の横紋のあるcollagen線維上にdermatan sulfateの存在が認められた。従って、管腔形成初期にはhyaluronic acidが細胞外基質として蓄積し、血管の成長にともなっ

て, dermatan sulfate に置きかわることが明らかになった。さらに, 管腔形成を示した培養内皮細胞の表面には GAGs 消化酵素で消化されない heparan sulfate が認められた。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 終始御懇篤なる御指導, 御校閲を賜りました岩手医科大学歯学部口腔解剖学第一講座 野坂 洋一郎教授に深甚なる謝意を表します。

さらに終始御指導, 御鞭撻を戴きました岩手医科大学歯学部口腔解剖学第一講座 伊藤 一三助教授 (現奥羽大学歯学部口腔解剖学第一講座教授), 藤村 朗講師に深謝致します。

また, 御協力戴きました教室員各位に厚く御礼申し上げます。

尚, 本論文の要旨の一部は, 第29回歯科基礎医学会 (昭和62年8月28日 札幌), 第13回日本微小循環学会 (昭和63年5月20日 弘前) において発表した。

Abstract : The ultrastructural distribution of glycosaminoglycans (GAGs) in the extracellular matrix of capillary endothelial cells during angiogenesis was studied using chick chorio-allantoic membrane (CAM), histochemically in vivo and in vitro. For in vitro study, a simple model of angiogenesis was provided by the collagen gel culture method. The newly formed endothelial tubular structures in vitro were similar to the vascular channels in vivo. The observed in vitro and in vivo vascular tubes were stained with periodic acid hexamethylenetetramine silver, ruthenium red, and alcian blue, and digested in four enzymes (testicular hyaluronidase, streptomyces hyaluronidase, chondroitinase ABC and chondroitinase AC) to identify specific GAGs. Consequently, it was suggested that hyaluronic acid accumulated on the fine non-striated collagen fibrils of extracellular matrix components in the early stage of angiogenesis and was replaced by sulfated GAGs, especially dermatan sulfate during the vascular development.

文 献

- 1) Folkman, J. : Tumor angiogenesis. *Advances in cancer research* 43 : 175-203, 1985.
- 2) 三井洋司 : 血管, 器官形成研究会編 : 器官形成, 培風館, 東京, 180-188, 1988.
- 3) 今村 亨, 三井洋司 : 血管新生研究の最前線, 蛋白質核酸酵素, 33 : 373-381, 1988.
- 4) 井藤英喜 : 血管新生機序, 室田誠逸編 : 血管細胞の培養法とその応用, 現代化学, 増刊16, 東京化学同人, 東京, 13-18, 1989.
- 5) Hudlick, O. and Tyler, K.R. : Angiogenesis: The growth of the vascular system, Academic Press., London, 151-162, 1986.
- 6) Madri, J.A, Pratt, B.M. and Yannariello-Brown, J. : Endothelial cell-extracellular matrix interactions. In : Endothelial cell biology in health and disease. edited by Simionescu, N. and Simionescu, M. Plenum Press., New York, 167-186, 1988.
- 7) Gimbrone, M.A., Jr., Cotran, R.S., Leapman, S.B. and Folkman, J. : Tumor growth and neovascularization : an experimental model using the rabbit cornea. *J. Natl. Cancer Inst.* 52 : 413-427, 1974.
- 8) Klagsbrun, M., Knighton, D. and Folkman, J. : Tumor angiogenesis activity in cells grown in tissue culture. *Cancer Res.* 36 : 110-114, 1976.
- 9) Folkman, J. and Haudenschild, C. : Angiogenesis in vitro. *Nature* 288 : 551-556, 1980.
- 10) Nicosia, R., T'chao, R. and Leighton, J. : Histotypic angiogenesis in vitro : Light microscopic, ultrastructural, and radioautographic studies. *In Vitro* 18 : 538-549, 1982.
- 11) Montesano, R., Mouron, P. and Orci, L. : Vascular outgrowth from tissue explants embedded in fibrin or collagen gels : A simple in vitro model of angiogenesis. *Cell Biol. Int. Rep.* 9 : 869-875, 1985.
- 12) 泉 雅子, 林 正男 : 細胞外マトリックスから細胞骨格系へ, 細胞工学, 8 : 41-49, 1989.
- 13) Hay, E.D. : Collagen and embryonic development. In : Cell biology of extracellular

- matrix. edited by Hay, E.D. Plenum Press., New York, 379-409, 1981.
- 14) Toole, B.P. : Morphogenetic role of glycosaminoglycans (acid mucopoly-saccharides) in brain and other tissue. In : Neuronal Recognition. edited by Barondes, S.H. Plenum Press., New York. 275-329, 1976.
 - 15) Toole, B.P. : Glycosaminoglycans in morphogenesis. In : Cell biology of extracellular matrix. edited by Hay, E.D. Plenum Press., New York. 259-294, 1981.
 - 16) Ausprunk, D.H. : Distribution of hyaluronic acid and sulfated glycosaminoglycans during blood-vessel development in the chick chorioallantoic membrane. *Am. J. Anat.* 177 : 313-331, 1986.
 - 17) Hamburger, V. and Hamilton, H.L. : A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88 : 49-92, 1951.
 - 18) Maciag, T., Hoover, G.A., Stemerman, M. B. and Weinstein, R. : Serial propagation of human endothelial cells in vitro. *J. Cell Biol.* 91 : 420-426, 1981.
 - 19) Grinnell, F. and Bennett, M.H. : Fibroblast adhesion on collagen substrata in the presence and absence of plasma fibronectin. *J. Cell Sci.* 48 : 19-34, 1981.
 - 20) Luft, J.H. : Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.* 171 : 347-368, 1971.
 - 21) 山田和順 : ムコ糖の組織細胞化学的研究法, 蛋白質核酸酵素, 17 : 775-790, 1972.
 - 22) Heimark, R.L., Twardzik, D.R., Schwartz, S.M. : Inhibition of endothelial regeneration by type-beta transforming growth factor from platelets. *Science* 233 : 1078-1080, 1986.
 - 23) Maciag, T., Kadish, J., Wilkins, L., Stemerman, M.B. and Weinstein, R. : Organizational behavior of human umbilical vein endothelial cells. *J. Cell Biol.* 94 : 511-520, 1982.
 - 24) Olander, J.V., Bremer, M.E., Marasa, J.C. and Feder, J. : Fibrin-enhanced endothelial cell organization. *J. Cell Physiol.* 125 : 1-9, 1985.
 - 25) Madri, J.A., Williams, S.K. : Capillary endothelial cell cultures : Phenotypic modulation by matrix components. *J. Cell Biol.* 97 : 153-165, 1983.
 - 26) Montesano, R., Orci, L. and 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.
 - 27) Marks, R.M., Czerniecki, M. and Penny, R. : Human dermal microvascular endothelial cells : An improved method for tissue culture and a description of some singular properties in culture. *In vitro cellular developmental biology* 21 : 627-635, 1985.
 - 28) Moscatelli, D., Presta, M. and Rifkin, D.B. : Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis, and migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 2091-2095, 1986.
 - 29) Michalopoulos, G. and Pitot, H.C. : Primary culture of paranchymal liver cells on collagen membranes. *Exp. Cell Res.* 94 : 70-78, 1975.
 - 30) Yang, J., Richards, J., Bowman, P., Guzman, R., Enami, J., McCormic, K., Hamamoto, S., Pitelka, D. and Nandi, S. : Sustained growth and three-dimensional organization of primary mammary tumor epithelial cells embedded in collagen gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 : 3401-3405, 1979.
 - 31) Montesano, R. : Cell-extracellular matrix interactions in morphogenesis : an in vitro approach. *Experimentia* 42 : 977-985, 1986.
 - 32) Nicosia, R.F. and Madri, J.A. : The microvascular extracellular matrix : Developmental changes during angiogenesis in the aortic ring-plasma clot model. *Am. J. Pathol.* 128 : 78-90, 1987.
 - 33) Buonassisi, V. : Sulfated mucopolysaccharide synthesis and secretion in endothelial cell cultures. *Exp. Cell Res.* 76 : 363-368, 1973.
 - 34) Gamse, G., Fromme, H.G. and Kresse, H. : Metabolism of sulfated glycosaminoglycans in cultured endothelial cells and smooth muscle cells from bovine aorta. *Biochim. Biophys. Acta* 544 : 514-528, 1978.
 - 35) Oohira, A., Wight, T.N. and Bornstein, P. : Sulfated proteoglycans synthesized by vascular endothelial cells in culture. *J. Biol. Chem.* 258 : 2014-2021, 1983.
 - 36) Wight, T.N., Kinsella, M.G. and Potter-Perigo, S. : Proteoglycans synthesized and secreted by cultured vascular cells. *Extracellular Matrix : Structure and Function* : 321-332, 1985.