

## A1 腫瘍細胞由来の血管内皮増殖因子(VEGF)による胎生期血管内皮細胞産生蛋白 developmentally regulated endothelial locus 1 (Del 1)の発現誘導 青木雅人, 金森昌彦, 遊道和雄, 大森一生, 木村友厚 (富山医科薬科大・整形外科)

【目的】血管内皮増殖因子(VEGF)は血管内皮細胞に特異的に作用する血管新生因子である。血管新生過程において、定常状態では増殖しない血管内皮細胞はVEGFの刺激により増殖を開始、自らプロテアーゼを産生して細胞外マトリックスを酵素的に分解しマトリックス蛋白に接着しながら遊走することで管腔を形成することが知られている。また、VEGFは血管内皮細胞上に細胞外マトリックスとの主要な接着因子である $\alpha V\beta 3$ インテグリンの発現を誘導する。最近、embryonic endothelial cell protein: developmentally regulated endothelial locus 1 (Del 1)が胎生期血管内皮細胞に発現し、 $\alpha V\beta 3$ インテグリンをリガンドとして生理的な血管系の初期形成に重要な役割を担うことが報告された。しかしながら、病的血管新生過程にDel 1が関与するか否かについては未だ明らかではない。我々は腫瘍血管新生におけるDel 1の役割を明らかにするため、腫瘍細胞の産生するVEGFが血管内皮細胞のDel 1発現に及ぼす影響を検討した。

【方法】腫瘍細胞はマウスDUNN骨肉腫細胞と当教室にて分離樹立したマウス未分化肉腫高肺転移株RCT(+)および低肺転移株RCT(-)を使用した。1)各株細胞のVEGF mRNAの発現をNorthern blottingにて測定した。2)無血清培養後の培養上清中のVEGF濃度をELISA法にて測定した。3)血管内皮細胞はBelloniらによって樹立されたマウス肺由来血管内皮細胞(MLE)を(i)DMEM/F12培養液にて通常培養、(ii)培養液に各腫瘍細胞の培養上清を添加、(iii)培養液にリコンビナントVEGF(10-100ng/ml)を添加、(iv)培養液に各腫瘍細胞の培養上清と抗VEGF抗体(10 $\mu$ g/ml)を添加の各条件下に培養し、MLEにおけるDel 1 mRNAの発現をRT-PCR及びNorthern blottingにて検討した。4)各腫瘍細胞のDel 1の発現をNorthern blottingにて分析した。

【結果】RCT(+), RCT(-)およびDUNNいずれの腫瘍細胞もVEGFを産生していた(DUNN: 627.3 pg/mg cell protein/8-hour incubation, RCT(+): 490.6 pg/mg cell protein/8-hour incubation, RCT(-): 272.4 pg/mg cell protein/8-hour incubation)。各腫瘍細胞株およびMLEのいずれも無刺激ではDel 1の発現を認めなかった。MLEを各腫瘍細胞培養上清にて刺激するとDel 1の発現が誘導され、これらの発現は抗VEGF抗体により抑制された。また、MLEをリコンビナントVEGFにて刺激すると濃度依存性にMLEにDel 1の発現が誘導された。

【考察】本研究から、胎生期血管内皮細胞に発現するDel 1が腫瘍細胞の産生するVEGF刺激により、分化した血管内皮細胞にも発現誘導されることが明らかとなった。このことから、胎生期の血管系発生に係わるDel 1が、腫瘍血管新生にも関与することが示唆された。血管新生の過程において腫瘍細胞由来のVEGFは、血管内皮細胞上にDel 1の発現を誘導し、そのリガンドである $\alpha V\beta 3$ インテグリンを介して腫瘍細胞の細胞外マトリックスへの接着を亢進させ、血管新生を誘導するものと考えられる。

【結論】腫瘍細胞の産生するVEGFが既存血管由来の血管内皮細胞にDel 1発現を誘導したことから、腫瘍血管新生と胎生期血管形成に共通の分子機構が関与することが示唆された。

Tumor-derived VEGF induces expression of Del 1 in vascular endothelial cells. Masato Aoki, Masahiko Kanamori, Kazuo Yudoh, Kazuo Ohmori, Tomoatsu Kimura, Dept. of Orthopaedic Surg., Toyama Med. & Pharmaceutical Univ.

## A2 子宮内膜と血管新生—ヒト子宮内膜上皮細胞の単離培養法の確立と血管新生促進因子の産生

浅川恭行, 森田育男\*, 田中政信, 室田誠逸\*, 平川 舜

(東邦大学第一産婦人科, 東京医科歯科大学大学院細胞機能\*)

【目的】子宮内膜は受精卵の着床に備え、月経周期に従って増殖と剥離を繰り返している。このような組織の増殖には酸素、栄養の補充が必要なことより血管新生現象が進行する。従ってこれまで、血管新生の研究は主に腫瘍の増殖、糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチなど各病態の解明をめざして行われてきた。本研究では生理的狀態下での血管新生に焦点を絞り、この過程に働く血管新生因子の検索、ホルモンとの関係などの解明を目的に、本学会においては、血管新生因子産生細胞としてヒト子宮内膜上皮細胞に注目し、その純培養法による血管新生について報告する。

【方法】正常な月経周期を有しホルモン療法を受けていない症例のうち、良性子宮疾患(子宮筋腫)の適応で摘出し、子宮内膜を採取する承諾の得られた35歳から45歳までの月経周期8日から10日目の増殖期の子宮内膜を用いた。血管新生の定量化は、タイプIコラーゲン上にウシ頸動脈由来血管内皮細胞を播種し培養した後、同じコラーゲンでふ被覆し、培養液を加え、4日後の管腔形成を写真に撮り、その長さを画像解析法で測定した。なお、子宮内膜上皮細胞は10%ウシ胎児血清含有MEMで培養し、各ステージ2日間のconditioned mediumを採取し、血管内皮細胞3次元培養時に種々の割合で添加し、血管新生への影響を調べた。

【結果】無菌的に採取した子宮内膜を細切後、コラーゲナーゼ(clostridium histolyticum)で37 $^{\circ}$ C、2時間振盪した。この振盪液をナイロンメッシュ(38 $\mu$ m)にかけ、メッシュ上に残った細胞と通過した細胞に分離した。メッシュ上の細胞は、MEM培地で洗い落とし、デイッシュに播種し、6時間後にメディアム交換を行うことにより純化した。一方、通過した細胞はそのままデイッシュ上に播種した。この各々の細胞をサイトケラチン抗体、ピメンチン抗体で染色したところ、メッシュ上から得られた細胞はサイトケラチン抗体で100%染色されたが、ピメンチン抗体では染色されなかった。一方、通過した細胞はピメンチン抗体でのみ染色された。以上の結果より、メッシュ上の細胞は子宮内膜上皮細胞であること、通過した細胞は子宮内膜間質細胞であることが同定された。次に、これら細胞のconditioned mediumにおける血管新生促進作用を調べたところ、上皮細胞でよりその促進効果が認められた。そこで、この上皮細胞における血管新生促進因子の検討を行った結果、この因子はstationary phaseでより産生されること、また濃度依存性であることが確認された。さらにVascular Endothelial Growth Factor (VEGF)中和抗体によりその血管新生促進作用が失われることよりVEGFであることが確認された。

【考察】従来、子宮内膜で血管新生促進因子が産生されていることは知られていたが、そのoriginに関しては培養法が確立されていなかったことより、その同定が遅れていた。今回、これら細胞の純培養法が確立できたことより、子宮内皮上皮細胞からVEGFが産生されていることが明らかとなった。今後、このVEGF産生が性ホルモンで影響を受けるか否かについて、その機序を含め検討する予定である。

【結論】正常子宮内膜上皮細胞はVEGFを産生することにより子宮内膜の増殖を調節することが明らかとなった。この成績より今後避妊、子宮内膜症に対する新たな治療法の開発の可能性が示唆された。

Endometrium and angiogenesis— Isolation of human endometrial epithelial cells and production of angiogenic factors  
Yasuyuki Asakawa, Ikuo Morita\*, Masanobu Tanaka, Sei-itsu Murota\*, Shun Hirakawa

First Dept. Obstet. Gynecol., Toho University School of Medicine, \* Dept. Cellular Physiol. Chem. Graduate School, Tokyo Medical and Dental University