

Studies on Interactions between Endothelial Cells and Vascular Pericytes, Using in vitro Co-culture Systems – Elucidation of Roles of Pericytes in Growth, Function and Lipid Peroxide-induced Damage of Endothelial Cells, and of the Nature of Endothelium-derived Pericyte Growth Factor –

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8422

試験管内共存培養系を用いた 血管内皮細胞—周皮細胞間相互作用の解析

—内皮細胞の増殖，機能，傷害における周皮細胞の役割と
内皮細胞由来周皮細胞増殖因子の実体の解明—

金沢大学医学部内科学第一講座（主任：小林健一教授）

山 岸 昌 一

（平成5年1月18日受付）

細小血管の内側を覆う内皮細胞とそれをとり巻く周皮細胞との細胞間相互作用を明らかにする目的で，初代培養ヒト臍静脈内皮細胞とウシ網膜周皮細胞を用いた試験管内共存培養系を作製し，内皮細胞と周皮細胞が相互の増殖と機能にどのような影響をおよぼすかを調べた。その結果，まず，内皮細胞の増殖が周皮細胞により抑制されることが見いだされた。また，周皮細胞は内皮細胞のプロスタサイクリン産生を有意に促進した。周皮細胞によるこれらの効果は，2種の細胞間の接触を必要とし，ヒト線維芽細胞によっては代用されなかったことから，周皮細胞膜表面に局在し隣接する内皮細胞に“指令伝達”を行う細胞種特異的なシグナルによって仲介されるものと考えられた。さらに，周皮細胞は過酸化脂質による内皮細胞傷害を防止しうることも見いだされた。一方，周皮細胞の増殖は内皮細胞により促進された。この増殖促進効果は，2種の細胞間の物理的接触を必要とせず，したがって，内皮細胞に由来する分泌性因子によって担われるものと考えられた。筆者は，この主たる因子がエンドセリン1であることを結論づける証拠も得た：すなわち，(1)周皮細胞の純培養系にエンドセリン1を添加すると内皮細胞の共存下と同程度に周皮細胞の増殖が促進されること，(2)抗エンドセリン1抗体を共存培養系に加えると内皮細胞の周皮細胞増殖促進効果が消失することである。周皮細胞から poly (A)⁺RNA を分離しノーザンブロット分析を行った結果，周皮細胞はエンドセリン1に高親和性のA型レセプターをコードする mRNA を発現していた。以上本研究により，周皮細胞は内皮細胞の増殖を制御するのみならず，内皮細胞の特異機能を保持し，内皮細胞傷害に対しても保護的に作用しうること，また，内皮細胞はエンドセリン1の分泌を介して周皮細胞の増殖をコントロールしうることはじめて明らかにされた。これらの知見から，血管内皮細胞と血管周皮細胞の相互作用は細小血管の恒常性維持に重要な役割を果たしていると推定され，この相互作用の破綻は血管新生，血栓形成，内皮傷害といった血管病変の発生や増悪につながる可能性が考えられた。本研究は，糖尿病性血管症をはじめとする種々の血管症の病因，病態，予防・治療手段を明らかにするうえで新しい視点を与えたものと考えられる。

Key words endothelial cell, pericyte, prostacyclin, lipid peroxide, endothelin

細小血管は血管の内側を覆う内皮細胞とそれをとり巻く周皮細胞から構成される¹⁾。内皮細胞は循環血流中の細胞成分・非細胞成分に対する障壁としての役割をもつほか，抗血栓性のプロスタサイクリン^{2,3)}や血管を収縮，弛緩させるエンドセリン⁴⁾，一酸化窒素 (NO)⁵⁾ といった血管作動性物質を産生することが知られている。一方，周皮細胞は血管組織構築上の解剖学的位置⁶⁾や細胞内における筋性アクチン⁷⁾・ミオシンフィラメント⁸⁾の存在から大中血管の平滑筋細胞に相当すると目され，細小血管における緊張調節に関係すると考えられてきた。しかし，周皮細胞の生物学的性質や生理的役割についてはなお不明な点が多く，内皮細胞と周皮細胞との細胞間相互作用やそれを担う因

子についてもほとんど明らかでない。これらの課題の解決は，血管とくに細小血管の恒常性維持のしくみや糖尿病性血管症をはじめとする種々の血管症の発生・進展の機構，病態，さらには予防・治療法を明らかにするうえで重要と考えられる。

著者らは，生体からそれぞれ独立に分離した内皮細胞，周皮細胞の純培養系および共存培養系を確立し，内皮細胞，周皮細胞の個々の性質やこれら2種の細胞間の相互作用につき試験管内で追求することを可能にした^{9)~10)}。本研究では，初代培養ヒト臍静脈内皮細胞とウシ網膜周皮細胞の共存培養系を用い，[I] 内皮細胞の増殖，機能，傷害におよぼす周皮細胞の効果，[II] 周皮細胞の増殖におよぼす内皮細胞の効果とそれを担う

Abbreviations: ECGS, endothelial cell growth supplement; ED₅₀, dosage giving half-maximal effect; kb, kilobases; LDL, low density lipoprotein; LHO, linoleate hydroperoxide; PGF_{1α}, prostaglandin F_{1α}; SDS, sodium dodecyl sulfate; 20x SSC = 3 M sodium chloride and 0.3 M sodium citrate; 5x SSPE = 0.9 M sodium

因子に関して検討した。

材料および方法

1. 材 料

1. ヒト臍静脈内皮細胞

著者らの既述の方法により⁸⁾ ヒト臍帯より臍静脈血管内皮細胞を初代培養化した。実験には15~20継代目の細胞を用いた。95%以上の細胞がアセチル化低密度リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) ととりこみ能を有し血管内皮細胞と同定された (図 1A, B)。

2. ウシ網膜周皮細胞

著者らの既述の方法により⁸⁾ ウシ眼球より網膜血管周皮細胞を分離した。実験には5~10継代目の細胞を用いた。95%以上の細胞が α -平滑筋アクチン陽性で周皮細胞と同定された (図 1C)。

II. 方 法

1. 共存培養系の作製

培養化した内皮細胞と周皮細胞とから図 2 に示す 2 種類の共存培養系を作製した。すなわち、ひとつの系では 2 種の細胞が物理的に直接接触しえる条件下で、もうひとつの系では孔径 $0.4\mu\text{m}$ の Transwell (Costar, Pleasanton, CA) を介し細胞種間の接触を阻止した条件下で共存培養を行った。内皮細胞と周皮細胞をそれぞれ $3\mu\text{g/ml}$ と $10\mu\text{g/ml}$ のマイトマイシン C (Sigma, St. Louis, MO) で 37°C 、2 時間処理し分裂能を失わせた後、24 穴クラスターディッシュに内皮細胞の場合は 2×10^4 、周皮細胞の場合は 1×10^4 個播種しフィーダー層とした。細胞の接着を確認したのち、接触共存培養系ではフィーダー層上に直接 1×10^4 個の細胞を播き、非接触共存培養系では Transwell 内に 3.3×10^3 個の細胞を播いた。ヒト胎児肺由来の線維芽細胞株である MRC-5 細胞¹¹⁾ のフィーダー層は周皮細胞と同様に調製した。

2. 生細胞数の算定

生存細胞数は内皮細胞もしくは周皮細胞を 0.25% トリプシンで分散後、0.17% (w/v) トリパンブルーを含む培地で希釈し血

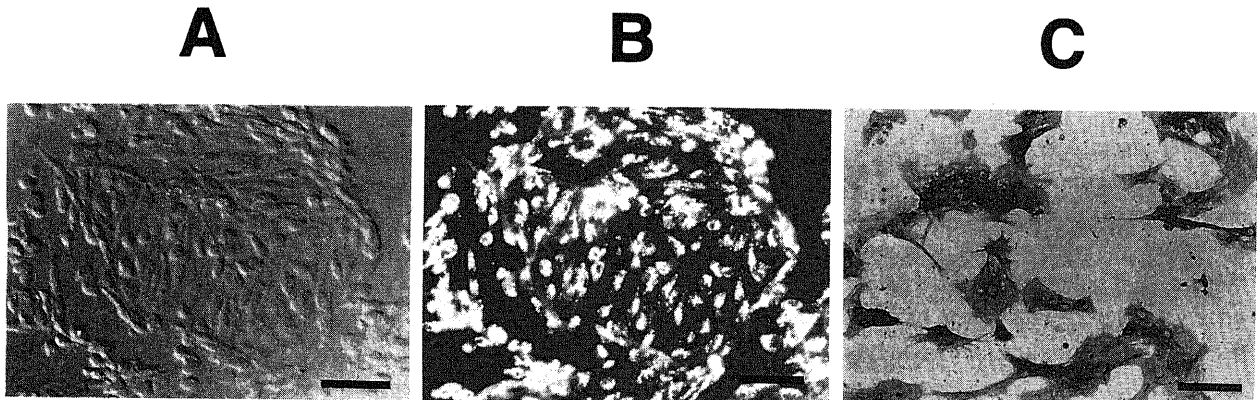


Fig. 1. Human umbilical endothelial cells and bovine retinal pericytes in culture. A: Phase contrast micrograph of human umbilical endothelial cells. B: Staining of endothelial cells in the same field with acetylated LDL labeled with 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate. C: Staining of bovine retinal pericytes with a monoclonal antibody against α smooth muscle actin. Bars, $50\mu\text{m}$.

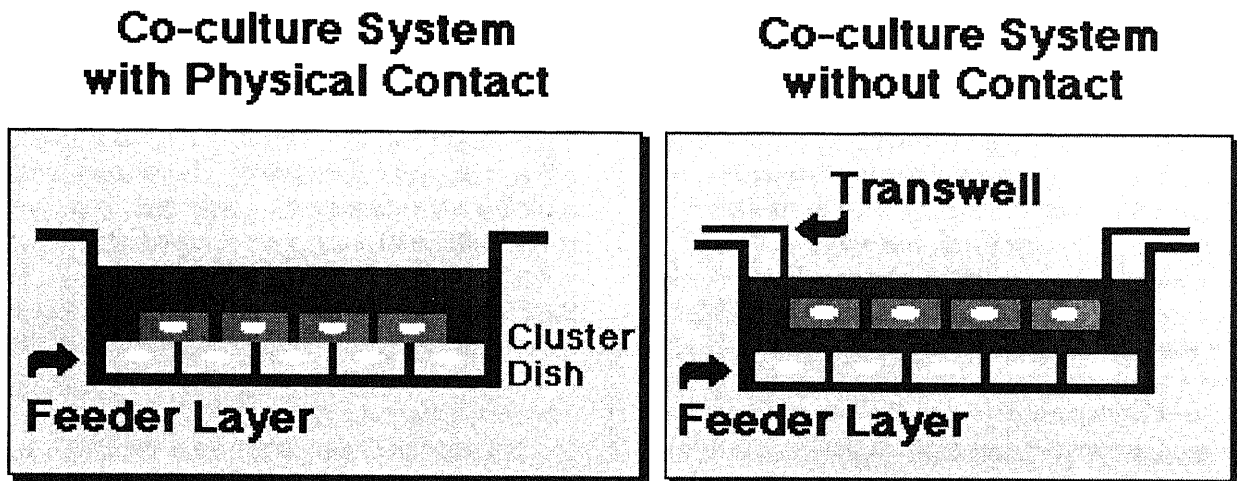


Fig. 2. Co-culture systems.

chloride, 50 mM sodium phosphate (pH 7.7) and 5 mM ethylenediamine tetraacetic acid; TGF- β , transforming growth factor β

球計算盤を用いて算定した。接触共存培養系では、各時点での総生存細胞数から同一期間単独で培養したフィーダー層の細胞数を引いて生存細胞数とした。

3. プロスタサイクリンの定量

培地中のプロスタサイクリン最終代謝産物 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$) を Amersham (Amersham, UK) 社製 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ enzyme immunoassay system を用いた酵素抗体法で測定した。接触共存培養系では、培地中の 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 総量から同一期間単独で培養したフィーダー層の培地中の 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 量を引いて 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 産生量とした。

4. リノール酸ヒドロペルオキシドの調製

Thomas らの方法に準じて¹²⁾ リノール酸ヒドロペルオキシド (linoleate hydroperoxide, LHO) を調製した。すなわち 0.22g リノール酸 (Sigma) を 0.7ml のエタノールに溶かし、さらに 0.05M ホウ酸緩衝液 (pH9.0) 100ml に溶解させた。0℃で溶液中に十分量の酸素を吹きこみ、soybean oxidase (4050 units/ml, Sigma) を添加し、0℃で10分浸透した。その後塩酸にて反応を止め、20% エーテル80% ヘキサン溶液で3回抽出をくりかえし、溶媒を24℃で蒸発させ LHO を調製した。LHO の定量は Yagi の方法¹³⁾ に準じた。

5. 内皮細胞傷害

あらかじめ内皮細胞を 1μCi/ml の [³H]-2-deoxy-D-glucose (New England Nuclear, Boston, MA, NET-549A) 存在下で18時間、37℃で浸透した後、0.25%トリプシンで分散し、 8×10^5 個の細胞を6穴のクラスターディッシュ (Costar) 中の周皮細胞フィーダー層上に播種した。3時間後、細胞の接着を確認したうえで、0.5%牛血清アルブミン (Sigma) を含むハンクス液で2回洗浄し、LHO を添加して37℃で1時間浸透した。内皮細胞傷害の程度は、培地中に放出された³Hの放射活性をA、2% Triton X-100 で可溶性化した細胞中の放射活性をBとし、LHO を添加しないときの培地中、細胞中の放射活性をそれぞれ A₀, B₀ とするとき

$$\left[\frac{A}{A+B} - \frac{A_0}{A_0+B_0} \right] \times 100(\%)$$

で算定した¹⁴⁾。個々の放射活性は液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

6. ノーザンブロット分析

150cm²の細胞培養用フラスコ (Corning, N. Y.) 中でコンフルエントとなった周皮細胞から Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いて poly (A)⁺RNA を分離した¹⁵⁾。3.5μg 相当の poly (A)⁺RNA を 1.1M ホルマリンを含む1.5%アガロースゲルにて電気泳動し、ナイロンフィルター (ハイボンド N⁺, Amersham) に転写した。転写後、フィルターに UV ストラタリンカー 2400 (Stratagene, CA) を用いて 120ミリジュールの波長 254nm の紫外線を照射し、RNA を固定した。ついで、フィルターを50%ホルマリン、5×SSPE (0.9 M NaCl, 50mM sodium phosphate pH7.7, 5mM ethylenediamine tetraacetic acid), 5×デンハルト液 (1%ポリビニールピロリドン, 1%ウシアルブミン, 1%フィコール), 0.5%ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS), 200μg/ml 変性サケ精子 DNA (Sigma) からなる溶液 5ml 中で42℃, 4時間プレハイブリダイズさせた後、50%ホルマリン, 5×SSPE, 5×デンハルト液, 0.5% SDS, 340μg/ml 変性サケ

精子 DNA, プロブ 15ng からなる溶液 2ml 中で42℃, 16時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、フィルターを 2×SSC (0.3M NaCl, 0.03M sodium citrate, pH7.0), 0.1% SDS にて室温で30分, 2回, ついで 0.1×SSC, 0.1% SDS にて42℃で20分, 2回洗浄し、-80℃で5日間オートラジオグラフィーを行った。なお、本実験で使用した A, B型エンドセリンレセプター cDNA クローン¹⁶⁾¹⁷⁾ は日本ロシュ研究所, 古市泰宏, 宮本 力両博士より分与された。cDNA プロブの標識はランダムプライマーラベリングキット (Stratagene) と [α -³²P] デオキシシチジン三リン酸 (Amersham) を用いて行い¹⁸⁾, 1×10^6 cpm/μg の比活性を得た。

成 績

1. 血管内皮細胞の増殖, 機能, 傷害におよぼす周皮細胞の効果

1. 周皮細胞は内皮細胞の増殖を抑制する

図3は、ウツ網膜血管周皮細胞の存在・非存在下で培養したヒト臍静脈内皮細胞の増殖曲線を示す。内皮細胞を周皮細胞のフィーダー層上に直接重層して培養すると、内皮細胞の増殖は有意に抑制され、培養開始後3, 6, 7.5日目の生存内皮細胞数は純培養した場合に比しそれぞれ71%, 65%, 69%と減少した

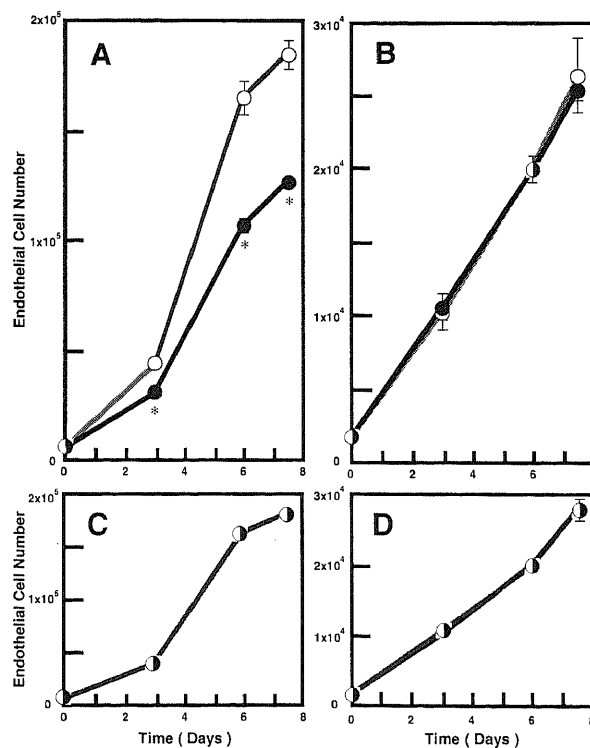


Fig. 3. Effects of pericytes on growth of endothelial cells. Endothelial cells were cultured with (●) or without (○) pericytes (A and B) or fibroblasts (C and D). A and C: Co-culture with physical contact between two cell types. B and D: Co-culture without physical contact. The number of viable endothelial cells is indicated on the ordinate. Culture period after cell attachment is indicated on the abscissa. Each point represents the mean for triplicate experiments; vertical bars show SD when larger than the symbol; ●, the mean values that are in too close proximity to be indicated individually. * $p < 0.01$, compared to the number of endothelial cells cultured alone (Student's t test).

(図 3A). しかし, 内皮細胞を Transwell 内に播き周皮細胞フィーダー層から離して培養すると, 周皮細胞の影響は認められず, 生存内皮細胞数は純培養時と同程度に増加したことから(図 3B), 周皮細胞による内皮細胞増殖の抑制には 2 種の細胞間の物理的接触が必要と考えられた. ヒト線維芽細胞をフィーダー層として用いた場合には, 接触・非接触いずれの条件下でも, 内皮細胞の増殖は影響をうけなかった(図 3C, D).

2. 周皮細胞は内皮細胞のプロスタサイクリン産生を促進する

周皮細胞が内皮細胞の特異機能にも影響しうるかどうかをみるため, 周皮細胞の存在・非存在下で培養した内皮細胞のプロスタサイクリン産生量を測定した. 表 1 に示すように, 周皮細胞との接触共存培養系で内皮細胞の 6-keto-PGF_{1α} 産生は 166% と有意に増加し, 非接触共存培養系でも周皮細胞の共存は内皮細胞の 6-keto-PGF_{1α} 産生を 1.3 倍高めた. 線維芽細胞をフィーダー層とした共存培養系では, 2 細胞種間の接触の有無にかかわらず, 内皮細胞の 6-keto-PGF_{1α} 産生に変化は認められなかった(表 1).

Table 1. Effect of pericytes on 6-keto-PGF_{1α} production by endothelial cells

Culture conditions	6-keto-PGF _{1α} (pg/10 ⁶ cells)
1) With physical contact	
a) Endothelial cells co-cultured with pericytes	* 1152.2 ± 61.6
Endothelial cells cultured alone	694.4 ± 25.2
b) Endothelial cells co-cultured with fibroblasts	711.5 ± 56.8
Endothelial cells cultured alone	686.7 ± 126.0
2) Without contact	
a) Endothelial cells co-cultured with pericytes	476.0 ± 140.0
Endothelial cells cultured alone	365.4 ± 140.0
b) Endothelial cells co-cultured with fibroblasts	345.6 ± 62.7
Endothelial cells cultured alone	351.7 ± 63.7

Values represent means ± SD of 9 replicate experiments. *p < 0.01, compared to endothelial cells cultured alone (Student's *t* test).

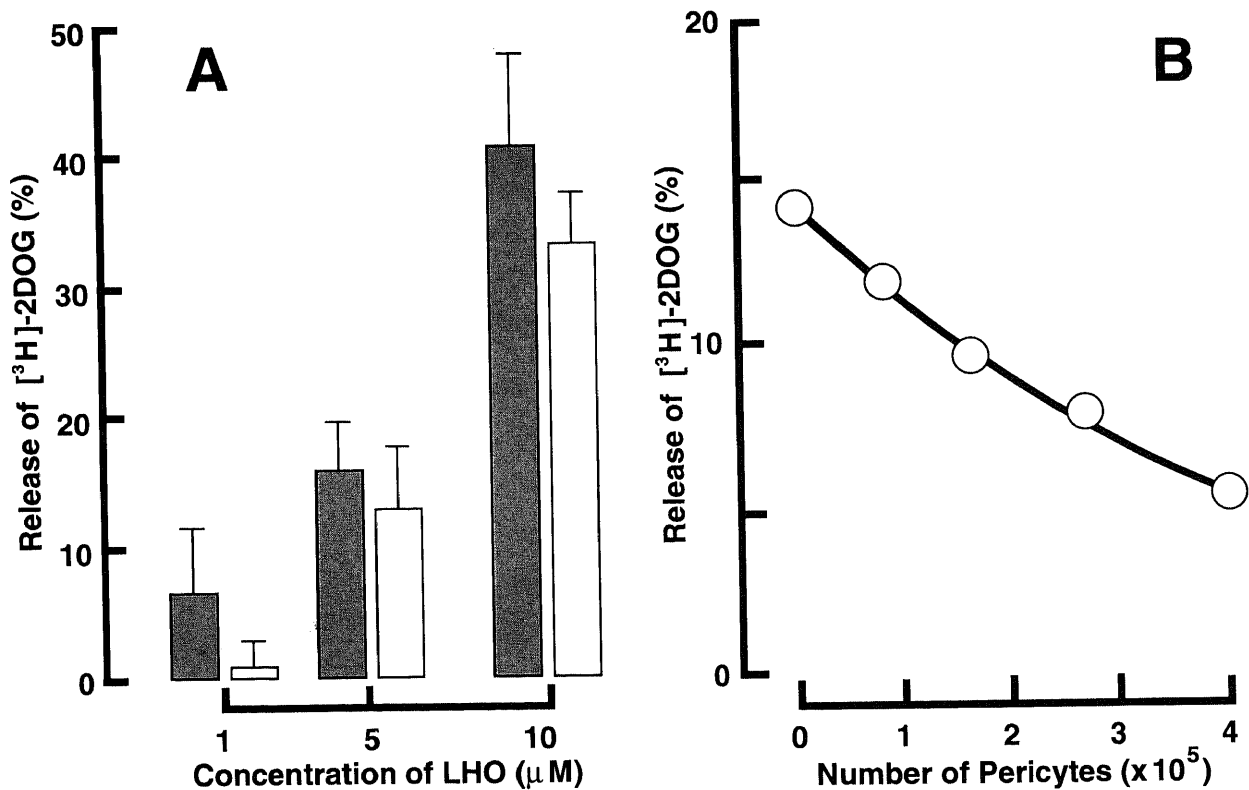


Fig. 4. Protection by pericytes against LHO-induced endothelial cell damage. Damage of endothelial cells was estimated by the release of ³H radioactivity from endothelial cells that had incorporated [³H]-2DOG. Each data are expressed as the mean ± SD of percentage of ³H radioactivity released from [³H]-2DOG-labeled endothelial cells. A: Effect of co-culture with pericytes on endothelial cell damage at various concentrations of LHO. Shaded box, endothelial cells cultured alone. Open box, endothelial cells cultured with pericytes (4 × 10⁶ cells). B: Density-dependent protection by pericytes against LHO-induced endothelial cell damage. The indicated numbers of pericytes were seeded in Costar 6-well cluster dishes (9.6 cm²/well), on which endothelial cells (8 × 10⁵) were plated and treated with 1 μM LHO.

3. 周皮細胞は過酸化脂質による内皮細胞傷害を防止する
血管内皮の傷害は種々の血管症発症につながる初期病変のひとつと考えられている¹⁹。筆者はつぎに、代表的血管内皮傷害因子である過酸化脂質による内皮細胞の傷害が周皮細胞の共存下でどう影響されるかを調べた。その結果、図4に示すように、周皮細胞のフィーダー層上で培養した内皮細胞は純培養した内皮細胞に比しより軽度にしかならぬことが見いだされた。この周皮細胞による内皮細胞傷害の防止は、1~10 μ MのLHO濃度でも観察され(図4A)、周皮細胞密度に依存していた(図4B)。

II. 周皮細胞の増殖におよぼす内皮細胞の影響

1. 内皮細胞は周皮細胞の増殖を促進する

筆者はつぎに、上層に周皮細胞、下層に内皮細胞を置いた共存培養系で、周皮細胞の増殖が内皮細胞によってどのように影響されるかを検討した。この結果、周皮細胞が内皮細胞増殖を抑制したのとは逆に、内皮細胞は周皮細胞増殖を促進することが見いだされた。すなわち、図5Aに示すように、純培養した周皮細胞は12日間で約2倍にしか増えなかったのに比し、内皮細胞のフィーダー層上で培養した周皮細胞は6日目で3倍、9、12日目には4倍に増加していた。この内皮細胞による周皮細胞増殖促進には必ずしも2種の細胞間の接触は必要ではなく、内皮細胞との非接触共存培養系でもほぼ同程度の周皮細胞増殖促進効果が観察された(図5B)。したがって、内皮細胞による周皮細胞の増殖促進は内皮細胞から分泌される何らかの液性

因子によって仲介されるものと考えられた。

2. 内皮細胞由来増殖因子の本体はエンドセリン1である

内皮細胞が分泌する生理活性物質のうちエンドセリン1は血管平滑筋細胞^{20,21}や腎メサンギウム細胞²²のDNA合成や細胞増殖を促進しうることが示唆されていることから、筆者はエンドセリン1が周皮細胞の増殖を促進する因子の本体ではないかと推測し、周皮細胞の純培養系にエンドセリン1を添加して周皮細胞の増殖を調べた。実際、エンドセリン1は濃度依存性に周皮細胞の増殖を促進することが見いだされ、10⁻⁸M以上の濃度では内皮細胞の共存下と同程度の周皮細胞増殖促進効果が得られた(図6)。ED₅₀(dosage giving half-maximal effect)はおおよそ10⁻⁸Mであった。また、凍結乾燥された抗ヒトエンドセリン1ウサギ抗血清を1バイアルあたり50 μ lに調製し、非接触共存培養系に加えると、内皮細胞による周皮細胞増殖促進効果は濃度依存性に抑制され、10%抗血清の添加では内皮細胞による増殖促進効果は完全に消失した(図7)。したがって、内皮細胞の周皮細胞増殖促進効果を担う主たる因子はエンドセリン1であると結論された。

ウシ網膜周皮細胞から分離した poly(A)⁺RNA をノーザンブロットハイブリダイゼーションで分析した結果、図8に示すように、A型エンドセリンレセプター cDNA とハイブリダイズする鎖長3.0 kilobases (kb) の単一のバンドが検出された。B型レセプター cDNA をプローブとした場合にはバンドは認められなかった。このことは、周皮細胞がエンドセリン1に高親和

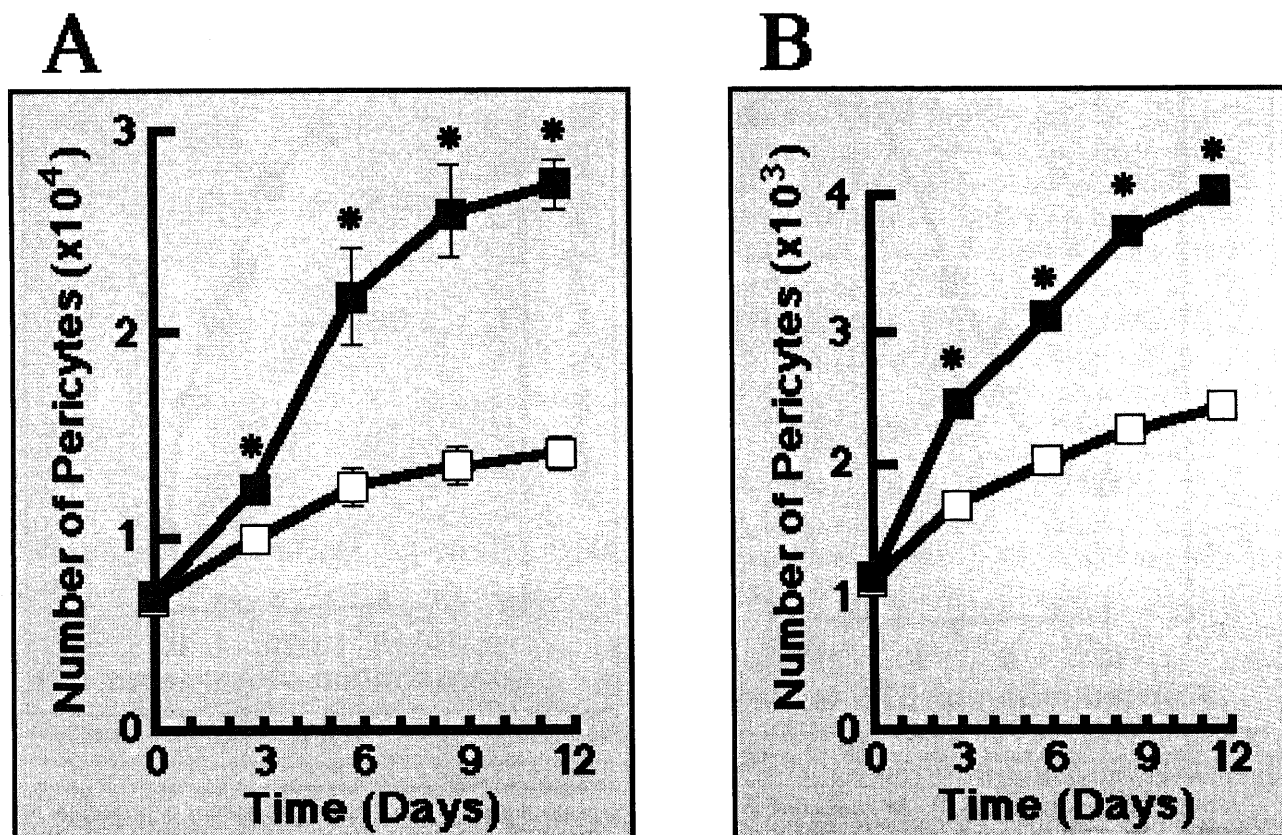


Fig. 5. Effects of endothelial cells on growth of pericytes. Pericytes were cultured with (■) or without (□) endothelial cells. A: Co-culture with physical contact between the two cell types. B: Co-culture without physical contact. The number of viable pericytes is indicated on the ordinate. Culture period after cell attachment is indicated on the abscissa. Each point represents the mean \pm SD of 3(A) or 6(B) replicate experiments. * p <0.01, compared to the number of pericytes cultured alone (Student's t test).

性²³⁾のA型レセプターをコードする mRNA を発現していることを示す。

考 察

本研究で筆者は、初代培養ヒト臍静脈内皮細胞とウツ網膜周皮細胞の共存培養系を用いて2種の細胞間相互作用を増殖と機能の両面から検討した。その結果、まず、周皮細胞は内皮細胞との物理的接触を介して内皮細胞の増殖を抑制することが見いだされた。この結果は、網膜周皮細胞が副腎毛細血管内皮細胞の増殖に対して抑制能を示したという D'Amore ら²⁴⁾の観察と一致する。ただ、本研究と彼らの報告とで増殖抑制の程度に差が認められるが、これは endothelial cell growth supplement (ECGS) やヘパリン、 α fibroblast growth factor など培地中に添加した増殖因子のちがいによるものであろう⁸⁾。また、線維芽細胞をフィーダー層とした共存培養系では、2種の細胞間の接触の有無にかかわらず内皮細胞の増殖は影響をうけなかった(図3)。したがって、周皮細胞による内皮細胞増殖抑制効果は、周皮細胞膜表面に局在する細胞種特異的なシグナルによって仲介されるものと考えられる。このシグナル分子の候補としては transforming growth factor β (TGF- β) やヘパラン硫酸が考えられる。Sato ら²⁵⁾は、内皮細胞と周皮細胞が共存すると血管内皮細胞の産生するプラスミノゲンアクチベータによりプラスミノゲンがプラスミンへと変換され、それによって潜在型

TGF- β が活性型となり内皮細胞の増殖を抑制するとしている。TGF- β は DNA 合成の抑制²⁶⁾あるいは細胞外基質の調節²⁷⁾を介して内皮細胞の増殖を抑制しうると考えられる。ヘパラン硫酸は周皮細胞表面に最も多量に存在するグリコサミノグリカンで血管新生抑制活性をもつことが知られている²⁸⁾²⁹⁾。これらの知見から、内皮細胞の増殖に影響をおよぼす周皮細胞の量的、質的異常はおそらく糖尿病性網膜症の増殖性変化や悪性腫瘍、関節リウマチ、尋常性乾癬などにおける血管新生と深く関与しているものと思われる。

本研究ではまた、周皮細胞が内皮細胞のプロスタサイクリン産生能を高めることが見いだされた。プロスタサイクリンは内皮細胞で主に産生されるプロスタノイドで強力な血小板凝集抑制作用と血管拡張作用を有することから³⁰⁾、内皮細胞におけるプロスタサイクリン産生能の低下は主に血小板で産生されるトロンボキサン A₂との量的平衡関係に乱れを生じ、血小板凝集、血栓形成を引き起こし種々の疾患の増悪因子になりうると思われる。線維芽細胞との共存では内皮細胞のプロスタサイクリン産生能は影響されなかったことから、周皮細胞は内皮細胞の増殖のみならず機能にも細胞種特異的な影響をおよぼし、虚血性病変の進展に保護的に作用しうると考えられる。周皮細胞による内皮細胞のプロスタサイクリン産生能促進が2種の細胞の接触時により顕著であったことから、増殖抑制と一部共通する機構によると推定され、この場合も TGF- β ³⁰⁾やヘパラン硫酸が関

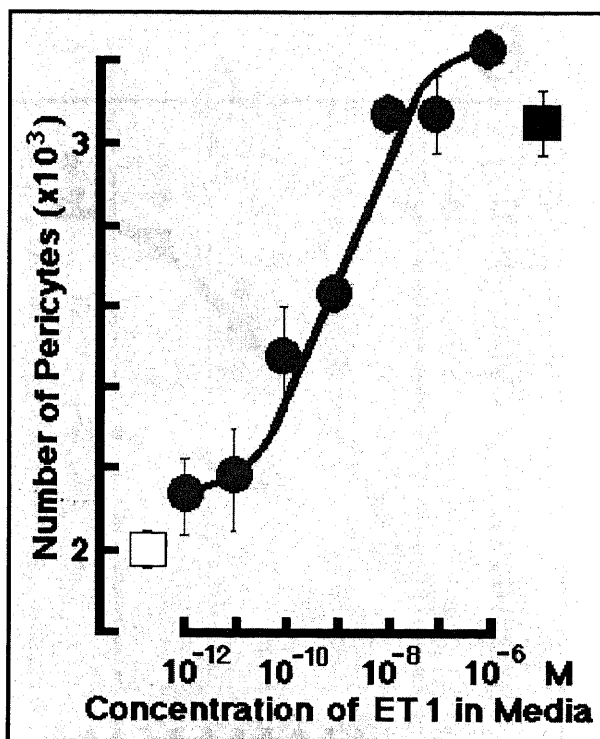


Fig. 6. Effects of endothelin 1 on growth of pericytes. Pericytes were cultured alone with human endothelin 1 in Transwell chambers for 6 days. The number of viable pericytes is indicated on the ordinate. Concentrations of endothelin 1 in the medium are indicated on the abscissa. Each point represents the mean \pm SD of triplicate experiments. ●, the values with endothelin 1. □, the value without endothelin 1. ■, the value for co-culture with endothelial cells minus endothelin 1. ET 1, endothelin 1.

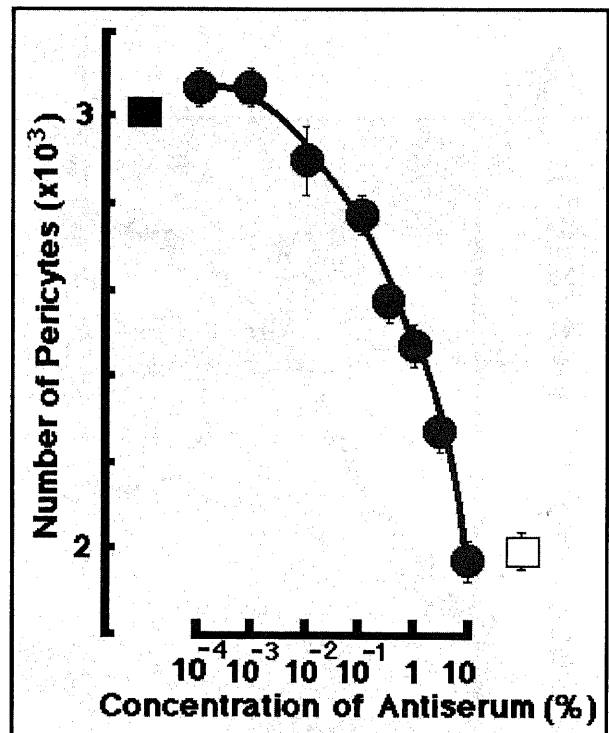


Fig. 7. Effects of anti-endothelin 1 antiserum on endothelial cell-dependent growth of pericytes. Pericytes were co-cultured with endothelial cells in the Transwell system in the presence of anti-human endothelin 1 antiserum for 6 days. The number of viable pericytes is indicated on the ordinate. Concentrations of the antiserum in the medium are indicated on the abscissa. Each point represents the mean \pm SD of triplicate experiments. ●, the values with antiserum. ■, the value without antiserum. □, the value for pericytes cultured alone without antiserum.

与しているかもしれない。TGF- β は血管内皮細胞におけるエンドセリン1の分泌を刺激することが知られており³¹、エンドセリン1が血管内皮細胞にオートクリンに作用しプロスタサイクリン産生能を促進している³²可能性も考えられる。

さまざまな因子による内皮細胞傷害は血管の障壁としての機能を破綻させ血管透過性を亢進させるのみならず、内皮細胞のもつ抗血栓能や抗凝固能を障害し動脈硬化症をはじめとする種々の血管症発症の引き金になると考えられている。さらに、近年代表的な血管内皮細胞傷害因子である過酸化脂質が糖尿病性血管症の進展と深くかかわりをもつことが示唆されてきている^{33,34}。したがって、過酸化脂質による内皮細胞傷害が共存する周皮細胞の密度に依存して軽減されたこと(図A4)は、周皮細胞が内皮細胞保護的に作用し細小血管のホメオスタシス維持に重要な役割を演じていることを強く示唆するものである。また、LHOをはじめとする過酸化脂質は内皮細胞におけるプロスタサイクリンの生合成を抑制しうることから³⁵、周皮細胞は内皮細胞のプロスタサイクリン産生能、細胞保護の両面に影響を与え種々の血管症の増悪を阻止している可能性が考えられる。

一方、内皮細胞との共存により周皮細胞の増殖は有意に促進された。この増殖促進効果は必ずしも2種の細胞間の物理的接触を必要としなかったことから、内皮細胞は主として分泌性の因子を介して周皮細胞の増殖を促進するものと考えられた。本研究で筆者は、この分泌性因子の実体はエンドセリン1であることを示す証拠を得た。そのひとつは、培養培地へのエンドセ

リン1添加が内皮細胞フィーダー層を代用することである(図6)。周皮細胞増殖促進のED₅₀値は、平滑筋細胞や腎メサンギウム細胞のDNA合成、細胞増殖誘導時²⁰⁻²²と同様でおよそ10⁻⁹Mであった。もうひとつは、内皮細胞による周皮細胞の増殖促進効果が抗エンドセリン1抗体で中和されることである(図7)。エンドセリン1と周皮細胞との相互作用に関しては、アイトープで標識したエンドセリン1を用いた検討でウシ網膜周皮細胞にエンドセリン1に高親和性で特異的な結合部位の存在が指摘されている³⁶。AおよびB型エンドセリンレセプターcDNAをプローブとしたノーザンブロットハイブリダイゼーションによる今回の検討でも、ウシ網膜周皮細胞はエンドセリン1と高親和性を示すA型レセプター²³をコードするmRNAを発現していた。おそらくエンドセリン1は平滑筋細胞³⁷におけると同様A型レセプターを介して周皮細胞に作用し、周皮細胞の収縮³⁸、増殖制御を行っているものと推測される。最近、網膜内皮細胞においてもエンドセリン1の産生が証明された³⁹。したがって、毛細血管レベルにおいてもエンドセリン1がパラクリンに働き局所の血流調節に重要な役割を演じているものと思われる。ごく最近、Chakravarthyら⁴⁰もエンドセリン1添加で周皮細胞のDNA量、タンパク量、細胞数が増加することを報告している。しかし、この増殖促進作用が無血清培地中での培養ではほとんど認められない³⁸ことから、周皮細胞の増殖促進には何らかの血清中の因子の関与も考えられる。周皮細胞にはインスリンやインスリン様成長因子に対するレセプターの存在が指摘されており^{40,41}、インスリンがエンドセリン1と相乗的に働いて周皮細胞の増殖を促進するのかもしれない⁴¹。なお、今回の検討では内皮細胞による周皮細胞増殖促進効果は2種の細胞の接触条件下でより顕著となる傾向がみとめられた。この理由のひとつとして、エンドセリン1の局所濃度の差が考えられる。もうひとつには、細胞間における何らかの直接的相互作用が周皮細胞の増殖促進に関与している可能性も考えられる。TGF- β が内皮細胞におけるエンドセリン1のmRNA発現レベルを高めること³¹から活性型TGF- β がこの作用に関与しているのかも知れない。

図9に、本研究で得られた知見を要約して図示した。すなわち、内皮細胞は主としてエンドセリン1の分泌を介して周皮細胞の増殖を促進し、一方、周皮細胞は内皮細胞の増殖を抑制するのみならずプロスタサイクリン産生能を保持し、過酸化脂質による細胞傷害に対しても保護的に作用すると考えられ、これらの内皮細胞-周皮細胞間相互作用は細小血管のホメオスタシス維持に重要な役割を演じているものと思われる。したがって、糖尿病性網膜症の進展に先立って見られる網膜周皮細胞の選択的消失⁴²⁻⁴⁴は血管新生のみならず細小血管レベルで血栓傾向を引き起こし、虚血性病変の発症を介して増殖性網膜症へと進展せしめるのであろう。この周皮細胞の選択的消失の機構としては、高血糖によるポリオール経路の亢進⁴⁵、ミオイノシトールの欠乏⁴⁶などが想定されているが、今回の知見から内皮細胞により分泌されるエンドセリン1の作用不全が関与している可能性も考えられる。高血糖下においては培養血管内皮細胞のエンドセリン1分泌能が刺激されうることから⁴⁷、糖尿病状態で見られるインスリンレセプターの下向き調節と同様、長期にわたる高血糖は周皮細胞においてエンドセリンA型レセプターの下向き調節をまねきその作用不全を引き起こすのかもしれない。血管内皮細胞と周皮細胞の細胞間相互作用の破綻は血

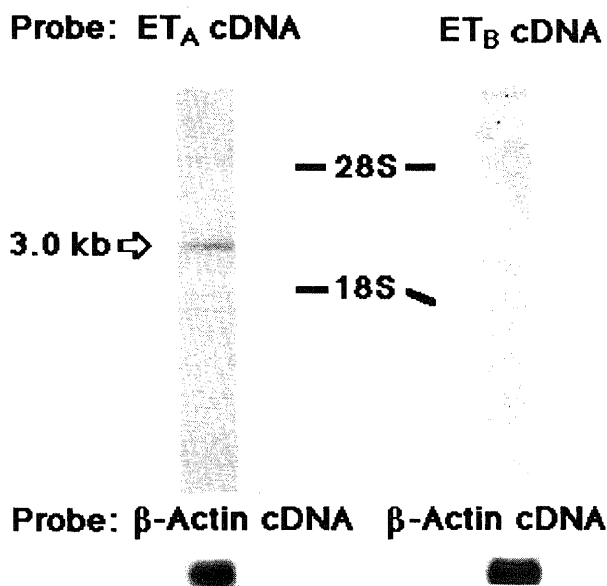


Fig. 8. Northern blot analysis of pericyte poly(A)⁺RNA. 3.5 μ g of poly(A)⁺RNA from bovine retinal pericytes were electrophoresed on 1.5% agarose gel containing 1.1 M formaldehyde, transferred onto nylon membranes and hybridized with type A and type B endothelin receptor cDNAs. The membranes were exposed to X-ray films for 5 days; with the type B receptor cDNA probe, no distinct band was detected even after a 21-day exposure. Bars indicate the position of 28S and 18S RNAs run on the same gel. ET_A, type A endothelin receptor. ET_B, type B endothelin receptor. After analysis with the endothelin receptor cDNAs, the membranes were hybridized with β -actin cDNA.

管新生, 血栓傾向, 内皮傷害を引き起こし種々の血管症の発症, 進展, 増悪に関与すると思われる (図9).

結 論

血管内皮細胞とそれを取り巻く周皮細胞との相互作用につき, 初代培養ヒト臍静脈内皮細胞とウシ網膜周皮細胞の共存培養系を用いて検討し, 以下の新知見を得た.

1. 周皮細胞は内皮細胞の増殖を抑制した.
2. 周皮細胞は内皮細胞のプロスタサイクリン産生を有意に促進した.
3. 周皮細胞のこれらの効果は内皮細胞との接触を必要とし, 線維芽細胞では代用されなかった. したがって, 周皮細胞表面に局在する細胞種特異的な因子がその効果の担い手であろう.
4. 周皮細胞は過酸化脂質による内皮細胞傷害を密度依存性に防止した.
5. 内皮細胞は周皮細胞の増殖を促進した. この増殖促進効

果は必ずしも2種の細胞間の接触を必要としなかった. したがって, 内皮細胞より分泌される液性因子がその担い手であろう.

6. エンドセリン1の周皮細胞純培養系への添加により内皮細胞共存下と同様の周皮細胞増殖促進効果が得られ, 一方, 抗エンドセリン1抗体の共存培養系への添加により内皮細胞の増殖促進効果は消失した. したがって, 内皮細胞に由来し周皮細胞の増殖を促進させる主たる因子はエンドセリン1であることが明らかとなった.

7. 周皮細胞はエンドセリン1に高親和性のA型レセプターをコードする mRNA を発現していた.

以上より, 周皮細胞は内皮細胞の増殖を制御するだけでなく内皮細胞の機能保持にも重要な役割を果たしており, 内皮細胞は主としてエンドセリン1の分泌を介して周皮細胞の増殖を制御していることが明らかになった. したがって, 内皮細胞-周皮細胞間相互作用は細小血管のホメオスタシスの維持に重要であり, この相互作用の破綻は種々の血管病変の発生や進展に

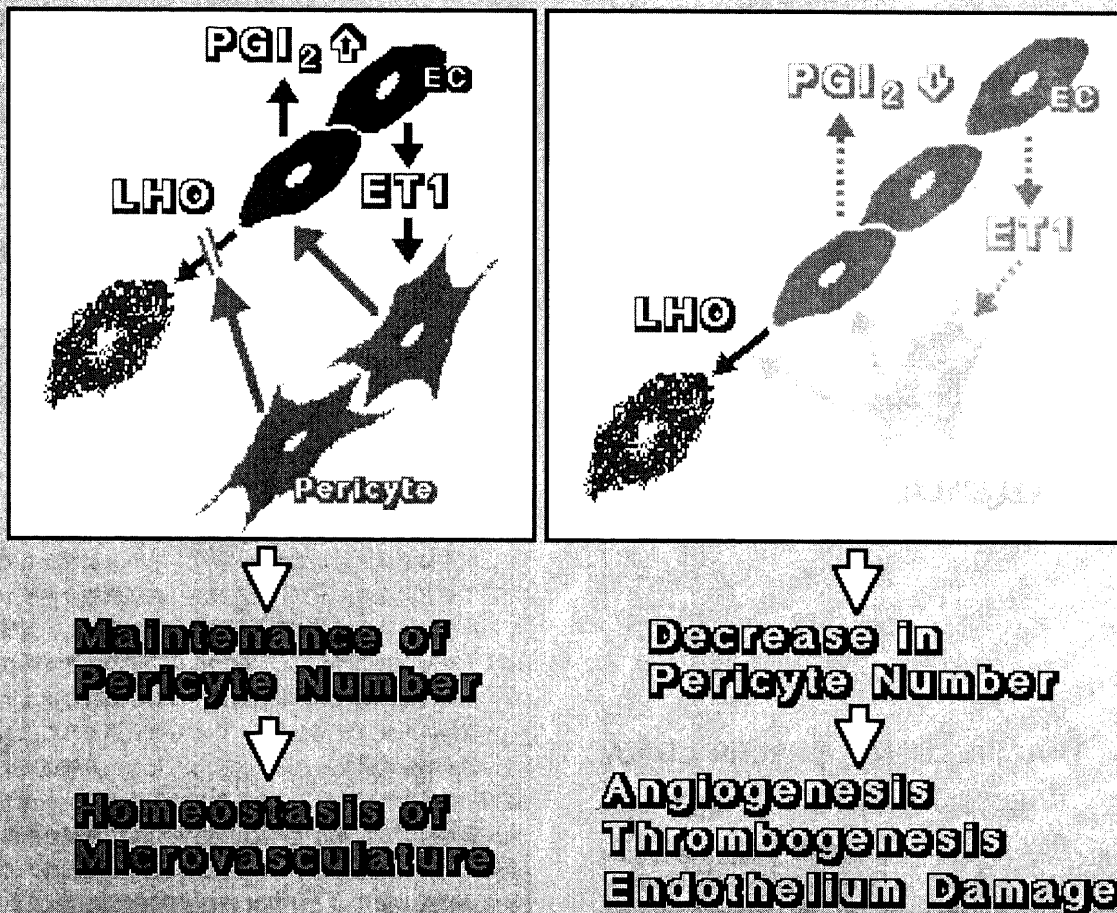


Fig. 9. Endothelial cell-pericyte interactions and possible sequelae of their failure. (left panel) Vascular pericytes can not only regulate growth, but also preserve prostacyclin-producing ability, and protect against lipid peroxide-induced injury of endothelial cells, whereas endothelial cells can stimulate pericyte growth through the secretion of endothelin 1. The functional interactions between the two cell types may play important roles in the maintenance of microvascular homeostasis. (right panel) Endothelial dysfunction should slow down or halt pericyte growth, which may in turn allow endothelium to grow unchecked without preserving its functions on one hand but rendering it susceptible to chemical insults such as lipid peroxide on the other, thereby predisposing to angiogenesis, thrombosis, and endothelium injury. This seems exemplified in diabetic retinopathy, in which pericyte loss with capillary dilation is followed by endothelial proliferation: the early change could be ascribed at least in part to the deficiency of endothelin 1 action. EC, endothelial cell; PGI₂, prostacyclin; LHO, linoleate hydroperoxide; ET1, endothelin 1.

つながるのであろう。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師小林健一教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接の御指導を賜りました金沢大学医学部生化学第二講座の山本 博教授に心から感謝致します。さらにご支援とご協力頂きました金沢大学医学部内科学第一講座並びに生化学第二講座の皆様へ感謝致します。なお本論文の要旨の一部は平成4年度日本動脈硬化学会冬季大会(金沢)において発表した。

文 献

- 1) Sims, D. E.: Recent advances in pericyte biology. Implications for health and disease. *Can. J. Cardiol.*, **10**, 431-443 (1991).
- 2) Moncada, S. & Vane, J. R.: Unstable metabolites of arachidonic acid and their role in haemostasis and thrombosis. *Br. Med. Bull.*, **34**, 129-135 (1978).
- 3) Moncada, S., Higgs, E. A. & Vane, J. R.: Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin X), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet*, **1**, 18-20 (1977).
- 4) Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. & Masaki, T.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**, 411-415 (1988).
- 5) Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. & Chaudhuri, G.: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 9265-9269 (1987).
- 6) Herman, I. M. & D'Amore, P. A.: Microvascular pericytes contain muscle and non-muscle actins. *J. Cell Biol.*, **101**, 43-52 (1985).
- 7) Joyce, N. C., Haire, M. F. & Palade, G. E.: Contractile proteins in pericytes. II. Immunocytochemical evidence for the presence of two isomyosins in graded concentrations. *J. Cell Biol.*, **100**, 1387-1395 (1985).
- 8) Yamagishi, S., Kobayashi, K. & Yamamoto, H.: Vascular pericytes not only regulate growth, but also preserve prostacyclin-producing ability and protect against lipid peroxide-induced injury of co-cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **190**, 418-425 (1993).
- 9) Yamagishi, S., Hsu, C.-C., Kobayashi, K. & Yamamoto, H.: Endothelin 1 mediates endothelial cell-dependent proliferation of vascular pericytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
- 10) 山岸昌一, 小竹 彌, 徐 成金, 小林健一, 山本 博: 内皮細胞はエンドセリン1を介して血管周皮細胞の増殖を促進する。日本動脈硬化学会雑誌, **20**, 829 (1992).
- 11) Jacobs, J. P., Jones, C. M. & Baille, J. P.: Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature*, **227**, 168-170 (1970).
- 12) Thomas, M. J. & Pryor, W. A.: Singlet oxygen oxidation of methyl linoleate: Isolation and characterization of the NaBH₄-reduced products. *Lipid*, **15**, 544-548 (1980).
- 13) Yagi, K.: A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.*, **15**, 212-216 (1976).
- 14) Hirosumi, J., Ouchi, Y., Watanabe, M., Kusunoki, J., Nakamura, T. & Orimo, H.: Effect of superoxide and lipid peroxide on cytosolic free calcium concentration in cultured pig aortic endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **152**, 301-307 (1988).
- 15) Aviv, H. & Leder, P.: Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **69**, 1408-1412 (1972).
- 16) Adachi, M., Yang, Y. Y., Furuichi, Y. & Miyamoto, C.: Cloning and characterization of cDNA encoding human A-type endothelin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **180**, 1265-1272 (1991).
- 17) Takasuka, T., Adachi, M., Miyamoto, C., Furuichi, Y. & Watanabe, T.: Characterization of endothelin receptor ET_A and ET_B expressed in COS cells. *J. Biochem.*, **112**, 396-400 (1992).
- 18) Feinberg, A. P. & Vogelstein, B.: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activities. *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13 (1983).
- 19) Ross, R.: The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *N. Engl. J. Med.*, **314**, 488-500 (1986).
- 20) Nakaki, T., Nakayama, M., Yamamoto, S. & Kato, R.: Endothelin-mediated stimulation of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **158**, 880-883 (1989).
- 21) Komuro, I., Kurihara, H., Sugiyama, T., Takaku, F. & Yazaki, Y.: Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, **238**, 249-252 (1988).
- 22) Simonson, M. S., Wann, S., Mené, P., Dubyak, G. R., Kester, M., Nakazato, Y., Sedor, J. R. & Dunn, M. J.: Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J. Clin. Invest.*, **83**, 708-712 (1989).
- 23) Hosoda, K., Nakao, K., Arai, H., Suga, S., Ogawa, Y., Mukoyama, M., Shirakame, G., Saito, Y., Nakanishi, S. Imura, H.: Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett.*, **287**, 23-26 (1991).
- 24) Orlidge, A. & D'Amore, P. A.: Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.*, **105**, 1455-1462 (1987).
- 25) Sato, Y., Tsuboi, R., Lyons, R., Moses, H. & Rifkin, D. B.: Characterization of the activation of latent TGF- β by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: A self-regulating system. *J. Cell Biol.*, **111**, 757-763 (1990).
- 26) Laiho, M., DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Livingston, D. M. & Massagué, J.: Growth inhibition by TGF- β linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell*, **62**, 175-185 (1990).
- 27) Newton, L. K., Yung, W. K. A., Pettigrew, C. &

- Steck, P. A.**: Growth regulatory activities of endothelial extracellular matrix: Mediation by transforming growth factor β . *Exp. Cell Res.*, **190**, 127-132 (1990).
- 28) **Orlidge, A. & D'Amore, P. A.**: Cell specific effects of glycosaminoglycans on the attachment and proliferation of vascular wall component. *Microvasc. Res.*, **31**, 41-53 (1986).
- 29) **Stramm, L. E., Li, W., Aguirre, G. D., & Rockey, J. H.**: Glycosaminoglycan synthesis and secretion by bovine retinal capillary pericytes in culture. *Exp. Eye Res.*, **44**, 17-28 (1987).
- 30) **Ristimäki, A., Ylikorkala, O. & Vinikka, L.**: Effect of growth factors on human vascular endothelial cell prostacyclin production. *Arteriosclerosis*, **10**, 653-657 (1990).
- 31) **Brown, M. R., Vaughan, J., Jimenez, L. L., Vale, W. & Baird, A.**: Transforming growth factor- β : Role in mediating serum-induced endothelin production by vascular endothelial cells. *Endocrinology*, **129**, 2355-2360 (1991).
- 32) **Rakugi, H., Nakamaru, M., Tabuchi, Y., Nagano, M., Mikami, H. & Ogihara, T.**: Endothelin stimulates the release of prostacyclin from rat mesenteric arteries. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**, 924-928 (1989).
- 33) **Oberley, L.**: Free radicals and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.*, **5**, 113-124 (1988).
- 34) **Armstrong, D., Abdella, N., Salman, A., Miller, N., Rahman, E. A. & Bojanczyk, M.**: Relationship of lipid peroxides to diabetic complications. Comparison with conventional laboratory test. *J. Diabetic Complications*, **6**, 116-122 (1992).
- 35) **Sasaguri, Y., Morimatsu, M., Nakashima, T., Tokunaga, O. & Yagi, K.**: Difference in the inhibitory effects of linoleic acid hydroperoxide on prostacyclin biosynthesis between cultured endothelial cells from human umbilical cord vein and cultured smooth muscle cells from aorta. *Biochem. Int.*, **11**, 517-521 (1985).
- 36) **Lee, T. S., Hu, K. Q., Chao, T. & King, G. L.**: Characterization of endothelin receptors and effects of endothelin on diacylglycerol and protein kinase C in retinal capillary pericytes. *Diabetes*, **38**, 1643-1646 (1989).
- 37) **Sakurai, T., Yanagisawa, M. & Masaki, T.**: Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, **13**, 103-108 (1992).
- 38) **Chakravarthy, U., Gardiner, T. A., Anderson, P., Archer, D. B. & Trimble, E. R.**: The effect of endothelin 1 on the retinal microvascular pericyte. *Microvasc. Res.*, **43**, 241-254 (1992).
- 39) **MacCumber, M., Ross, C., Snyder, S. & Glaser, B.**: Endothelin, a vasoconstrictive peptide, is synthesized by human retinal microvessel endothelial cells in culture. (Abstract). *Invest. Ophthalmol.*, **30**, (Suppl.) S465 (1989).
- 40) **King, G. L., Buzney, S. M., Kahn, C. R., Hetu, N., Buchwald, S., MacDonald, S. G. & Rand, L. I.**: Differential responsiveness to insulin of endothelial and support cells from micro- and macrovessels. *J. Clin. Invest.*, **71**, 974-979 (1983).
- 41) **King, G. L., Goodman, D., Buzney, S., Moses, A. & Kahn, R.**: Receptors and growth-promoting effects of insulin and insulinlike growth factors cells from bovine retinal capillaries and aorta. *J. Clin. Invest.*, **75**, 1028-1036 (1985).
- 42) **Kuwabara, T. & Cogan, D. G.**: Studies on the retinal vascular pattern. I. Normal Architecture. *Arch. Ophthalmol.*, **64**, 904-911 (1960).
- 43) **Cogan, D. G., Toussaint, D. & Kuwabara, T.**: Retinal vascular patterns. IV. Diabetic retinopathy. *Arch. Ophthalmol.*, **66**, 366-378 (1961).
- 44) **Cogan, D. G. & Kuwabara, T.**: Capillary shunts in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes*, **12**, 293-300 (1963).
- 45) **Hohman, T. C., Nishimura, C. & Robison, Jr. W. G.**: Aldose reductase and polyol in cultured pericytes of human retinal capillaries. *Exp. Eye Res.*, **48**, 55-60 (1989).
- 46) **Sussman, I., Carson, M. P., Schultz, V., Wu, X. P., McCall, A. L., Ruderman, N. B. & Tornheim, K.**: Chronic exposure to high glucose decreases myo-inositol in cultured cerebral microvascular pericytes but not in endothelium. *Diabetologia*, **31**, 771-775 (1988).
- 47) **Yamauchi, T., Ohnaya, K., Takayanagi, R., Umeda, F. & Nawate, H.**: Enhanced secretion of endothelin-1 by elevated glucose levels from cultured bovine aortic endothelial cells. *FEBS Lett.*, **267**, 16-18 (1990).

Studies on Interactions between Endothelial Cells and Vascular Pericytes, Using in vitro Co-culture Systems—Elucidation of Roles of Pericytes in Growth, Function and Lipid Peroxide-induced Damage of Endothelial Cells, and of the Nature of Endothelium-derived Pericyte Growth Factor— Sho-ichi Yamagishi, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—*J. J. J. Med Soc.*, **102**, 81—91 (1993)

Key words endothelial cell, pericyte, prostacyclin, lipid peroxide, endothelin

Abstract

Interactions were studied between endothelial cells, extending all around the lumen of the vessels, and pericytes, wrapping around and along the endothelial cells, using co-culture systems with primary cultured human umbilical endothelial cells and bovine retinal pericytes. The present study first showed that pericytes can not only inhibit growth of but also stimulate prostacyclin production by endothelial cells, both which were achieved by physical contact between the two cell types. Substitution of a fibroblast feeder layer for the pericytes gave no change. This indicates that interactions between the two cell types are instructive, being mediated by cell type-specific surface molecules. Moreover, pericytes could confer protection against lipid peroxide-induced injury of endothelial cells. On the other hand, endothelial cells were found to stimulate proliferation of pericytes, regardless of the presence or absence of physical contact, indicating that this stimulation is mediated by certain secreted factors. Evidence that endothelin 1 is the main mediator accounting for the stimulation was obtained: the feeder layer of endothelial cells was able to be substituted by endothelin 1 added to the medium, and an antiserum against endothelin 1 could inhibit the ability of endothelial cells to promote pericyte growth. Furthermore, Northern blot analysis revealed that bovine retinal pericytes express mRNA for the type A endothelin receptor, a high affinity receptor for endothelin 1. The present study demonstrated for the first time that pericytes can not only regulate growth, but also preserve the prostacyclin-producing ability and event lipid peroxide-induced injury of endothelial cells, and that endothelial cells can stimulate pericyte growth through the secretion of endothelin 1. This indicates that the functional interactions between the two cell types may play important roles for the maintenance of microvascular homeostasis, and that failure in these interactions may cause a predisposition to angiogenesis, thrombogenesis, and endothelium injury. The present study may provide a novel view for clarifying the etiology, pathogenesis, prevention and treatment of various vascular diseases such as diabetic microangiopathies.