OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	血管内皮細胞層の物質透過機能に関する研究
Author(s)	宇都口, 直樹
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3100623
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【1】

氏名	宇都口直樹（うとぐちなおき）
博士の専攻分野の名称	博士（薬学）
学位記番号	第 11839 号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用薬学専攻
学位論文名	**血管内皮細胞層の物質透過機能に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教授 真弓 忠範 （副査） 教授 馬場 明道　教授 前田 正知　教授 三村 務

論文内容の要旨

抗体は特異性の高さより，ターゲティング療法の薬物キャリアーとして期待されてきたが，抗体結合抗癌剤による癌治療は，未だ十分な成果が得られていない。この原因は，腫瘍組織への移行性の低さにある。血中に投与された抗体結合抗癌剤は，血管の内腔を一層で覆う血管内皮細胞層によって透過が著しく制限されるため，腫瘍組織への到達量はごく僅かであることが明らかとなっている。ところで，内皮細胞層の透過性は，各組織において大きく異なっており，この組織特異的機能は，周囲の組織細胞からの影響を受けることにより発現されていると考えられている。したがって，腫瘍組織に着目した場合，腫瘍組織特異的な内皮細胞研究を行わなければならないと考えられる。この組織特異性を培養細胞系により検討を行うには，腫瘍組織から単離・培養した内皮細胞を用いる方法，または正常組織の内皮細胞を腫瘍細胞の培養上清（馴らし培地 Conditioned medium; CM）で培養する方法が考えられる。CM は腫瘍細胞から分泌された因子が含まれていることから，CM で培養することにより，*in vivo* の状態を再構築でき得ることが期待される。そこで，両手法によるアプローチにより，腫瘍組織における内皮細胞層の物質透過機構の検討を行った。

腫瘍組織血管の性質として，一般組織に比べ高い物質透過性を示すことが挙げられる。そこで，腫瘍細胞の CM を用いた系において，腫瘍組織内皮細胞特異的な機能発現が誘導されるか透過性を指標に検討を行った。ウシ大動脈内皮細胞（BAEC）を透過チャンバー上に播種し，CM により培養を行い，コンフルエント時に透過実験を行った。透過性は，FITC-デキストラン（分子量7万）により評価した。B16腫瘍細胞の CM（B16CM）で培養を行った BAEC 層の透過は，約6倍にも上昇した。BAEC はコンフルエント状態であり，細胞数においても有意差が認められなかったことから，細胞増殖阻害や傷害性に起因するものではないことが示唆された。また，B16CM を30分間作用させても，透過に何ら影響を与えなかったことから，この透過上昇は血管作動性薬物などの短時間におこる一過性のものではなく，長時間にわたる持続的なものあると考えられる。また，内皮細胞層の透過上昇に際し，その細胞骨格構成蛋白 F-アクチン量の減少が起こることから，その関係を検討したところ，B16CM は F-アクチン量に何ら影響を与えなかった。

このような常定状態における透過上昇に関する機構は未だ報告がなく，さらに，この透過調節機構の解明を行った。さて，細胞外マトリックスは種々の細胞機能に影響を与えていることから，内皮細胞層透過調節に関与している可能性が考えられる。そこで細胞外マトリックスの主要な構成成分であるコラーゲンに着目し，透過調節との関係につい

て検討を行った。コラーゲンは，アスコルビン酸をその合成のコファクターとしていることから，アスコルビン酸の内皮細胞層透過性におよぼす影響を検討した。透過性はアスコルビン酸により顕著に低下することが判明した。また，アスコルビン酸はコラーゲン合成を促進することから，コラーゲン合成と透過性との関係を検討した。BAECのコラーゲン合成は，アスコルビン酸によって約6倍に上昇し，またコラーゲン合成阻害剤は，コラーゲン量を特異的に減少させ，透過性を約3倍に上昇させた。すなわち内皮細胞層のコラーゲン量が増加すると透過性は抑制され，逆にコラーゲン量が減少すると透過性は促進されることが明らかとなった。

次にB16CMによる透過上昇にコラーゲンが関与しているかどうかの検討を行ったところ。B16CMはコラーゲン量を低下させることが判明した。また，この減少は，直接のB16CMによるコラーゲン分解作用ではなく，内皮細胞に作用し，内皮細胞のコラーゲン分解能を促進していることが示された。

次に，腫瘍組織由来初代培養内皮細胞を用いて検討することとしたが，未だ単離・培養の報告はなく，まず単離・培養法の確立を試みた。ラット線維芽肉腫を細片後，コラゲナーゼ処理を行い，細胞を分散させ，Percoll密度勾配上に重層させ，細胞を遠心分離した。これを上層部から各フラクションに分取した。内皮細胞のマーカー酵素であるアンジオテンシン変換酵素（ACE）活性を指標に検討したところ，フラクション4-7に内皮細胞が多く存在することが示された。これら細胞の培養を行ったが，他種細胞の混入が多いものであった。そこで純度向上を目的にdishへの接着速度の違いを利用した。内皮細胞は他の細胞に比べ，dishへの接着が速いことより，播種24時間後，非接着細胞を洗浄除去し，接着細胞のみさらに培養を続けた。得られた細胞は形態的に均一な集団であり，内皮細胞の特徴であるモノレイヤーを形成していた。また内皮細胞は，マトリゲル上で毛細血管様の管腔形成を行うことから，本性質を検討したところ，単離細胞は100%が管腔形成を行った。さらに，これら細胞は内皮細胞マーカである第Ⅷ因子に対して100%が陽性であり，高純度に内皮細胞を単離・培養に成功したことが示された。

さて，初代培養細胞を用いるにあたり，それらが*in vivo*で有していた性質を培養系においても維持しているかが重要である。そこで，本細胞が*in vivo*で有していた特性を発現・維持しているかどうか検討を行った。腫瘍組織の内皮細胞層は，正常組織のそれに比べ透過性が高いことが判明した。さらに腫瘍血管の特性として，その内皮細胞への白血球接着数が低いことも挙げることができるが，本性質も維持されていることも確認した。また，腫瘍組織内皮細胞と正常組織内皮細胞層の透過性の差異がコラーゲン量に起因していることを明らかにした。

以上，腫瘍組織特異的な内皮細胞物質透過機能を，腫瘍細胞CMおよび初代培養腫瘍組織由来内皮細胞を用いて検討し，コラーゲンによる透過調節機能を明らかにした。

論文審査の結果の要旨

種々の薬物の中でも，抗癌剤は数多くの副作用とその重篤さから，最もターゲティング療法を必要としている。そのためには，腫瘍組織部位の血管内皮細胞層の透過性を選択的に上昇させる必要がある。しかしながら，その調節機構の解明は全くなされていない。そこで著者は次の2通りの方法で検討を行った。1）正常組織由来の内皮細胞を腫瘍細胞の培養上清（馴らし培地：CM）で培養する方法：CMは腫瘍細胞から分泌された種々の因子が含まれていることから，in vivoと同様に内皮細胞は諸因子の作用を受けin vitroでそれらを再現させることにより物質透過機構を明らかにしようとするもの。2）腫瘍組織から単離・培養した血管内皮細胞を用いる方法：現在のところ，いまだ腫瘍組織中の血管内皮細胞は培養されていないので，その単離・培養方法から確立し，これを用いて物質透過機構を検討する。

その結果，以下の結論が得られた。1）腫瘍細胞のCMにより，正常組織由来血管内皮細胞の物質透過性は，in vivoを再現して上昇することを初めて明らかにした。2）血管内皮細胞層の物質透過性調節にコーラゲンが重要な役割を果たしていることを明らかにした。すなわち，血管内皮細胞コラーゲン量が増加すると透過性は減少し，逆にコラーゲン量が減少すると透過性は上昇する。3）本透過性の上昇は，CMが血管内皮細胞に作用し，細胞のコラーゲン分解能を上昇させることに起因することを明らかにした。4）腫瘍組織由来血管内皮細胞の初代培養に成功した。5）腫瘍組織由来血管内皮細胞は，in vivoの腫瘍血管と同様の特性を発現・維持していた。6）腫瘍組織由来血管

内皮細胞においても，低いコラーゲン合成能が高い物質透過機能の構築に寄与していることを明らかにした。

以上の成果は，腫瘍組織特異的な血管内皮細胞物質透過機構を，腫瘍細胞 CM および初代培養腫瘍組織由来血管内皮細胞を用いて検討し，コラーゲンによる物質透過調節機能を明らかにしており，今後の抗癌剤の腫瘍組織ターゲティングに重要な示唆を与えるものであり，博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考える。