

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	

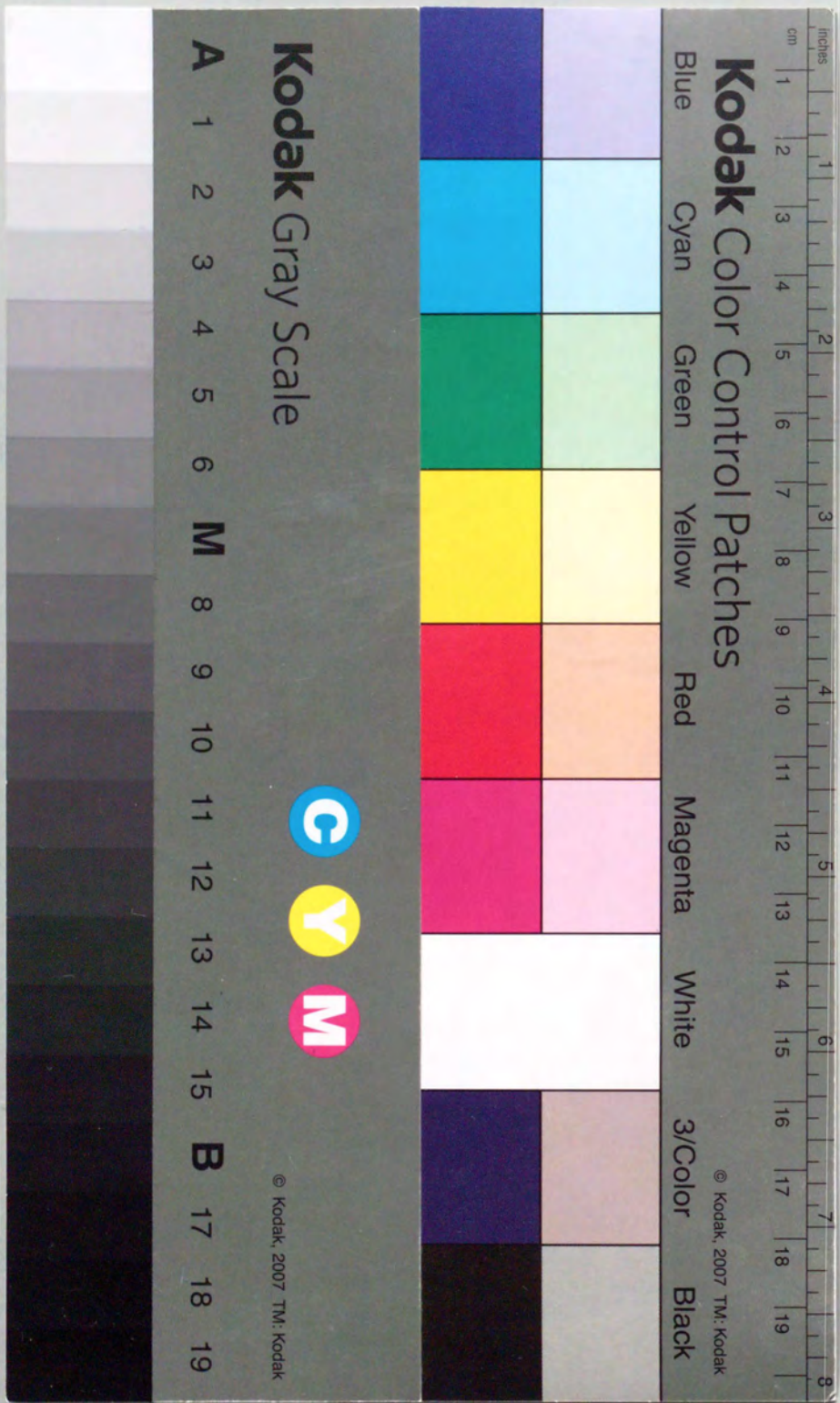
Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

血管内皮細胞層の物質透過機能に
関する研究

宇都口 直樹



①

血管内皮細胞層の物質透過機能に
関する研究

宇都口 直樹

目次

緒論	1
本論	3
第一章 血管内皮細胞層の物質透過性におよぼす腫瘍細胞 Conditioned Medium (CM) の影響	3
第一節 透過性におよぼすCMの影響	3
第二節 透過上昇作用の特異性に関する検討	7
第三節 透過上昇とF-アクチン	7
第四節 継代の影響	10
第五節 小括	11
第二章 血管内皮細胞層の透過性とコラーゲンの関係	12
第一節 透過性におよぼすアスコルビン酸の影響	12
第二節 作用の特異性に関する検討	13
第三節 還元剤による検討	14
第四節 コラーゲン合成阻害剤の影響	15
第五節 コラーゲン合成と透過性の関係	16
第六節 細胞外マトリックスの影響	18
第七節 作用時間の検討	19
第八節 小括	20
第三章 腫瘍細胞CMによる透過性上昇とコラーゲンの関係	21
第一節 腫瘍細胞CMの内皮細胞コラーゲン合成におよぼす影響	21
第二節 CMのコラーゲン分解作用の検討	22
第三節 CMの細胞外マトリックス分解作用の検討	23
第四節 マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤の影響	24
第五節 小括	25

第四章 腫瘍組織由来血管内皮細胞の単離・培養および	
その特性についての検討	27
第一節 腫瘍組織由来血管内皮細胞の単離・培養法の確立	27
第二節 腫瘍組織内皮細胞層の透過性	33
第三節 腫瘍組織内皮細胞の白血球接着性	34
第四節 継代の影響	35
第五節 腫瘍組織内皮細胞のコラーゲン合成と透過性	36
第六節 小括	36
総括	38
結論	40
謝辞	41
参考文献	42

緒論

種々の薬物のなかでも抗癌剤は、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ものの一つである。このターゲティング療法の薬物キャリアーとして、抗体はその特異性の高さより従来から期待されてきた。しかしながら、抗体をキャリアーとした抗体結合抗癌剤による癌治療は、現在のところ未だ十分な成果が得られていない。この主要な原因は、抗体結合抗癌剤の腫瘍組織への移行性の低さにある。抗体の分子量はIgGクラスで約15万であり、血中に投与されたこの高分子は、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、投与量のわずか0.001-0.01%程度であることが近年の研究で明らかとなっている^{1), 2)}。

そこで私は、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、これら抗体結合抗癌剤の腫瘍組織への移行性を上昇させることにより、ターゲティング療法を有効なものにしようと考えた。

しかしながら、腫瘍部位の血管内皮細胞層透過性の調節機構は未だ全く解明されておらず、したがって腫瘍部位の血管透過性を特異的に上昇させる方法は見いだされていない。そこで、まず腫瘍部位の内皮細胞層の物質透過調節機構の解明を行い、そこから得られた知見をもとに、腫瘍組織血管の透過性を選択的に上昇させる手法の考案を行うことを目標とした。

ところで、この血管内皮細胞層の物質透過性は、各組織において大きく異なっていることが知られている。例えば、脳において内皮細胞はBlood-Brain Barrierを形成し、透過性が著しく制限されている一方で³⁾、肝臓や腫瘍組織においてはアルブミンのような高分子物質でも血管壁を比較的容易に透過することができる^{4), 5)}。このように、内皮細胞層透過性には各組織の特異性が存在することから、腫瘍血管の透過性を選択的に上昇させるためには、腫瘍組織の特異的な内皮細胞層物質透過機構を検討・解明しなければならない。

この内皮細胞層物質透過機能の詳細なメカニズムの検討を、最も生体機能を反映していると考えられている培養細胞を用いて検討することとした。さて、内皮細胞は、周囲の組織細胞からの影響を受け、各組織において各々特異的な物質透過機能を発現していると考えられる。そこで腫瘍組織に注目した場合、*in vitro* 培養細胞を用いた系で腫瘍組織特異的な内皮細胞層物質透過性の検討を行うには、二通りの手法を考えることができる。一つは、腫瘍組織から単離・培養した血管内皮細胞を用いる方法、他の一つは、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 Conditioned medium; CM）で培養する方法である。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、CMで培養することにより、*in vivo* と同様に内皮細胞

胞は腫瘍細胞からの諸因子の作用を受け、*in vivo*の状態を*in vitro*で再構築でき得ることが期待される。

そこで本論文では、両手法によるアプローチにより、腫瘍組織における血管内皮細胞層の物質透過機構の検討を行った。

本論

第一章 血管内皮細胞層の物質透過性におよぼす腫瘍細胞CMの影響

第一節 透過性におよぼすCMの影響

腫瘍組織部位の血管に共通な特性として、一般組織の血管に比べ高い物質透過性を示すことが数多く報告されている⁶⁾⁻¹⁰⁾。そこで、まず腫瘍細胞CMを用いた系において、正常組織由来内皮細胞が、腫瘍組織内皮細胞特異的な機能発現を誘導されるかどうか透過性を指標に検討を行った。

実験方法

(1) 細胞培養

ウシ大動脈由来血管内皮細胞 (Bovine aortic endothelial cells: BAEC) は剥離法により採取し、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) に10%牛胎児血清 (FCS; Filtron社) を添加したのものにより継代培養を行い、実験には7-10継代目のものを用いた。細胞は位相差顕微鏡観察において、形態的に均一であり、内皮細胞の特徴である敷石状を呈しており、また蛍光ラベル化低密度リポ蛋白質の取り込み¹¹⁾により高純度の内皮細胞であることを確認した。腫瘍細胞としてマウス黒色腫B16細胞、ラット肝癌H35細胞、ヒト上皮癌A431細胞を用いた。B16細胞はRPMI1640培地 (10%FCS含有)、H35およびA431細胞はDMEM (10%FCS含有) により継代培養したものを用いた。ウシ平滑筋細胞は大動脈から剥離法により採取し、DMEM (10%FCS含有) により継代培養を行ったものを使用した。

(2) CMの採取

各種組織細胞を培養dishへ1/8コンフルエント密度で播種し、1/4コンフルエント到達時に、ASF104培地 (味の素社) に交換した。24時間後、培地を採取し、遠心後、上清を-20°Cで凍結保存した。使用時に等量のDMEM (20%FCS含有) を混和させ、実験に供した。

(3) 透過チャンバー

血管内皮細胞層の物質透過性は、Fig. 1に示すチャンバーを用い検討を行った。円筒の下部にpore size 0.45 μ mのテフロン膜をはったインターセル (クラボウ社) を24-wellにセットし、コラーゲンコーティング (*) を施した本膜上に血管内皮細胞を播種し (1×10^5 個)、培養を行った。24時間後、培地をCMに交換し、さらに培養を行い、コンフルエント到達時 (播種5日後) に透過実験を行った。

(*) コラーゲンI型 (新田ゼラチン社; 3.0 mg/ml) をダルベッコリン酸緩衝液

(PBS) により30倍希釈したものをインターセルのテフロン膜上に100 μ l添加し、2時

間後、吸引、PBSにより洗浄を行い、室温にて乾燥させたものを使用した。

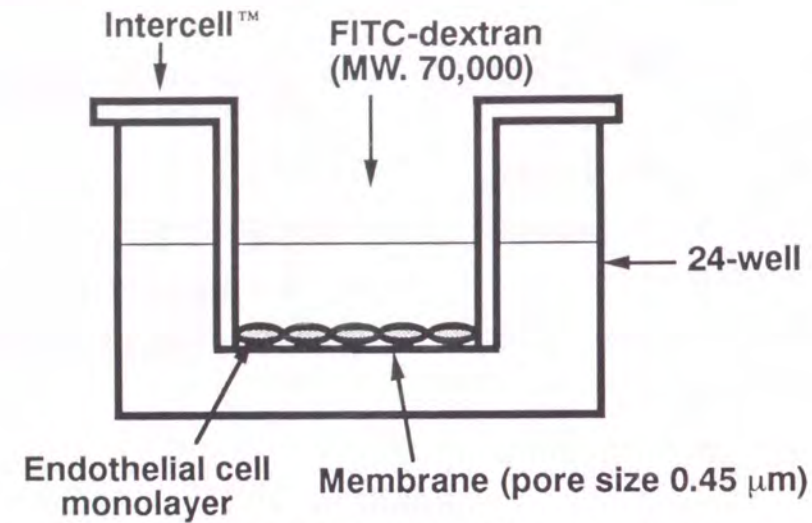


Fig. 1 Experimental apparatus used to measure endothelial cell monolayer permeability to FITC-dextran

(4) 透過実験

FITC-デキストランは血管内皮細胞の細胞間隙を透過することが知られていることから¹²⁾、本化合物（分子量70,000）を透過性の指標として用いた。フェノールレッドフリーの培地で溶解したFITC-デキストラン（50 μM）をインターセルの内室に添加し、外室にはFITC-デキストランフリーの培地を添加した。CO₂インキュベータ内で穏やかに1時間振盪し、外室に透過したFD量を蛍光光度計により測定した（励起波長495 nm、蛍光波長550 nm）。また、内皮細胞が培養されていないテフロン膜のみの透過実験を同様に10分間行い、内皮細胞層のみの透過係数（PEC）を、以下の式によって求めた¹³⁾。本節における透過係数は全て、PECで示した。

$$1/PEC = 1/P_{total} - 1/P_{mem}$$

P_{total} ：内皮細胞層およびテフロン膜層の透過係数、 P_{mem} ：テフロン膜層のみの透過係数を示す。

(5) 細胞数測定

透過実験終了後、トリプシンにより細胞を剥離し、PLカウンター（日本医科機器）により電氣的に細胞数を測定した。

実験結果および考察

コントロール培地で培養した内皮細胞層の透過性および細胞数を経日的に測定した結果をFig. 2に示す。細胞は対数増殖後、4日目でコンフルエントとなり、以後、細胞数は一定であった。一方、透過性は4日目ではなく、5日目より一定となり、最低値を

示した。4日目に細胞はコンフルエントに到達するものの、タイトジャンクション構築が不十分であり、5日目にタイトジャンクション構築が完成し、強固な細胞間隙を形成したものと推察される。また、データには示していないが、B16CM培養群もコントロールと同様に、4日目にコンフルエントに到達し、5日目より透過性が一定となり

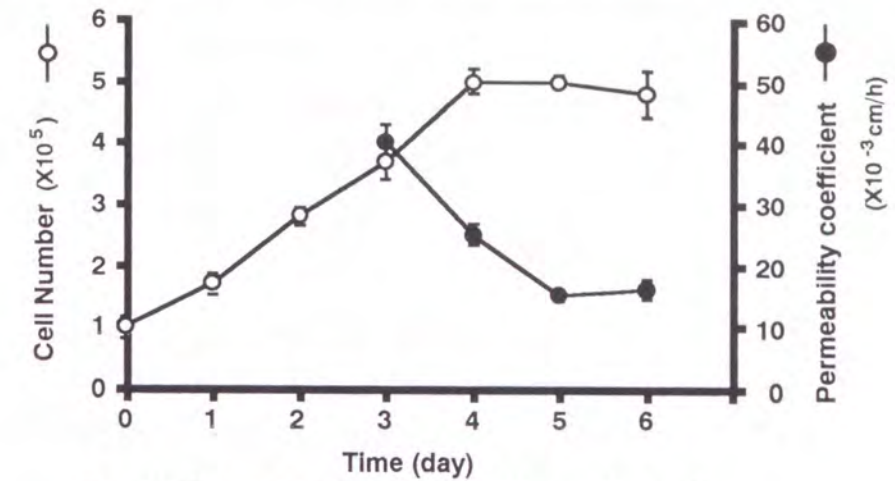


Fig. 2 Permeability and cell number of BAEC monolayer

最低値を示した。細胞がコンフルエント状態で、最も透過が抑制されている状態が、生体における定常状態の血管透過性を反映していると考えられることから、以後の実験は全て経時的に測定を行い、コンフルエントかつ透過が最も抑制されたときのデータにより透過性を評価した。

B16腫瘍細胞のCM (B16CM) で培養を行ったBAEC層の透過性は、コントロールの約5倍と顕著に上昇した (Fig. 3)。

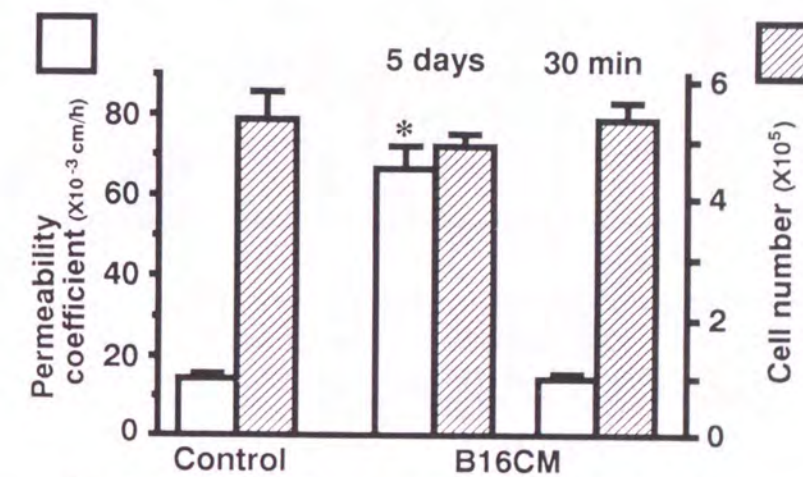


Fig. 3 Effect of B16CM on BAEC permeability

BAEC were cultured in permeation chambers with B16CM. When the cells were at confluence, the permeability assay was performed and the cell number was counted. * $P < 0.001$ compared to control

位相差顕微鏡観察において、BAECはコントロール群、B16CM群ともにコンフルエント状態であり、また両群の形態的な相違も認められなかった。細胞数においてもコントロールとB16CM培養群との間に有意な差は認められなかった。本結果は、B16CMによるBAEC層の透過上昇が、内皮細胞の増殖阻害によってコンフルエントに到達しなかったことや、細胞傷害性に起因するものではなく、腫瘍細胞からの液性因子によって内皮細胞の機能変化が生じた結果であることを示唆している。一方、正常培地でBAECをコンフルエントまで培養を行った後、B16CMを30分間作用させた場合、透過に何ら影響を与えなかった。血管作動性薬物であるヒスタミンやブラジキニンは短時間における一過性の透過上昇作用を示すが^{14), 15)}、腫瘍細胞CMによる透過上昇は、長時間にわたる持続的な透過性上昇であると考えられる。

また、この透過上昇作用はB16CMのみならず肝癌H35、上皮癌A431細胞といった異なる種や由来の腫瘍細胞CMにおいても観察されたが、正常細胞である平滑筋細胞(SMC)のCMは透過に何ら影響を与えなかったことから、透過性上昇因子が腫瘍細胞から共通かつ特異的に産生されている可能性が示唆された(Fig. 4)。また、BAEC自身のCMにおいて透過上昇作用が認められなかったことから、腫瘍細胞CMによる透過上昇は、腫瘍細胞による培地中の栄養成分の枯渇に起因したものではなく、腫瘍細胞が新たに産生した因子によるものと示唆された。

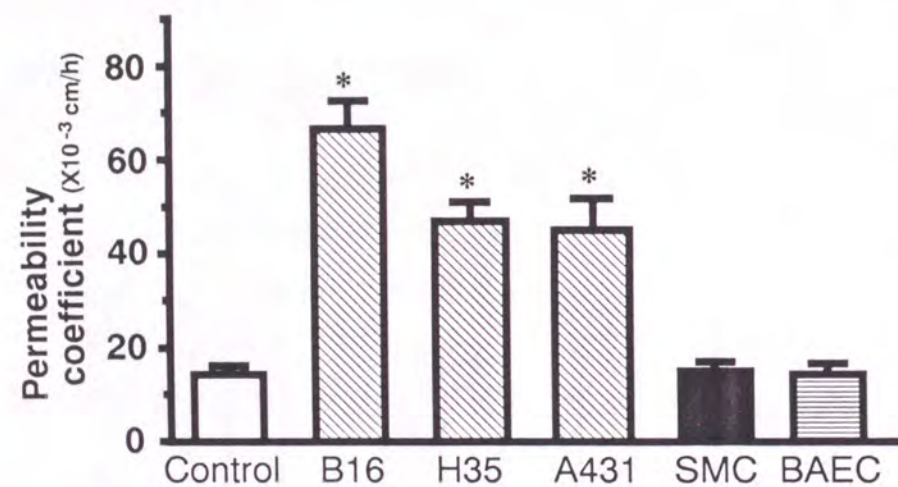


Fig. 4 Effect of conditioned medium on BAEC permeability
BAEC were cultured in permeation chambers with conditioned media. When the cells were at confluence, the permeability assay was performed. * P<0.001 compared to control

第二節 透過上昇作用の特異性に関する検討

前節の結果は、ウシの大動脈由来の内皮細胞を用いたものであり、この透過上昇作用が、他の部位や種の内皮細胞においても観察されるか、先の実験により最も強い上昇作用が認められたB16CMを用い検討を行った。

実験方法

ウシ大静脈由来内皮細胞は下大静脈より剥離法により採取、培養したものを用いた。ヒト臍帯静脈由来内皮細胞はクラボウ社から供与されたものを用いた。他は前節の方法により行った。

実験結果および考察

B16CMはウシ大動脈由来内皮細胞層のみならず、部位や種の異なるウシ大静脈、ヒト臍帯静脈由来の内皮細胞層の透過性をも同様に上昇させた(Table 1)。しかしながら、内皮細胞と同様に物質透過の障壁となっているtight junctionを形成する上皮細胞株MDCK細胞層の透過性にはB16CMは何ら影響を与えなかった。本結果はB16CMの透過上昇作用が、内皮細胞に対して特異的である可能性を示唆している。

Table 1 Effect of B16CM on the permeability of endothelial or epithelial cells monolayers

Cell	Permeability coefficient (x10 ⁻³ cm/h)		
	Control	B16CM	% of increase
BAEC	15.2 ± 1.0	65.2 ± 5.6*	329
BVEC	32.6 ± 3.4	84.9 ± 5.5*	160
HUVEC	25.4 ± 7.1	52.2 ± 6.6*	105
MDCK	3.71 ± 0.24	3.75 ± 0.19	0

BAEC: bovine aortic endothelial cells
BVEC: bovine venous endothelial cells
HUVEC: human umbilical vein endothelial cells
MDCK: Madrin-Darby canine kidney cells
* P<0.001

第三節 透過上昇とF-アクチン

血管内皮細胞層の透過上昇に際し、その細胞骨格構成蛋白の一つであるF-アクチンの減少が起こることが数多く報告されており¹⁶⁾⁻¹⁸⁾、現在のところ、透過上昇のメカニズムとしては本知見しか明らかとなっていない。そこで、B16CMによる透過上昇にF-アクチンが関与しているか否かを調べた。

実験方法

(1) 細胞培養

B16CMはBAEC播種後、24時間後より添加し、コンフルエント時まで作用させた。F-アクチン脱重合剤 サイトカラシンB (5 $\mu\text{g/ml}$) は、正常培地によりコンフルエントまで培養させたBAECに30分間作用させた。

(2) F-アクチン染色および定量

F-アクチン染色はPhillipsとTsanの方法に準じ¹⁹⁾、F-アクチンに特異的に結合するファロイジンをローダミンにより蛍光ラベルしたものにより行った。F-アクチン定量はRotrosenとGallinの方法を改変したものにより行った¹⁷⁾。すなわちホルマリン固定、0.1%Triton X-100処理後、ローダミンファロイジン(33 nM)とファロイジン(3.0 μM)の混合液を添加した。20分後、PBSにより洗浄し、ローダミンファロイジンをメタノールにより抽出し(37°C, 1時間)、蛍光光度を測定した(励起波長 540 nm, 蛍光波長 570 nm)。蛋白量はProtein assay kit (バイオラッド社)により測定した。

実験結果および考察

ローダミンファロイジンによるF-アクチン染色の蛍光顕微鏡写真をFig. 5に示す。B16CM培養時のF-アクチンの分布は、コントロール群と有意な差は認められなかった。サイトカラシンBはF-アクチンを減少させており、このときの透過性は、B16CM群と同様にコントロールと比較して約3倍に上昇していた。Fig. 6にF-アクチン定量の結果を示す。サイトカラシンBによりF-アクチン量はコントロールと比較して、細胞蛋白量あたり、細胞数あたりともに有意な減少が観察された。一方B16CMは、透過性をサイトカラシンB群と同程度までに上昇させているにもかかわらず、F-アクチン量に何ら変化を与えなかった。これらのことから、B16CMによる透過上昇は、従来より報告されたきたF-アクチン量の減少に起因するものではなく、全く新しい作用機序により生じているものと考えられた。

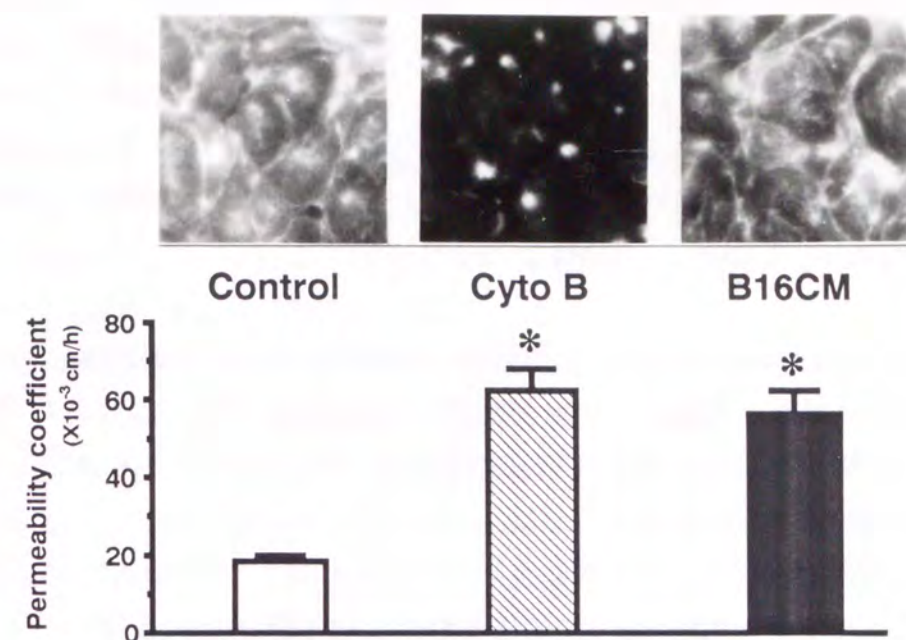


Fig. 5 Effect of B16CM and cytochalasin B on F-actin and the permeability

Cyto B: The confluent BAEC which were cultured with control medium were treated with cytochalasin B (5 $\mu\text{g/ml}$ for 30 min). The BAEC were stained by rhodamine-phalloidin. * $P < 0.001$

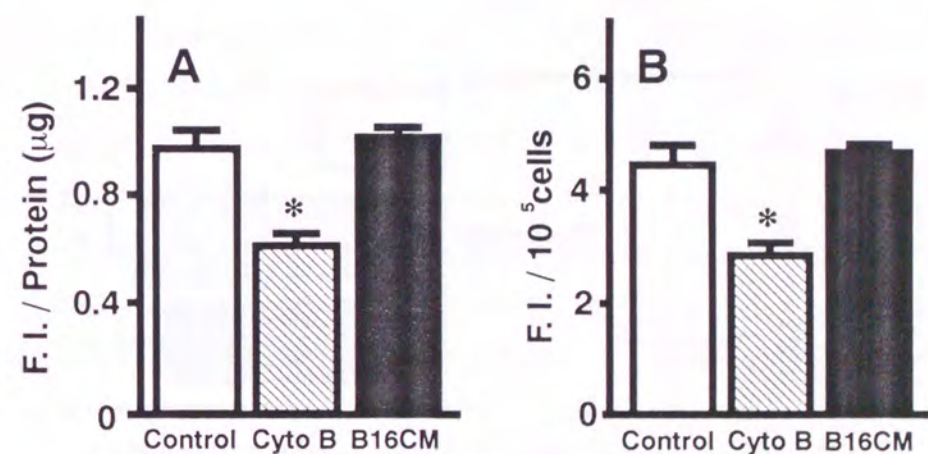


Fig. 6 Effect of B16CM on the F-actin content with BAEC

BAEC were cultured with B16CM. After 5 days of cultivation, the F-actin content was quantified by rhodamine-phalloidin. Data are represented per μg of cell protein (A) and 10^5 cells (B). F.I.: Fluorescence intensity, Cyto B: The confluent BAEC which were cultured with control medium were treated with cytochalasin B (5 $\mu\text{g/ml}$, for 30 min). * $P < 0.001$ compared to control

第四節 継代の影響

前節の結果より、B16CMは短時間では透過上昇作用を示さず、またF-アクチン量の減少も認められなかったことから、この透過上昇は血管作動性薬物などによる短時間の一過性の透過上昇ではなく、長期間にわたる内皮細胞の機能変化が生じた持続的な透過上昇であると考えられた。そこでこの上昇状態が、CM作用後の細胞をCMフリーの状態に継代培養したときにおいても維持されているかどうか検討を行った。

実験方法

BAECをdish上に播種し、正常培地またはB16CMにより5日間培養を行った。コンフルエント時に細胞を剥離し、インターセル上に1/5コンフルエント密度で播種し、正常培地またはB16CMによりさらに培養を行った。5日後のコンフルエント時に透過実験を行った。

実験結果および考察

BAEC層の透過性は、B16CM非存在下においても、コントロールと比較して有意に高いことが判明した (Fig. 7)。本結果から、正常血管内皮細胞の腫瘍細胞CMによって発現された腫瘍組織特異的な機能は、少なくとも1継代後においても発現・維持されていることが示された。さらに、本結果はB16CMによる透過上昇が血管作動性薬物のような一過性のものではなく、長時間にわたる持続的なものであることも合わせて示している。

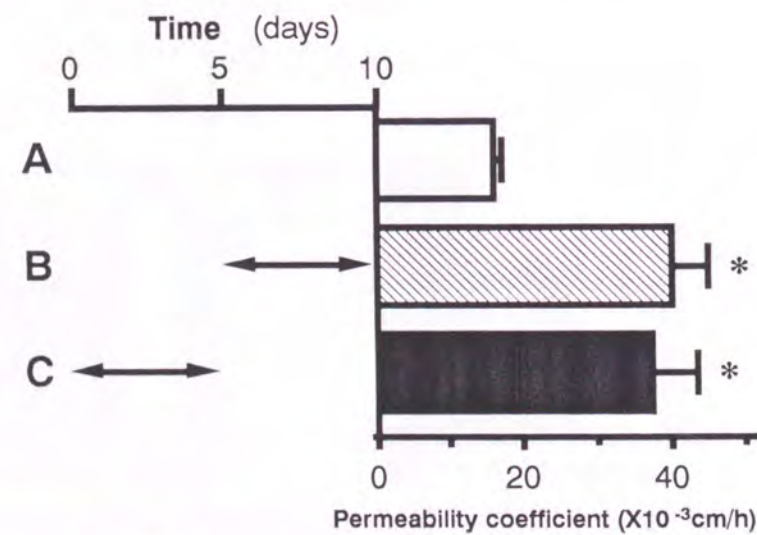


Fig. 7 Effect of pretreatment of B16CM on the permeability of BAEC

BAEC were cultured on the tissue culture dishes with control medium (A and B) or B16CM (C). After 5 days of cultivation, the cells were detached from the dishes and were cultured in permeation chambers with the control (A and C) or conditioned medium (B). After more than 5 days, the cells reached confluence, and then, the permeability assay was performed.

* P<0.001 compared to control

第五節 小括

血管内皮細胞層の物質透過性は、大きく二つに分類することができる。一つは、ヒスタミンやエピネフィリンのような血管作動性薬物による短時間に起こる一過性の透過性変化、もう一つは、脳の血管の物質透過性が低く、肝臓や腫瘍組織の血管においては透過性が高いといったような各組織間での透過性の違いである。前者に関する研究は数多くなされ、F-アクチン量の減少がそのメカニズムとして知られているが¹⁶⁾⁻¹⁸⁾、後者については皆無であり、それら各臓器間での透過性の違いがどのような機構により形成されているかの知見は全く無い。

本節において、腫瘍細胞が産生する液性因子が、正常組織内皮細胞層を*in vivo*の腫瘍組織の血管と同様に高い物質透過性を示す構造に変化させることを明らかとした。すなわち、腫瘍組織における高い血管透過性構造は、腫瘍細胞が産生する液性因子により形成されることを初めて明らかとした。本結果は、各臓器における血管透過性の差異が組織細胞からの因子により形成されている可能性を示した初めての事例である。

著者らはすでに、脳血管内皮細胞に特異的に発現されているアルカリフォスファターゼが、大動脈由来内皮細胞を脳組織構成細胞の一つであるグリア細胞のCMで培養することにより、顕著な誘導を引き起こすことを²⁰⁾、さらに脳血管内皮細胞に特異的に発現されているγ-グルタミルトランスぺプチダーゼが、大動脈内皮細胞をグリア細胞の細胞外マトリックス上で培養することにより誘導されること²¹⁾を報告している。これらのことから、透過性を含め各組織特異的な内皮細胞機能は、周囲の組織細胞からの影響により形成されていることが示された。

腫瘍細胞が産生し、*in vivo*において一過性の透過上昇を誘導する因子として Vascular Permeability Factor (VPF)が知られている²²⁾。VPFは*in vivo*においては5-10分間と短時間における一過性の透過上昇作用を示し、また、*in vitro*においては内皮細胞増殖促進²³⁾、細胞内カルシウム濃度上昇作用²⁴⁾を有している。B16CMにおいては、短時間では透過上昇作用が認められなかった。またデータには示していないが、内皮細胞増殖促進作用および細胞内カルシウム濃度上昇作用 (カルシウム感受性蛍光色素 Fura-2による測定法)は何れも認められなかった。以上ことから、B16CMによる透過上昇作用は、VPFとは異なる別の因子による全く新しいメカニズムによるものであると考えられた。

この持続的な内皮細胞層物質透過調節の機構解明は、腫瘍血管の物質透過性を研究するにあたり非常に重要であると考えられる。しかしながら、このような定常状態の内皮細胞層透過調節機構は全く未知であり、そこでまず、その機構の基礎検討を次章において行うこととした。

第二章 血管内皮細胞層の透過性とコラーゲンの関係

前章において、定常状態における内皮細胞層の物質透過性が、腫瘍細胞の産生する液性因子によって上昇することを明らかとしたが、先にも記したが、このような定常状態における透過性がどのような機構により調節されているかの報告は未だない。そこで、本章において定常状態における透過調節機構の解明を行うこととした。

さて近年、細胞外マトリックスは単なる細胞と細胞の間を埋める物質ではなく、種々の細胞機能に影響を与えていることが数多く報告されていることから²⁵⁾⁻²⁷⁾、細胞外マトリックスが内皮細胞層透過調節機構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、透過調節機構との関係について検討を行った。

第一節 透過性におよぼすアスコルビン酸の影響

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²⁸⁾、内皮細胞層物質透過性がコラーゲンにより調節されているのであれば、アスコルビン酸によって内皮細胞層の透過性に変化が認められることとなる。そこで、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。

実験方法

BAECをインターセル上に播種し、24時間後から、各濃度のアスコルビン酸 (Asc Acid) およびその安定誘導体アスコルビン酸2リン酸 (Asc 2-P) を添加した培地により培養を行った。5日後、細胞はコンフルエントに到達し、前章に示した方法により透過実験を行った。

実験結果および考察

BAEC層の透過性は、アスコルビン酸の濃度依存的に低下した (Fig. 8)。データには示していないが、コンフルエント時の細胞数にコントロール群との有意な差は認められず、また位相差顕微鏡観察においても、形態的な相違は観察されなかった。線維芽細胞はアスコルビン酸添加培地により培養を行うと多層化することが報告されているが²⁹⁾、内皮細胞においてはその形態的な特徴である単層を維持しており、この透過抑制作用が、内皮細胞の生理機能を逸脱したため生じたものではないと推察される。また、この透過抑制作用はアスコルビン酸2リン酸においても同様に観察された。アスコルビン酸の血中濃度は0.03-0.1 mMであることから、本濃度での透過抑制作用は生理的な現象であると考えられた。

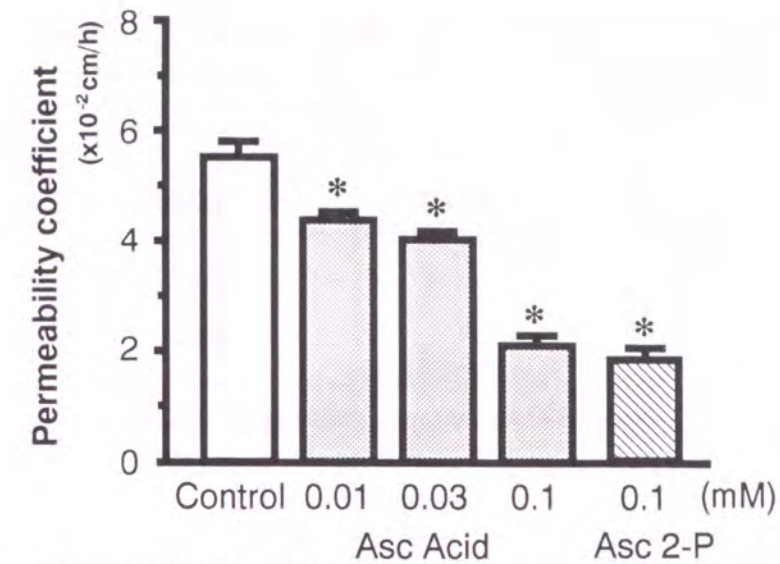


Fig. 8 Effect of Asc Acid or Asc 2-P on the permeability of BAEC

BAEC were cultured in permeation chambers with (0.01-0.1 mM) or without Asc Acid or Asc 2-P (0.1 mM). When the cells were at confluence, the permeability assay was performed. * P<0.001 compared to control

第二節 作用の特異性に関する検討

アスコルビン酸による透過抑制作用が他の部位や種の内皮細胞層においても観察されるか検討を行った。

実験方法

ウシ大静脈およびヒト臍帯静脈由来内皮細胞は前章の方法に準じ継代培養したものをを用いた。各種内皮細胞をインターセル上に播種し、アスコルビン酸 (0.03 mM) 添加培地により培養を行い、コンフルエント時に透過実験を行った。

実験結果および考察

アスコルビン酸はウシ大動脈のみならず、ウシ大静脈やヒト臍帯静脈といった部位や種の異なる内皮細胞層の透過性をも抑制することが判明した (Table 2)。アスコルビン酸による内皮細胞層透過抑制作用の普遍性が示された。

Table 2 Effect of Asc Acid on the permeability of endothelial monolayers

	Permeability coefficient ($\times 10^{-2}$ cm/h)	
	Control	Asc Acid
BAEC	12.2 \pm 1.3	7.6 \pm 0.5 *
BVEC	14.8 \pm 2.5	7.0 \pm 1.6 *
HUVEC	2.02 \pm 0.51	0.55 \pm 0.02 *

BAEC: Bovine aortic endothelial cell
 BVEC: Bovine venous endothelial cell
 HUVEC: Human umbilical vein endothelial cell
 * P<0.005 compared to control

第三節 還元剤による検討

アスコルビン酸は還元力を有していることから、透過抑制作用がその還元作用に起因しているのか、それとも他の作用に起因しているのか、還元剤ジチオスレイトール (DTT) を用い検討を行った。

実験方法

BAECをインターセル上に播種し、DTT (0.1 mM) 含有培地により培養を行い、コンフルエント時に透過実験を行った。

実験結果および考察

MTT assayにより³⁰⁾、DTT (0.1 mM) の培地溶解時の還元力は、アスコルビン酸 (0.1 mM) と同等であった (データには示さず)。DTTはBAEC層の透過性に全く影響を与えなかった (Fig. 9)。本結果から、アスコルビン酸による透過抑制作用はその還元力にのみ起因するのではなく、アスコルビン酸そのものの作用であると示唆された。

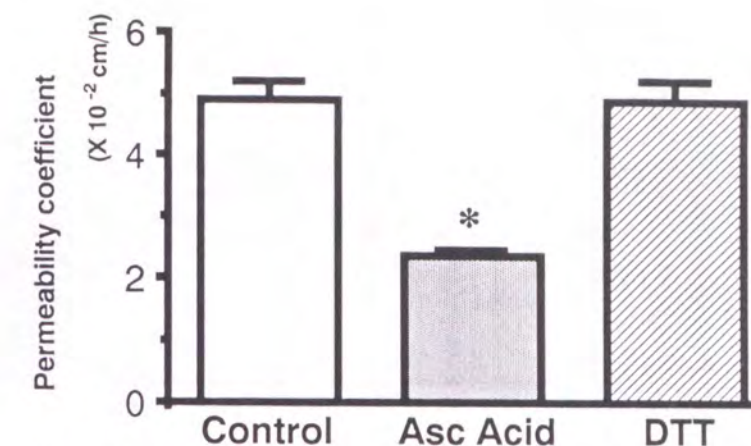


Fig. 9 Effect of DTT on the permeability of BAEC

BAEC were cultured in permeation chambers with or without DTT (0.1 mM). When the cells were at confluence, the permeability assay was performed. * P<0.001

第四節 コラーゲン合成阻害剤の影響

前節より、アスコルビン酸による透過抑制作用は、アスコルビン酸そのものの作用に起因することが明らかとなった。アスコルビン酸はその生理作用としてコラーゲン合成を促進することが挙げられることより^{31),32)}、透過抑制作用がコラーゲン合成促進に起因していると考えられる。そこで、コラーゲン合成促進と透過抑制との関係をコラーゲン合成阻害剤アゼチジン 2 カルボン酸 (AzC) を用い検討を行った。

実験方法

BAECをインターセル上に播種し、AzC単独、およびアスコルビン酸2リン酸との共存下で培養を行い、コンフルエント時に透過実験を行った。

実験結果および考察

AzCは、濃度依存的にアスコルビン酸2リン酸による透過抑制作用を阻害した (Fig. 10)。AzC 0.3 mM単独では透過に何ら影響を与えなかったことから、この濃度でのAzCによるアスコルビン酸2リン酸の透過抑制の阻害作用は、AzC単独の透過上昇作用によるものではなく、そのコラーゲン合成阻害作用に起因するものと示唆された。

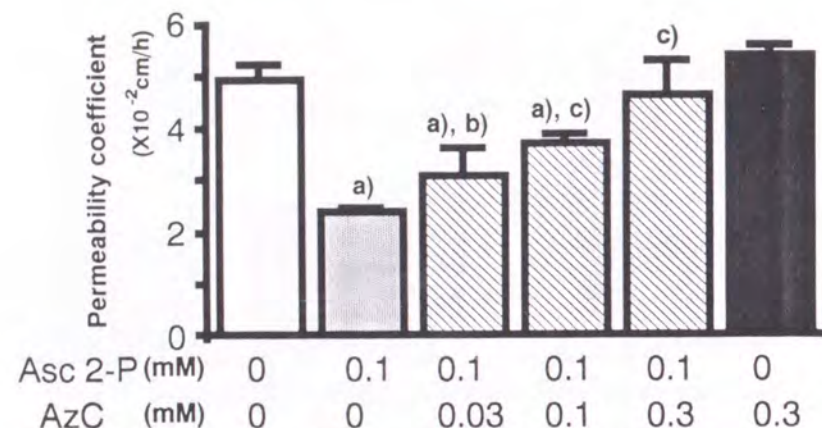


Fig. 10 Effect of the collagen synthesis inhibitor AzC on the reduction in the permeability of BAEC caused by Asc 2-P

BAEC were cultured in permeation chambers with 0.1 mM Asc 2-P and AzC (0.03-0.3 mM). When the cells were at confluence, the permeability assay was performed. a) P<0.01 compared to control, b) P<0.05 compared to Asc 2-P, c) P<0.01 compared to Asc 2-P.

第五節 コラーゲン合成と透過性の関係

前節の結果より、内皮細胞層の透過抑制作用はコラーゲン合成促進に起因することが示唆された。しかしながら、先の結果は阻害剤による検討であり、直接的にコラーゲン合成の測定を行っていない。さらに逆の場合、すなわちコラーゲン合成の抑制が透過上昇を誘導するかも不明である。そこで、³H-プロリンを用いたコラゲナーゼ消化法により直接的にコラーゲン合成を測定し、その透過性との関係を検討した。

実験方法

(1) 細胞培養

BAECをインターセル上に播種し、4時間後、培地を³H-プロリン (10 μCi/ml)含有DMEMにアスコルビン酸またはコラーゲン合成阻害剤である3,4-ジヒドロキシ安息香酸エチル (DHB; 0.3 mM) を添加したものに交換した。培地交換は一日毎に行い、コンフルエント時に透過実験を行った。

(2) コラーゲン合成

コラーゲン合成はGeesinらの方法に準じた³³⁾。すなわち、透過実験後のBAECをNaOH (0.5 N) により溶解し、中和後、非特異的な蛋白分解酵素を含まないコラゲナーゼ (アドバンス・バイオフィアクチュア社) 処理 (37°C, 3時間) を行った。本溶液にトリクロロ酢酸を添加し、遠心後、上清および沈殿のカウントを液体シンチレーシ

ョンカウンターにより測定した。全蛋白に占めるコラーゲンの割合 (コラーゲン合成率; R) はPeterkofskyとDiegelmannの方法³⁴⁾により算定した。

$$R = C / (N \times 5.4 + C) \times 100 (\%)$$

ただし、C; 上清のカウント (コラーゲンに由来), N; 沈殿のカウント (非コラーゲン蛋白に由来) を示す。

実験結果および考察

アスコルビン酸によって、内皮細胞のコラーゲンのカウントは約6倍に上昇した (Table 3)。この上昇はコラーゲンのカウントのみではなく、全合成蛋白に占めるコラーゲンの割合もコントロール群1.30±0.26 (%)からアスコルビン酸群5.68±0.84 (%)と同様に上昇していることから、コラーゲン合成が特異的に促進されたことを示している。またコラーゲン合成阻害剤3,4-ジヒドロキシ安息香酸エチルは、全合成蛋白量を低下させることなく、コラーゲン合成を特異的に阻害し、透過性をコントロールの約3倍に上昇させた。3,4-ジヒドロキシ安息香酸エチルは、先に検討したAzCとは異なるメカニズム、すなわちコラーゲン合成酵素の阻害作用によりコラーゲン合成を特異的に阻害するが、本薬物によって、コラーゲン合成阻害により透過性の上昇が観察された結果は、コラーゲンが内皮細胞層物質透過調節に重要な役割を果たしていることを示している。

Table 3 Effect of Asc Acid and DHB on the permeability and collagen content of BAEC

	Collagen (X10 ² dpm)	Collagen/Total protein (%)	Non-collagen protein (X10 ² dpm)	Permeability coefficient (X10 ⁻² cm/h)
Control	67 ± 10	1.30 ± 0.26	894 ± 52	3.27 ± 0.17
Asc Acid	410 ± 92*	5.68 ± 0.84*	1018 ± 145	1.21 ± 0.08*
DHB	17 ± 3*	0.30 ± 0.07*	833 ± 92	10.78 ± 1.52*

Asc Acid: Ascorbic acid (0.1 mM)
DHB: 3,4-Dihydroxybenzoic acid ethyl ester (0.3 mM)

* P<0.01 compared to control

第六節 細胞外マトリックスの影響

内皮細胞が合成・分泌したコラーゲンは、基底膜に蓄積され、網目状のマトリックス構造を形成する。したがって、このマトリックス層が物質透過の障壁となっている可能性が考えられる。そこで、コラーゲン合成促進による透過抑制が、マトリックス層そのものによる障壁作用に起因するものか、内皮細胞層そのものの強固な細胞間隙構築に起因するものか検討を行った。

実験方法

透過実験後、0.02 Nアンモニア水により細胞を除去し、細胞外マトリックス層のみを残したテフロン膜を調製し³⁶⁾、透過実験を行った。各層の透過係数は以下の式により求めた。

$$1/P_{\text{total}} = 1/P_{\text{EC}} + 1/P_{\text{ECM}} + 1/P_{\text{mem}}$$

P_{total} は内皮細胞層、細胞外マトリックス層およびテフロン膜を含めた全体の透過係数、 P_{EC} は内皮細胞層のみの透過係数、 P_{ECM} は細胞外マトリックス層のみ、 P_{mem} は内皮細胞を培養していないテフロン膜のみの透過係数を示す。

実験結果および考察

アスコルビン酸によって、細胞外マトリックス層の透過係数 (P_{ECM}) はコントロール27.0±3.25 ($\times 10^{-2}$ cm/h) からアスコルビン酸群14.90±3.25 ($\times 10^{-2}$ cm/h) と低下した (Table 4)。

Table 4 Effects of Asc 2-P on the permeability coefficients of FITC-dextran

	$P_{\text{(EC+ECM)}}$	P_{EC}	P_{ECM}
Control	5.24 ± 0.40	8.53 ± 2.74	27.00 ± 3.25
Asc 2-P	1.67 ± 0.15*	1.96 ± 0.17*	14.90 ± 1.27*

$P_{\text{(EC+ECM)}}$: permeability coefficient of BAEC monolayer and extracellular matrix ($\times 10^{-2}$ cm/h).

P_{EC} : permeability coefficient of BAEC monolayer ($\times 10^{-2}$ cm/h).

P_{ECM} : permeability coefficient of extracellular matrix ($\times 10^{-2}$ cm/h).

* $P < 0.001$ compared to control

一方、内皮細胞層のみの透過係数 (P_{EC}) はコントロール群8.53±2.74 ($\times 10^{-2}$ cm/h) からアスコルビン酸群1.96±0.17 ($\times 10^{-2}$ cm/h) と P_{ECM} と比較して、その低下は顕著なものであった。本結果からアスコルビン酸による物質透過抑制作用は、細胞外マトリックス層のコラーゲンが直接的な物質透過の障壁となっているのではなく、内皮細胞が産生したコラーゲンによって内皮細胞自身が影響を受け、強固な細胞間隙形成が促進されたと推察される。

第七節 作用時間の検討

アスコルビン酸の血管内皮細胞への作用時間を変化させ、その透過抑制効果を検討した。

実験方法

BAECを培養dish上に播種し、コントロールまたはアスコルビン酸添加培地により培養を行った。コンフルエント時に1:4の濃度で継代培養し、2継代後、インターセル上に播種し (1/5コンフルエント密度)、コントロールまたはアスコルビン酸添加培地により培養を行った。コンフルエント時 (インターセル播種5日後) に透過実験を行った。

実験結果および考察

アスコルビン酸を最も長時間作用させたD群 (計15日間) において、最も透過性が低下した (Fig. 11)。C群はアスコルビン酸をdish上での培養時にのみ作用させたもので、インターセル培養時には作用させていないことから、アスコルビン酸の透過抑制作用は、血管作動性薬物のような短期間で起こる、一過性の透過変化ではなく、長期間にわたる持続的なものであることが示された。

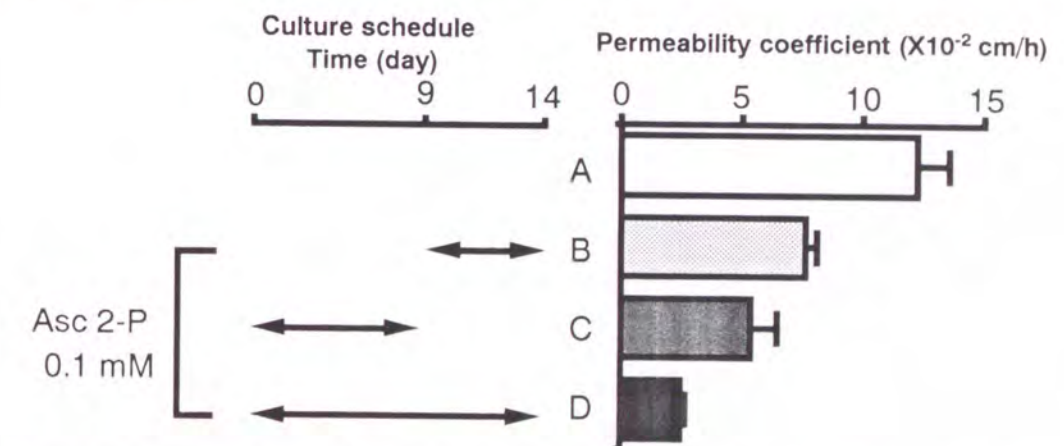


Fig. 11 Long-term effect of Asc 2-P on the permeability of BAEC

A: Control (no Asc Acid). B: Cells cultured with Asc Acid for the last 5 days. C: Cells cultured with Asc Acid for the first 9 days. D: Cells cultured with Asc Acid for 14 days.

第八節 小括

従来より報告されてきた内皮細胞層透過性変化は、薬物反応における短期的な一過性の透過性変化であり、定常状態における透過性変化に関する報告は全くなかったが、今回アスコルビン酸を用い、コラーゲンが定常状態における内皮細胞層透過性調節に重要な役割を担っていることを初めて明らかとした。

コラーゲンによる透過抑制作用は、細胞外マトリックス層の発達によるそのものの障壁機能の上昇に伴うものではなく、内皮細胞間の間隙が強固になった結果であると推察された。また作用時間の検討により、前培養のみ行ったものにおいても低い透過性構造が維持されたことから、コラーゲンによる透過調節は、一過性のものではなく、定常状態における持続的なものであることが示された。

しかしながら、コラーゲンがどのようなメカニズムにより強固な細胞間隙構築を誘導するのかは未だ不明である。内皮細胞層における高分子物質の透過障壁はタイトジャンクションであるが、そのタイトジャンクション特異蛋白が最近報告されたばかりであり³⁷⁾⁻⁴⁰⁾、その透過調節機構に関しては全く未知であり、今後の研究に期待する。

さて、培養血管内皮細胞は*in vivo* に比べ高い透過性を示すことが報告されている⁴¹⁾。通常の培地、例えば今回用いたDMEMもその成分としてアスコルビン酸を含有していない。仮に添加するFCS中に含まれていたとしても、FCS添加量は培地の10-20%容量であり、またアスコルビン酸は水溶液中で非常に不安定であることから、内皮細胞に限らず、培養細胞は、生体に比べ非常に低いアスコルビン酸レベル下で培養されていることになる。生体におけるアスコルビン酸欠乏は壊血病として知られており、その症状として血管の脆弱化が知られている。本事実からも、通常の培養系における内皮細胞は、アスコルビン酸欠乏による壊血病状態にあり、*in vivo* と同様に脆弱な血管構造を構築し、その結果、*in vivo* と比較して高い物質透過性を示しているのかもしれない。

第三章 腫瘍細胞CMによる透過性上昇とコラーゲンの関係

前章において、内皮細胞層の定常状態における物質透過性がコラーゲンにより調節されていることを明らかとした。すなわち、コラーゲン量の低下が透過性の上昇を誘導することを示した。そこで、第一章で示した腫瘍細胞CMによる定常状態の持続的な透過上昇もコラーゲン量の低下に起因するものなのか検討を行った。

第一節 腫瘍細胞CMの内皮細胞コラーゲン合成におよぼす影響

まず³H]-プロリンを用いたコラゲナーゼ消化法により、B16CMがBAECのコラーゲン量にどのような影響を与えるか検討を行った。

実験方法

(1) CMの調製

B16CMは第一章の方法に準じ採取した。B16細胞によって培地中の成分が摂取され、また細胞が排出した代謝物が新たに増加するため、B16CMは含有するフリーのプロリン量がコントロール培地と比較して異なっていると考えられる。したがって、³H]-プロリンを用いたコラーゲン合成測定系は、フリーのプロリン量がコントロールとB16CMとで異なった場合、放射ラベルプロリンの取り込み量に差が生じ、コラーゲン合成量を正しく評価できない。そこで、コントロール培地およびB16CM中のフリーのプロリン量を等しくすべく、透析を行い、フリーのプロリンを除去し、その後、再び新たなASF培地にて透析を行い、両培地中のフリーのプロリン量を等しく調製した。本培地に³H]-プロリン (10 μ Ci/ml) を添加したものを実験に供した。

(2) 透過性およびコラーゲン合成測定

BAECをインターセル上に播種し、4時間後、先に調製したB16CMに交換し、培地交換は一日毎に行った。コンフルエント時に、透過実験およびコラーゲン合成量を第一および二章に準じた方法により測定した。

実験結果および考察

B16CMによって、コラーゲンのカウントは約1/3に減少することが判明した (Table 5)。全蛋白に占めるコラーゲンの割合も同様に低下していることは、B16CMが非特異的に蛋白量を減少させたのではなく、コラーゲンを特異的に減少させたことを示している。B16CM培養時のコラーゲンは、コラーゲン合成阻害剤3,4-ジヒドロキシ安息香酸エチル群とほぼ同程度にまで減少し、また透過性も同程度にまで上昇した。本結果から、B16CMによる透過上昇はコラーゲン量の減少に起因することが強く示唆された。

Table 5 Effect of Asc Acid, DHB and B16CM on the permeability and collagen content of BAEC

	Collagen (X10 ² dpm)	Collagen/Total protein (%)	Non-collagen protein (X10 ² dpm)	Permeability coefficient (X10 ⁻² cm/h)
Control	67 ± 10	1.30 ± 0.26	894 ± 52	3.27 ± 0.17
Asc Acid	410 ± 92*	5.68 ± 0.84*	1018 ± 145	1.21 ± 0.08*
DHB	17 ± 3*	0.30 ± 0.07*	833 ± 92	10.78 ± 1.52*
B16CM	22 ± 3*	0.36 ± 0.07*	931 ± 65	9.07 ± 1.03*

Asc Acid: Ascorbic acid (0.1 mM)

DHB: 3,4-Dihydroxybenzoic acid ethyl ester (0.3 mM)

* P<0.01 compared to control

第二節 CMのコラーゲン分解作用の検討

前節において、B16CMはコラーゲンを特異的に減少させ、このことが透過性上昇を誘導させていることが示された。このコラーゲン量は、実験系からも明らかなように、内皮細胞が合成したコラーゲン量から分解量を差し引いた、透過実験時に存在するコラーゲン量を示している。したがって、このコラーゲン量の減少は二つの可能性、すなわち内皮細胞のコラーゲン合成が阻害されたか、またはコラーゲンの分解が促進されたかである。そこでこの減少がどちらに起因するのか、まず分解作用が認められるかをパルスラベル法により検討を行った。

実験方法

BAECをインターセル上に播種し、³H]-プロリン含有コントロール培地により培養を行った。3日後、³H]-プロリンフリーのコントロール培地およびB16CMに交換し、さらに3日間培養した後、コラーゲン量を測定した。

実験結果および考察

B16CMによってコラーゲンのカウントは約1/3に減少することが判明した (Fig. 12)。また全蛋白に占めるコラーゲンの割合も同様の比率で低下していることから、B16CMはコラーゲンを特異的に分解したものと推察される。コラーゲンのカウントは、前節の結果 (Table 5) とほぼ同程度の割合、すなわちコントロール量の約1/3に減少していることから、このコラーゲン量の減少は合成阻害の結果ではなく、大部分が分解促進に起因するものと示唆された。

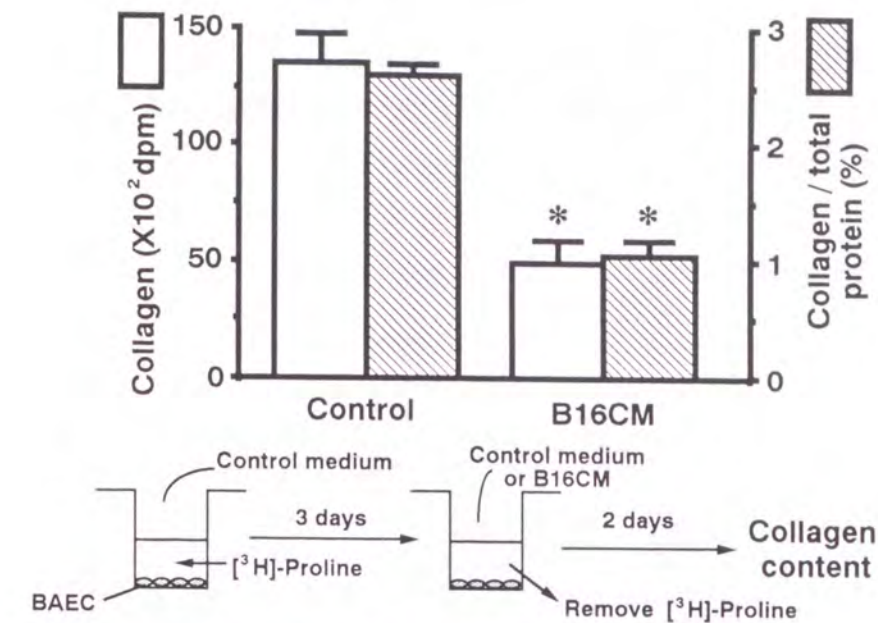


Fig. 12 Effect of B16CM on the collagen content of BAEC

BAEC were cultured in permeation chambers with the control medium containing ³H]-proline. After 3 days of cultivation, the cells were washed and cultured with ³H]-free control medium or B16CM. After 2 additional days, the collagen content was quantified by collagenase digestion methods. * P<0.001 compared to control

第三節 CMの細胞外マトリックス分解作用の検討

前節の結果より、B16CMによるコラーゲン量の低下は、コラーゲン分解促進の結果であることが明らかとなった。コラーゲンを分解するものとして、その分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼが挙げられ、腫瘍細胞、内皮細胞ともに本酵素を産生することが知られている^{42),43)}。したがって、B16CMによるコラーゲンの分解は、B16CMによる直接の分解作用に起因する場合か、またはB16CMによって内皮細胞のコラーゲン分解能が上昇したことに起因する場合の二通りの可能性が考えられる。そこで、どちらに起因するのか明らかにすべく、まず直接の分解作用に起因するのかを、内皮細胞フリーの系における、細胞外マトリックス層コラーゲンをB16CMが分解するのかどうかにより検討を行った。

実験方法

BAECをインターセル上に播種し、³H]-プロリン添加コントロール培地により3日間培養を行った。その後、細胞をPBSで洗浄し、0.02 N アンモニア水により細胞を除去し、³H]-ラベルした細胞外マトリックス層がコートされたテフロン膜を調製した³⁶⁾。PBSで3回洗浄後、³H]-プロリンフリーのコントロールおよびB16CMを添加し、CO₂ インキュベーター内で2日間インキュベートを行い、テフロン膜上に残されたコラーゲン量を測定した。

実験結果および考察

B16CMによって、細胞外マトリックス中のコラーゲン量に全く変化が認められず、B16CMによる直接のコラーゲン分解作用はないことが示された (Fig. 13)。したがって、B16CMによるコラーゲンの分解は、B16CMが内皮細胞に作用し、内皮細胞のコラーゲン分解能を上昇させたことに起因することが強く示唆された。

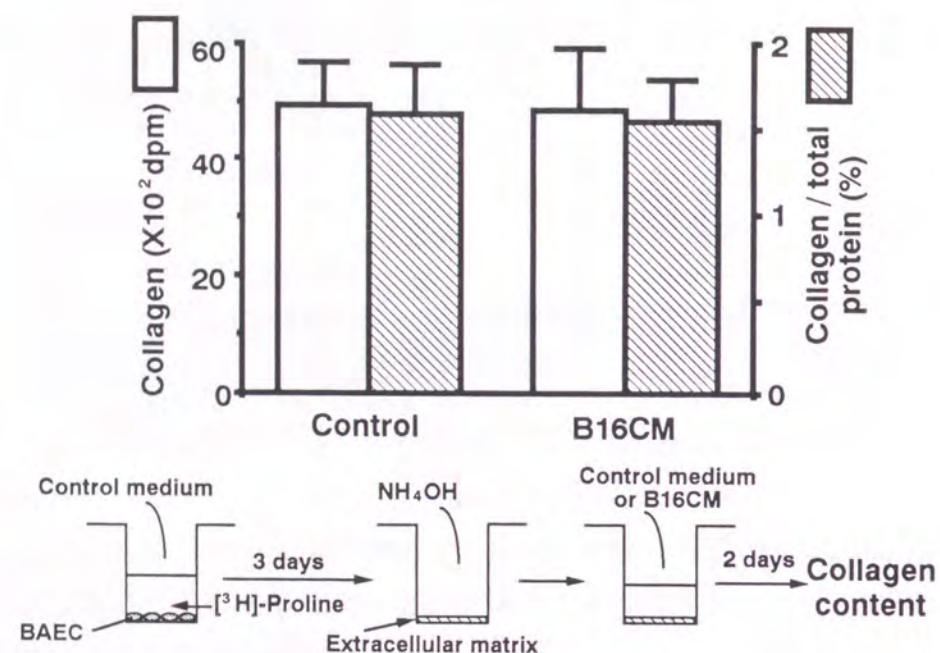


Fig. 13 Effect of B16CM on the collagen content of extracellular matrix

BAEC were cultured in permeation chambers with the medium containing [³H]-proline. After 3 days of cultivation, the cells were treated with 0.02 N NH₄OH. The extracellular matrix-coated chambers were incubated with control medium or B16CM. After 2 additional days, the collagen content was quantified by collagenase digestion method.

第四節 マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤の影響

前節より、B16CMが内皮細胞のコラーゲン分解能を上昇させ、コラーゲン量を減少させている可能性が示唆された。そこで実際にこのコラーゲン量の減少がマトリックスメタロプロテアーゼによるものか否か、その阻害剤を用い調べた。

実験方法

BAECをインターセル上に播種し、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤1,10-フェナントロリン (1.0 μM) およびB16CMに溶解させた1,10-フェナントロリンにより培養を行いコンフルエント時 (播種5日後) に透過実験を行った。

実験結果および考察

1,10-フェナントロリン単独では透過に何ら影響をおよぼさなかったが、B16CMとの併用では、B16CMによる透過上昇作用を顕著に阻害した (Fig. 14)。本結果は、B16CMによる透過上昇がマトリックスメタロプロテアーゼに起因していることが強く示唆された。

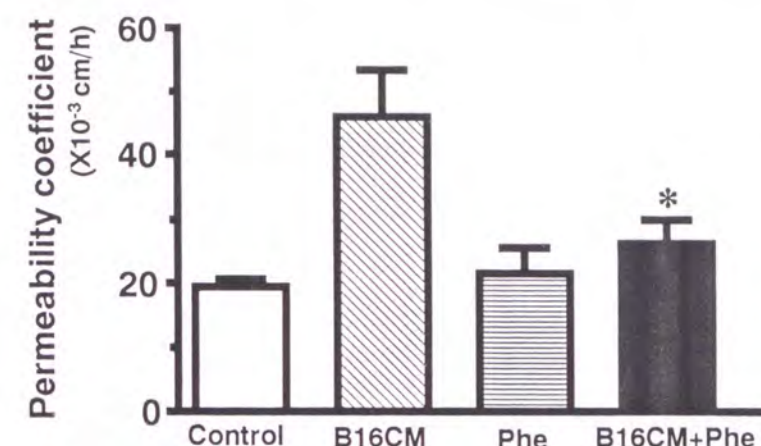


Fig. 14 Effect of 1,10-phenanthroline (Phe) on the increase of permeability of BAEC cultured with B16CM

BAEC were cultured in permeation chambers with the B16CM together with Phe. When the cells were at confluence, the permeability assay was performed. * P<0.05 compared to B16CM

第五節 小括

第一および第二章において、腫瘍細胞CMが内皮細胞層の透過性を上昇させることを見だし、また、内皮細胞層の透過性がコラーゲンにより調節されていることを示した。本章においては、この二つの知見を結び付けること、すなわち腫瘍細胞CMによる透過上昇がコラーゲン量の減少に起因することを明らかとした。

腫瘍細胞がマトリックスメタロプロテアーゼを産生し、またそのCM中に、マトリックスメタロプロテアーゼが含まれていることが報告されているが⁴²⁾、B16CMによる細胞外マトリックス中のコラーゲンの直接の分解作用は認められなかった (Fig. 13)。今回の実験に用いたCM中には、FCSが10%容量で添加されており、その中の多量の蛋白質がその蛋白分解作用を阻害したため、コラーゲンの分解作用が認められなかったものと推察している。しかしながら、第二節において内皮細胞存在下でのコラーゲンの分解作用が認められたのは (Fig. 12)、マトリックスメタロプロテアーゼの基質であるコラーゲンが、内皮細胞直下の基底膜に存在しており、内皮細胞の産生したマトリックスメタロプロテアーゼが局所において高濃度に作用できたため、分解作用が認められたものと推察している。

内皮細胞はマトリックスメタロプロテアーゼのみならず、そのインヒビターも産生

することが知られており⁴⁴⁾、内皮細胞のコラーゲン分解活性は、マトリックスメタロプロテアーゼおよびそのインヒビターの両者のバランスにより決定されている。今回の実験からだけでは、B16CMによるコラーゲン分解促進作用が、内皮細胞のマトリックスメタロプロテアーゼ分泌促進かマトリックスメタロプロテアーゼインヒビター分泌抑制のどちらに起因しているかは不明であり、また、CM中のどのような因子が、このような作用を有するのかも未だ不明であり、今後のさらなる研究に興味をもたれる。

さて、固形腫瘍の増大には、その栄養供給および老廃物除去のパイプとなる血管の新生が不可欠である^{45),46)}。また、この血管新生は腫瘍細胞が産生する種々の因子により誘導されることが報告されている⁴⁷⁾⁻⁴⁹⁾。さらに血管新生時には、内皮細胞が組織中を伸展できるよう、間質を分解するためのマトリックスメタロプロテアーゼが内皮細胞から多量に分泌されていることが報告されている⁵⁰⁾。これらの知見から、腫瘍細胞の産生する液性因子によって内皮細胞のマトリックスメタロプロテアーゼ活性が上昇し、その結果、血管新生が誘導され、腫瘍自身の増大に有利な条件を誘導しているという生理的な意義付けを仮説することができる。本章において得た、腫瘍細胞が産生する液性因子により内皮細胞のマトリックス分解能が促進されるという結果は、この生理的な意義付けを支持し得るものであり、興味深い。

さらに、電子顕微鏡像観察において、*in vivo*の腫瘍組織血管の基底膜構造は正常組織血管のそれに比べ断続的、かつ不連続であることが報告されている⁵¹⁾⁻⁵³⁾。腫瘍細胞CMによってコラーゲン量が減少していることを示した本章の結果は、この*in vivo*報告と一致すると考えられ、腫瘍細胞CMによって腫瘍組織特異的内皮細胞機能発現がなされていることを強く支持するものと考えられる。

第四章 腫瘍組織由来血管内皮細胞の単離・培養およびその特性についての検討

前章までで、腫瘍細胞CMの系により腫瘍組織特異的な内皮細胞層物質透過機能について検討を行ってきた。緒論においても述べたが、この研究のアプローチはCMの系のみならず、腫瘍組織から単離・培養した血管内皮細胞を用いる方法も考えることができる。しかしながら、現在までに種々の組織からの血管内皮細胞が単離・培養されているが、腫瘍組織からの報告は未だない。そこで、さらなる腫瘍組織特異的な内皮細胞機能研究のため、まず単離・培養法の確立を試みた。

第一節 腫瘍組織由来血管内皮細胞の単離・培養法の確立

血管内皮細胞の単離法として、毛細血管の場合、組織を構成する種々の細胞と内皮細胞との密度の違いを利用した、Percoll密度勾配遠心法が用いられている⁵⁴⁾⁻⁵⁶⁾。そこで、本法を用い、腫瘍組織からの内皮細胞単離・培養を試みた。内皮細胞の同定は、その特異酵素であるアンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin Converting Enzyme: ACE)⁵⁷⁾、基底膜成分マトリゲル上での毛細血管様の管腔形成⁵⁸⁾、および特異抗原蛋白である第VIII因子関連抗原⁵⁹⁾により行った。

実験方法

(1) Percoll密度勾配の作製

Percoll (ファルマシア社) 9 ml, 10倍濃度の最小必須培地 1 ml, 10%FCS含有最小必須培地 10 mlを混合し、25 ml遠心チューブに入れ、アングルローターにて20,000×g 15分間遠心を行い、連続密度勾配を作製した。

(2) 細胞分離

ラット線維芽肉腫KMT-17⁶⁰⁾ (北海道大学医学部癌研究所, 武市紀年博士より供与) をWKAH系雌性ラットに皮下移植し、10-15g時に無菌的に摘出し、Fig. 15に示す手順により処理した。すなわち、腫瘍組織をカミソリにより細片し、コラゲナーゼ (和光純薬; 細胞分散用) 処理 (37°C, 1時間) を行い組織を分散させた。この細胞懸濁液をPercoll密度勾配上に静かに重層させ、スイングローターにて1,500×g, 10分間遠心した。チューブの上層より各フラクションを分取した。

(3) アンジオテンシン変換酵素活性

各フラクションにハンクス液を添加し、遠心処理 (500×g, 5分間を2回) により、細胞破片や培地を洗浄除去した。このように処理した細胞をホウ酸buffer (pH 8.5) に懸濁し、超音波処理により破碎したもののACE活性をFriedlandとSilversteinの方法⁶¹⁾により測定した。

(4) 管腔形成

マトリゲル（コラボレイティブ社）を24-wellに添加し、37°Cで30分間インキュベーターを行い、ゲル化させた。フラクション分取細胞の場合は 1.0×10^6 /ml濃度でマトリゲル上に1 ml添加し、24時間後、PBSにより洗浄し、非接着細胞の除去を行った後、位相差顕微鏡により管腔形成を観察した。培養細胞の場合は、トリプシンにより細胞を剥離し、 1.0×10^5 /mlの濃度で添加し、4時間後、洗浄を行わず、そのままの状態を位相差顕微鏡により観察した。

(5) 第VIII因子関連抗原の蛍光免疫染色

第VIII因子関連抗原の蛍光免疫染色はColeらの方法に準じた⁵⁹⁾。ウサギ抗第VIII因子関連抗原抗体およびFITCラベルヤギ抗ウサギIgG抗体はDAKO社より購入した。

(6) 培地

培地は全てDMEMにEndothelial cell growth supplement（シグマ社：25 μ g/ml）および10%FCSを添加したものをを用いた。

実験結果および考察

遠心分離後、細胞は大きく分けて4つのバンドに分離された（Fig. 15）。ACEは血管内皮細胞のマーカー酵素であることから、本酵素の活性を指標にどのフラクションに内皮細胞が多く存在するか検討を行ったところ、フラクション4-7で高い比活性を示したが、8以降のフラクションでは細胞が多く存在するにもかかわらず低いものであった（Fig. 16）。また内皮細胞は*in vitro*の系において、基底膜成分マトリゲル上で毛細血管様の管腔を形成することが知られていることから⁵⁸⁾、本性質においても、どのフラクションに内皮細胞が多く含まれているか検討を行った（Fig. 17）。管腔形成は4-7のフラクションにおいてのみ観察され、3以前や8以降のフラクションにおいては全く認められなかった。ACE活性および管腔形成実験の結果より、腫瘍組織を構成する各種の細胞が、それぞれの密度にしたがいPercoll密度勾配により分離され、内皮細胞は主に4-7のフラクションに多く存在していることが判明した。

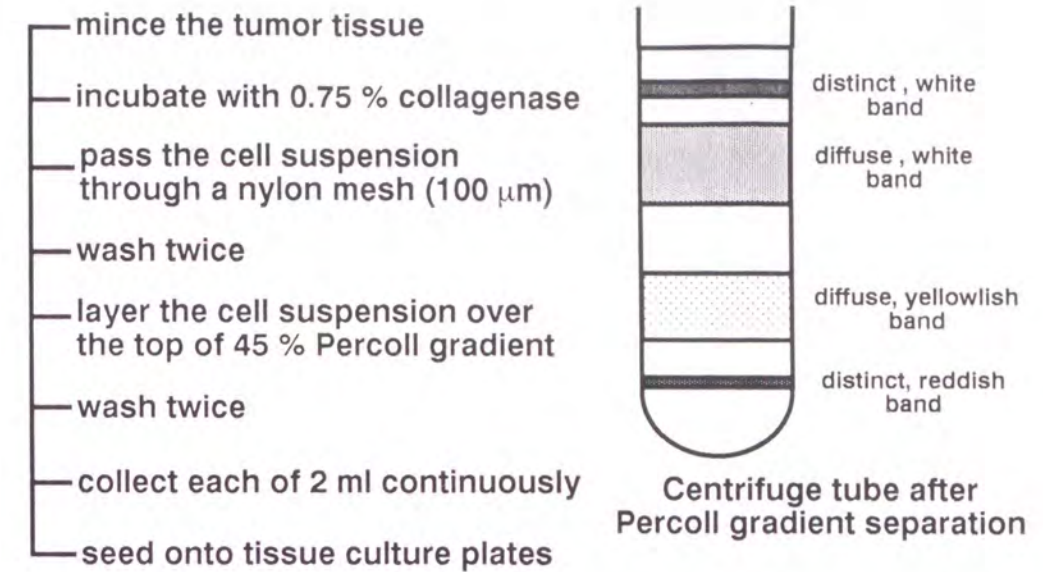


Fig. 15 Schematic protocol of the isolation of endothelial cells from rat KMT-17 fibrosarcoma

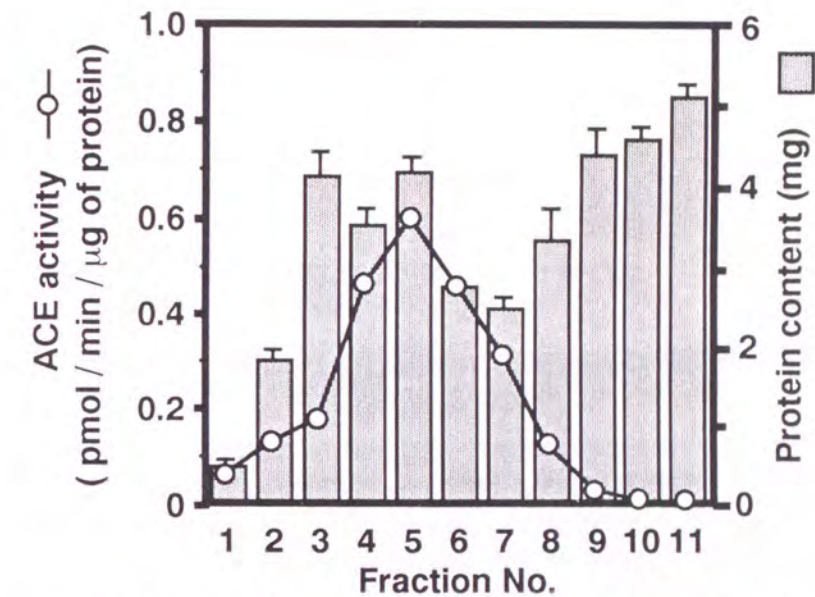


Fig. 16 ACE activity and protein content in each fraction

Tumor tissue was minced and digested by collagenase, and cells were separated by centrifugation through a Percoll gradient. ACE activity and protein content of each fraction was determined.

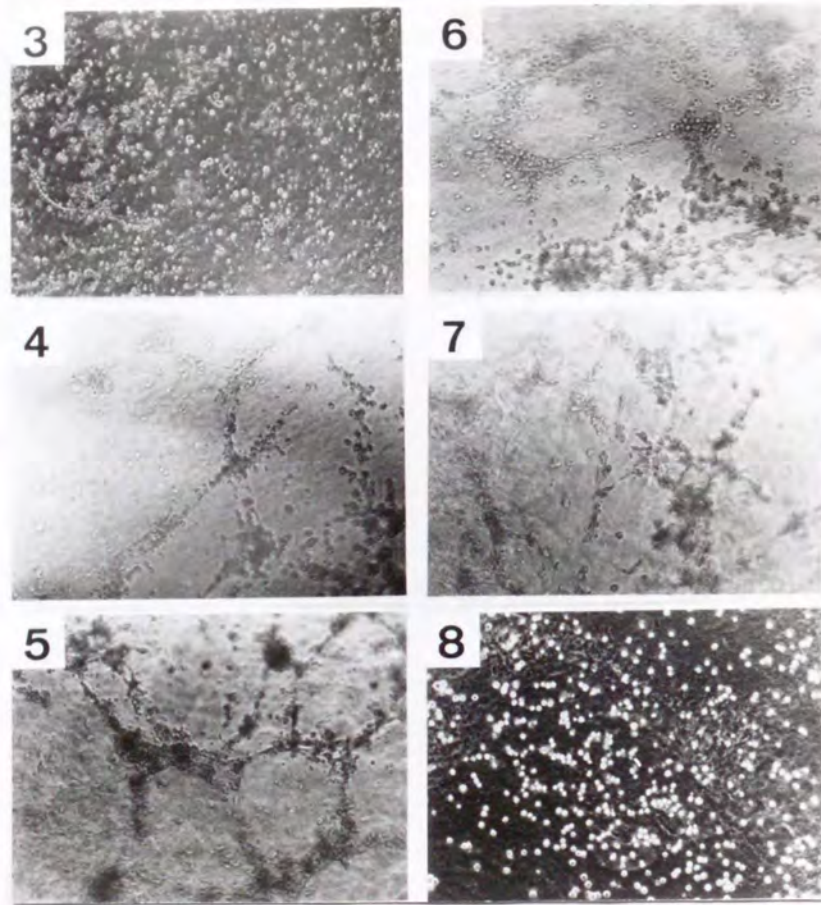


Fig. 17 Phase contrast micrographs of tube formation on Matrigel

Percoll gradient-separated cells were plated onto Matrigel. After 24 h, non-adhering cells were removed by washing-out, and tube formation was observed. The number on the photograph represents the fraction number.

そこで、これらフラクションの細胞を培養dishへ播種し、培養を行ったところ、位相差顕微鏡観察において形態的に不均一な細胞集団であり、また内皮細胞マーカーである第VIII因子関連抗原に対する蛍光免疫染色においても10-50%の細胞が陽性であるに過ぎなかった。

さて内皮細胞は平滑筋細胞などに比べ培養dishへの接着が速いことが知られている⁶²⁾。そこで内皮細胞純度向上を目的にこの接着速度の違いを利用することとした。すなわち、細胞播種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。このようにして得た細胞のコンフルエント時の位相差顕微鏡写真をFig. 18Aに示す。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。Fig. 18Bは正常組織である脂肪組織の毛細血管由来内皮細胞の写真であるが、同様に均一なモノレイヤーを形成していた。

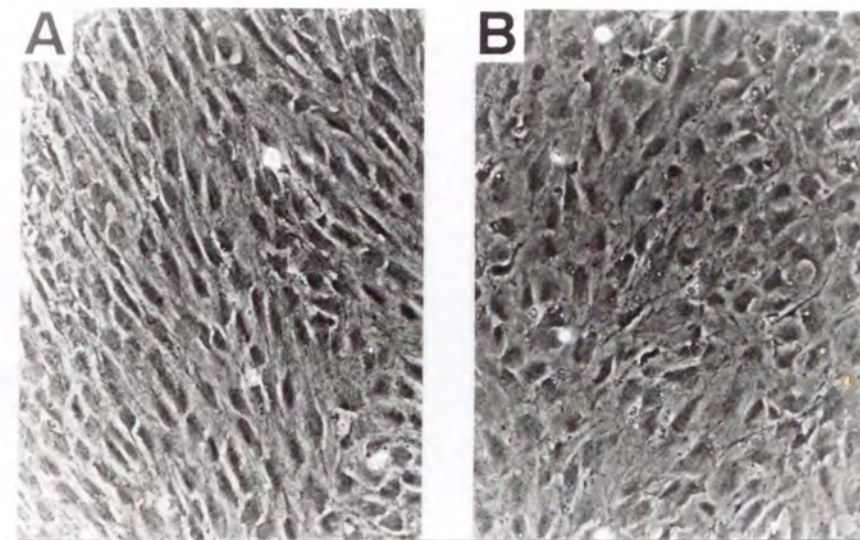


Fig. 18 Phase-contrast micrograph of rat endothelial cells

A: Tumor-derived endothelial cells
B: Epididymal fat capillary-derived endothelial cells

さらに本腫瘍組織由来内皮細胞のマトリゲル上での管腔形成実験の結果をFig. 19に示す。前節の結果より内皮細胞が多く含まれていることが示された4-7のフラクションの接着細胞は、ほぼ100%が管腔形成を行った。しかしながら、3以前や8以降のフラクションの細胞には全く管腔形成は認められなかった。さらに4-7のフラクションの接着細胞の第VIII因子染色を行ったところ、100%の細胞が染色された (Fig. 20)。以上のことから、接着細胞は高純度の内皮細胞であることが示された。すなわち、Percoll密度勾配遠心法により各種細胞の分画を行い、さらに24時間における非接着細胞の除去を行うという2ステップの操作により、腫瘍組織から高純度に内皮細胞を単離・初代培養することに成功した。

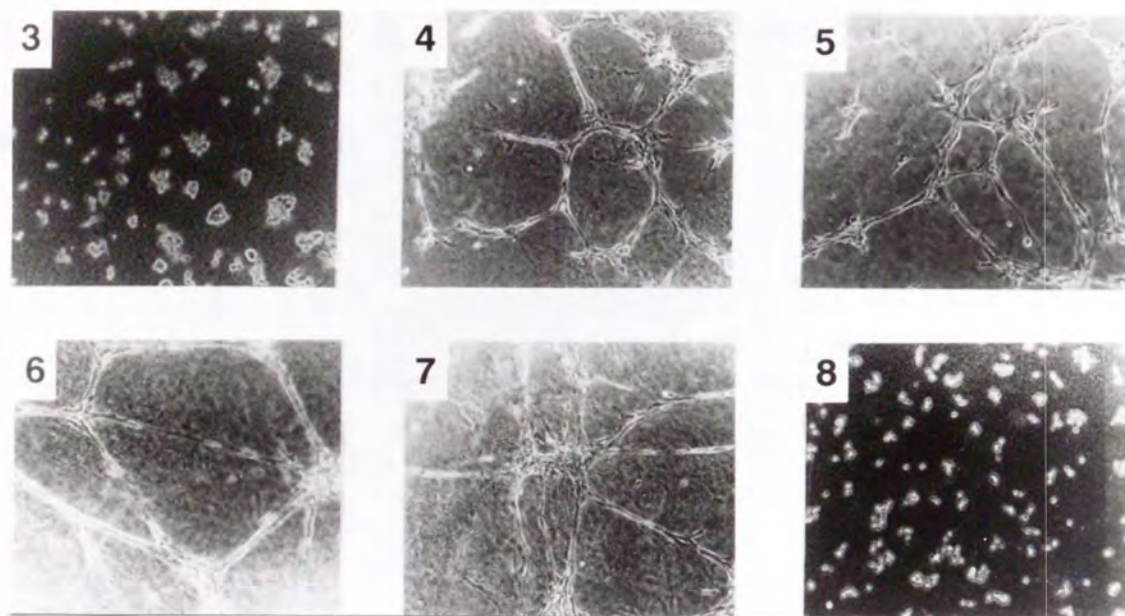


Fig. 19 Phase contrast micrographs of tube formation on Matrigel

Cultured cells derived from each fraction were plated onto Matrigel, and after 4 h, tube formation was observed. The number on the photograph represents the fraction number.

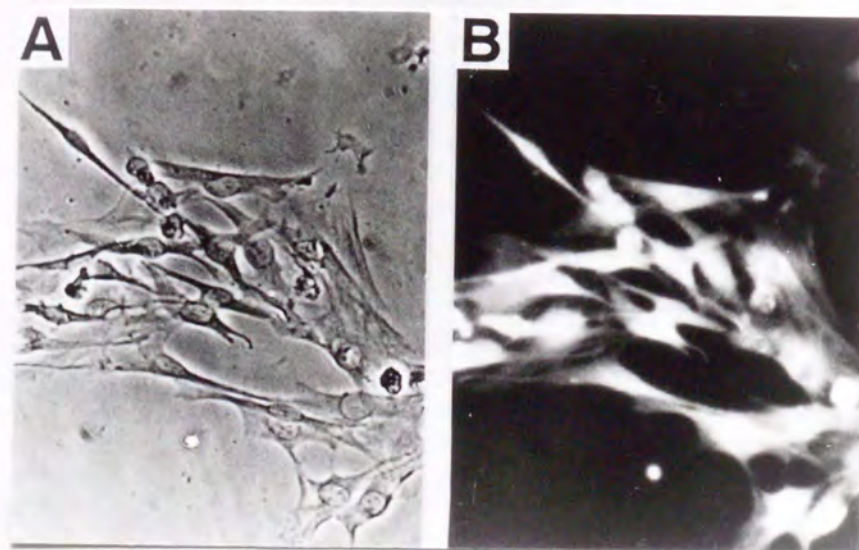


Fig. 20 Phase contrast and fluorescence micrograph of tumor-derived endothelial cells

A: Phase contrast micrograph
B: Fluorescence micrograph of Factor VIII staining by indirect immunofluorescence labeling

第二節 腫瘍組織内皮細胞層の透過性

前節において、腫瘍組織の内皮細胞初代培養に成功したが、本細胞に限らず、培養細胞を用いた実験を行うにあたり最も重要なことは、*in vivo*で有していた性質を培養細胞が発現・維持しているかどうかである。すなわち、*in vivo*で有していた性質を発現・維持していない培養細胞を用いて得られた実験結果は、人工産物のデータである危険性を有している。そこで、単離・培養した腫瘍組織内皮細胞が、*in vivo*で有していた性質を発現・維持しているかどうか透過性を指標に検討を行った。

実験方法

(1) 正常組織由来血管内皮細胞の単離

ラット大動脈および大静脈由来血管内皮細胞はMcGuireとOrkinの方法⁶³⁾に準じ、組織片移植法により採取し、毛細血管内皮細胞はMadriとWilliamsの方法⁶⁴⁾に準じ、ラット精巣上体脂肪より採取・培養を行った。何れの細胞も第VIII因子染色およびマトリゲル上での管腔形成により高純度の内皮細胞であることを確認したものを実験に供した。培地は腫瘍組織内皮細胞と同じものを用いた。

(2) 透過実験

ラット大動脈、大静脈、毛細血管由来内皮細胞および腫瘍組織内皮細胞をインターセル上に播種し、コンフルエント時に第二章と同様の方法により透過実験を行った。

実験結果および考察

ラット血管内皮細胞は何れの組織由来のものでも、位相差顕微鏡観察においてコンフルエントなモノレイヤーを形成していることを確認した。腫瘍組織内皮細胞層は、大動脈、大静脈、脂肪組織由来毛細血管と他の何れの正常組織由来のものに比べ有意に高い透過性を示した (Table 6)。本性質は、*in vivo*における腫瘍血管の特性と類似しており⁶⁾⁻¹⁰⁾、腫瘍組織内皮細胞が*in vivo*と同様な性質を培養系においても発現・維持していることを示唆している。

Table 6 Permeability of rat endothelial monolayers

Source	Permeability coefficient ($\times 10^{-3}$ cm/h)
Aorta	17.23 \pm 2.52
Vena cava	8.43 \pm 1.96
Fat capillary	19.49 \pm 3.57
Tumor	41.10 \pm 3.99*

* $P < 0.001$ compared to other endothelial monolayers

第三節 腫瘍組織内皮細胞の白血球接着性

前節において、初代培養腫瘍組織内皮細胞が物質透過性において腫瘍血管の特性を発現・維持していることを明らかとしたが、*in vivo*における腫瘍血管の特性として、その内皮細胞への白血球細胞の接着性が、一般組織に比べ低いことも挙げることができる⁶⁵⁾。そこで、本性質も認められるかどうか検討を行った。

実験方法

腫瘍組織内皮細胞および脂肪組織毛細血管内皮細胞を96-wellプレート上に播種し、コンフルエント時に実験に供した。ラット血液から白血球分離試薬モノポリ分離溶液（大日本製薬）により白血球を単離し、Luscinskasらの方法⁶⁶⁾により白血球を蛍光色素2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester (BCECF-AM)で蛍光ラベル化した。本白血球細胞を96-wellの内皮細胞上に添加し、37°C 30分間インキュベートを行い内皮細胞へ接着させ、PauliとLeeの方法⁶⁷⁾により、非接着白血球を除去し、接着白血球数を蛍光強度により算定した。

実験結果および考察

腫瘍組織内皮細胞へ接着する白血球数は、正常組織である脂肪組織内皮細胞への接着数に比べ、単位面積あたり、単位内皮細胞数あたり、ともに半減していることが判明した（Table 7）。すなわち、この低い白血球接着数は、腫瘍組織内皮細胞と正常組織内皮細胞とのコンフルエント時の内皮細胞数の違いに起因するものではなく、腫瘍組織内皮細胞の白血球接着性そのものが低下した結果であることを示している。先の透過性においても、腫瘍組織内皮細胞は*in vivo*における腫瘍血管の特性を示したが、白血球の接着性についても同様に*in vivo*の特性を維持していることが示された。

Table 7 Adhesion of leukocytes to endothelial cells

	X10 ⁴ cells / cm ²	X10 ⁴ cells / 10 ⁴ cells
FCEC	1.58 ± 0.12	2.83 ± 0.22
TEC	0.86 ± 0.14*	1.75 ± 0.28*

FCEC: Fat capillary-derived endothelial cell
TEC: Tumor-derived endothelial cell

* P<0.001 compared to FCEC

第四節 継代の影響

一般に初代培養細胞は、継代培養することにより*in vivo*で有していた性質を次第に消失することが知られていることから、初代培養腫瘍組織内皮細胞がどの程度の継代まで、*in vivo*の腫瘍血管の特性を維持しているかを検討することは、今後、本細胞を用いる実験を行うにあたり重要である。そこで、腫瘍内皮細胞の特性におよぼす継代の影響を検討した。

実験方法

Dish上で内皮細胞を培養し、コンフルエント時に1:4の密度で継代培養を行った。各継代数の細胞をインターセル上および96-well上に播種し、コンフルエント時にそれぞれ透過実験、白血球接着実験を行った。

実験結果および考察

腫瘍組織内皮細胞は初代および1継代目は、正常組織内皮細胞に比べ高い透過性を示したが、本性質は4継代目には消失し、正常組織内皮細胞と同レベルとなった（Fig. 21 A）。白血球接着性についても同様に、1継代目までは、腫瘍組織内皮細胞の特性を維持していたが、4継代目には正常組織内皮細胞と同様の接着性を示し、腫瘍血管の特性を消失していた（Fig. 21 B）。*In vivo*において、腫瘍部位の内皮細胞は、腫瘍細胞や種々の間質細胞との相互作用により、腫瘍組織部位特異的な内皮細胞機能を発現していると考えられ、また第一章においてもそのことを明らかとしてきたことから、*in vitro*培養系により、内皮細胞はそれら因子からの影響が断たれているため、次第に腫瘍組織特異的な機能を消失していったものと推察される。

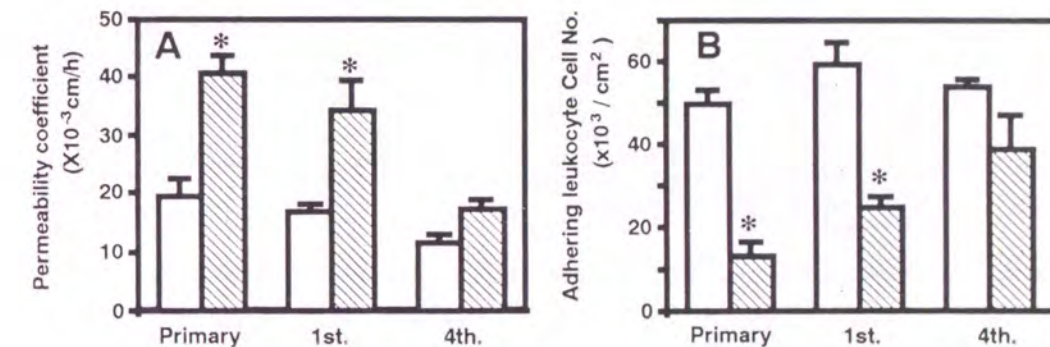


Fig. 21 Diminished tumor-derived endothelial properties by passage number

Tumor-derived endothelial cells (TEC) and fat capillary-derived endothelial cells (FCEC) were passaged at a split ratio of 1:4. FCEC, open columns; TEC, shaded columns. A: Passaged cells were cultured on the permeation chambers. When the cells were at confluence, the permeability assay was performed. B: Passaged cells were cultured in 96-well microplate. When the cells were at confluence, the leukocyte adhesion assay was performed.

* P<0.001 compared to FCEC

第五節 腫瘍組織内皮細胞のコラーゲン合成と透過性

第二章において、内皮細胞層の物質透過性がコラーゲン合成と密接な関係を有していることを示した。また第三章において腫瘍細胞の産生する液性因子による内皮細胞層の高い透過性構造構築にコラーゲン量の低下が原因となっていることを明らかとした。そこで、初代培養腫瘍組織内皮細胞層が正常組織内皮細胞層に比べ高い透過性を示すことが、コラーゲン量の低下に起因しているかどうか検討を行った。

実験方法

腫瘍組織内皮細胞および正常組織内皮細胞をインターセル上に播種し、4時間後³H]-プロリン添加培地に交換した。コンフルエント時に（播種5日後）、透過実験および、第二章の方法によりコラーゲン量を測定した。

実験結果および考察

腫瘍組織内皮細胞のコラーゲン量は正常組織内皮細胞と比較して、約1/3量であることが判明した（Table 8）。全合成蛋白量に両細胞間に差が認められず、また全蛋白に占めるコラーゲンの割合も正常組織内皮細胞 2.25 ± 0.29 （%）、腫瘍組織内皮細胞 0.80 ± 0.19 （%）と同様に低値を示していることから、腫瘍組織内皮細胞の低いコラーゲン量は、単なる蛋白合成量が低いことに起因するものではなく、コラーゲン量が特異的に低いことを示している。本系においても、低いコラーゲン量が腫瘍内皮細胞の高い透過性構造構築に寄与していると推察された。

Table 8 Permeability and collagen content of rat endothelial cells

Cell	Collagen (X10 ² dpm)	Collagen/Total protein (%)	Non-collagen protein (X10 ² dpm)	Permeability coefficient (X10 ⁻³ cm/h)
FCEC	22.1 ± 3.6	2.25 ± 0.29	181 ± 20	32.8 ± 1.9
TEC	7.5 ± 1.6*	0.80 ± 0.19*	206 ± 16	83.0 ± 17.2*

FCEC: Fat capillary-derived endothelial cell

TEC: Tumor-derived endothelial cell

* P<0.001

第六節 小括

血管内皮細胞機能は、各組織において大きく異なっているにもかかわらず、培養細胞を用いた研究において、組織部位に余り注意を払わず、単離培養の容易な組織であるウシ大動脈やヒト臍帯静脈由来の内皮細胞により研究がなされてきた^{(68), (69)}。しかしながら近年、培養系においても、由来組織や部位により内皮細胞の組織特異的機能発

現がなされていることが、脳を中心にいくつか報告され^{(70), (71)}、その重要性が指摘されつつある。そのなかで、今回、腫瘍組織由来血管内皮細胞の単離・初代培養に成功し、さらに本細胞が*in vivo*における腫瘍組織血管内皮細胞の特性を発現・維持していることを明らかとし、腫瘍血管研究への応用の可能性が強く示唆された。

さて、正常組織の血管内皮細胞、例えば脳血管内皮細胞であれ、肝臓血管内皮細胞であれ、生体において本来備っている内皮細胞であるが、腫瘍血管内皮細胞は本来生体に備っているものではなく、腫瘍という病態において、正常組織の内皮細胞が腫瘍組織へ遊走して行き、そこで増殖・管腔形成することにより新たに形成されたものであることから、腫瘍組織血管内皮細胞たらしめる因子の作用によりはじめてその機能発現がなされるものと考えられる。したがって、それら因子の欠如によりその特性が消失していくことは予想し得るものである。しかしながら、今回単離した腫瘍組織内皮細胞は、腫瘍からの因子が欠如した状態で培養された1継代目においても物質透過性、白血球接着性ともに腫瘍血管の特性を維持しており、その研究への応用に十分な期待がもたれた。

さて腫瘍組織内皮細胞の単離・培養の重要性は、単に腫瘍組織における物質透過機能研究のみならず、腫瘍組織共通の内皮細胞特異抗体の免疫源として応用でき得るところにある。すなわち、正常組織内皮細胞には反応せず、どのような腫瘍であれ、腫瘍組織内皮細胞にのみ共通に、かつ特異的に反応するモノクローナル抗体を本細胞から作製し、これを腫瘍組織への薬物キャリアー分子として利用しようとするものである。基本戦略としては、腫瘍組織内の腫瘍細胞を標的とするのではなく、腫瘍組織内の血管内皮細胞を標的とし、特異的に傷害させようとするものである。腫瘍内皮細胞のみを特異的に叩くことができれば、腫瘍細胞は栄養路を断たれるため腫瘍組織の退縮が導かれることとなる。腫瘍細胞を標的とした場合、緒論において述べたように内皮細胞層が抗体透過の決定的な障壁となるが、内皮細胞を標的とした場合、血中に投与された抗体は直接容易に結合できるため、透過性に関する問題もクリアーでき得る。また、腫瘍細胞に対するモノクローナル抗体を用いた制癌療法の問題点として、腫瘍細胞特異抗原が各種腫瘍細胞で異なっているため、その抗体が反応し得るただ一種の腫瘍にしか使用できないことにもある。しかしながら、腫瘍組織内皮細胞特異抗体であれば、腫瘍が誘導・新生させる内皮細胞は共通に物質透過性が亢進していることから、共通の抗原が発現している可能性が高いと考えられることから、いかなる癌種であれ共通な抗腫瘍効果が期待される。

以上のことから、抗腫瘍内皮細胞特異抗体を用いた癌治療戦略は、将来的に非常に有望な方法であり、その免疫源である腫瘍組織内皮細胞の単離・培養に成功した本研究の意義は非常に大きいと考えている。すでに、抗腫瘍組織内皮細胞特異抗体作製は進めており、ELISAの系において、いくつかの特異性の高いモノクローナル抗体を得ており、現在、組織切片を用いた系での特異性を検討中である。

総括

1) 腫瘍細胞CMによる検討

血管の内腔を一層で覆う内皮細胞は、血中から組織への物質移行の障壁として働いていることから、薬物を用いた癌治療を行うにあたり、腫瘍組織の内皮細胞層物質透過性は、その治療効果を決定付ける重要なものである。そこで薬物による癌治療を有効なものにすべく、腫瘍組織における内皮細胞層物質透過機能に関する研究を行うこととした。しかしながら、腫瘍組織内皮細胞は未だ培養されていないことから、*in vitro* の系で *in vivo* の状態を再構築でき得ると考えられている Conditioned Medium (CM) の系により、腫瘍組織特異的な機能発現が正常組織内皮細胞において誘導されるかを検討した。

腫瘍細胞CMは、正常組織である大動脈由来血管内皮細胞層の透過性を上昇させた。*In vivo* における腫瘍組織部位の血管は正常組織に比べ高い物質透過性を示すことから、腫瘍細胞CMが、正常組織内皮細胞に腫瘍組織特異的な機能発現を誘導したと示唆された。さらに、この上昇作用は異なる部位や種の内皮細胞においても認められ、その普遍性が示された。また、腫瘍細胞CMの透過上昇作用は、血管作動性薬物などによる一過性のものでなく、F-アクチン量の減少を伴わない、長時間持続する全く新しいタイプのものであった。

2) コラーゲンと透過性

腫瘍細胞CMにおいて観察された定常状態における透過性上昇が、どのようなメカニズムにより生じたのかを明らかにすべく、まず、内皮細胞層の定常状態における透過性調節機構の研究を行い、コラーゲンが重要な役割を果たしていることを示した。すなわち、アスコルビン酸は血管内皮細胞のコラーゲン合成を促進させた結果、透過性を抑制させ、コラーゲン合成阻害剤はコラーゲン合成を抑制させ、透過性を上昇させた。また、この透過調節は、コラーゲンそのものが透過障壁となっているのではなく、内皮細胞の細胞間隙構築に作用していることが示唆された。これら知見は、定常状態における内皮細胞層物質透過性を調節している因子をはじめ明らかにしたものであり、今後、血管内皮細胞層透過性研究において非常に重要なものとなることを信じている。

3) 腫瘍細胞CMによる透過上昇とコラーゲン

腫瘍細胞CMによる内皮細胞層透過上昇がコラーゲン量の低下に起因していることを明らかとした。この低下は、コラーゲン合成阻害によるものではなく、コラーゲン分解促進の結果であり、さらにCMが内皮細胞に作用し、内皮細胞のコラーゲン分解促進に起因するものであることが示された。固形腫瘍は非常に盛んに血管新生がなされており、これらは腫瘍細胞が産生する種々の因子により誘導されている。また、血

管新生時に内皮細胞のマトリックスメタロプロテアーゼ活性が上昇していることが知られており、今回得た腫瘍細胞CMによる内皮細胞のコラーゲン分解促進は、これら *in vivo* における生理状態を裏付けるものであり、*in vivo* の現象を反映したものであると考えている。

4) 腫瘍組織由来血管内皮細胞単離・培養

腫瘍組織からの血管内皮細胞初代培養に成功した。また本細胞は正常組織血管内皮細胞に比べ高い物質透過性、低い白血球接着性といった *in vivo* の腫瘍血管の特性を発現・維持していた。近年、血管内皮細胞の部位や組織特異性が注目されつつあるが、初代培養細胞単離に成功し、腫瘍血管の特異性を *in vitro* 培養系において示した本成果は、腫瘍血管内皮細胞研究、ひいては腫瘍血管をターゲットとした癌治療の発展に大きく役立つものと考えている。

結論

血管内皮細胞層の物質透過機能に関する研究の結果、以下の結論を得た。

1. 腫瘍細胞のConditioned Medium (CM) により正常組織由来血管内皮細胞層の物質透過性は上昇した。In vivo における腫瘍組織部位の血管は正常組織に比べ高い物質透過性を示すことから、腫瘍細胞CMが、正常組織内皮細胞に腫瘍組織特異的な機能発現を誘導したと示唆された。
2. 血管内皮細胞層の物質透過性調節にコラーゲンが重要な役割を果していることを明らかとした。すなわち、血管内皮細胞層のコラーゲン量が増加すると透過性は低下し、逆にコラーゲン量が減少すると透過性は上昇する。
3. 腫瘍細胞CMによる内皮細胞層の透過上昇は、CMが内皮細胞に作用し、内皮細胞のコラーゲン分解能を上昇させ、コラーゲンが減少することに起因する。
4. 腫瘍組織由来血管内皮細胞の初代培養に成功した。
5. 腫瘍組織由来内皮細胞は、正常組織内皮細胞に比べ高い物質透過性、低い白血球接着性といったin vivo の腫瘍血管と同様の特性を発現・維持していた。
6. 腫瘍組織内皮細胞においても、低いコラーゲン合成が高い物質透過性構造の構築に寄与している。

以上、腫瘍組織特異的な血管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血管内皮細胞を用い検討し、コラーゲンによる透過調節機能を明らかとした。

謝辞

本研究の遂行、発表にあたり、終始暖かい御指導、御鞭撻を賜りました、大阪大学薬学部教授、真弓忠範先生に深く感謝いたします。

また、終始御指導下さいました、中川晋作講師、久保一義助手、堤康央助手に感謝いたします。

さらに本研究の遂行は、次の多くの方々のご協力のもとなされたものであります。牛大動脈血管内皮細胞の培養法に関して御指導下さいました国立循環器病センター松田武久先生、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を御譲渡して下さいましたクラボウ株式会社、KMT-17腫瘍を御譲渡して下さいました北海道大学武市紀年博士、大学院生として実験に際し御協力いただきました水口裕之、佐伯和彦、池田賢二、Adul Dantakean、榎本博雄氏をはじめとする大阪大学薬学部薬剤学講座の方々に感謝いたします。

参考文献

- 1) Epenetos, A. A., Snook, D., Durbin, H., Johnson, P. M., and Taylor-Papdimitriou, J. *Cancer Res.*, 46, 3183-3191, 1986.
- 2) Dvorak, H. F., Nagy, J. A., and Dvorak, A. M. *Cancer Cells*, 3, 77-85, 1991.
- 3) Bradbury, M. W. B. *Circ. Res.*, 57, 213-222, 1985.
- 4) Milici, A. J., Furie, M. B., and Carley, W. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82, 6181-6185, 1985.
- 5) Nugent, L. J., and Jain, R. K. *Microvasc. Res.*, 28, 270-274, 1984.
- 6) Song, C. W., and Levitt, S. H. *Cancer Res.*, 31, 587-589, 1971.
- 7) O'Connor, S. W., and Bale, W. F. *Cancer Res.*, 44, 3719-3723, 1984.
- 8) Underwood, J. C. E., and Carr, I. *J. Pathol.*, 107, 157-161, 1972.
- 9) Heuser, L. S., and Miller, F. N. *Cancer*, 57, 461-464, 1986.
- 10) Dvorak, H. F., Nagy, J. A., Dvorak, J. T., and Dvorak, A. M. *Am. J. Pathol.*, 133, 95-109, 1988.
- 11) Voyta, J. C., Via, D. P., and Butterfield, C. E. *J. Cell Biol.*, 99, 2034-2040, 1984.
- 12) Hashida, R., Anamizu, C., Yagyu-Mizuno, Y., Ohkuma, S., and Takano, T. *Cell Struct. Funct.*, 11, 343-349, 1986.
- 13) Siflinger-Birnboim, A., Del Vecchio, P. J., Cooper, J. A., Bilumenstock, F. A., Shepard, J. M., and Malik, A. B. *J. Cell. Physiol.*, 132, 111-117, 1987.
- 14) Killackey, J. J. F., Johnson, M. G., and Movat, H. Z. *Am. J. Pathol.*, 122, 50-61, 1986.
- 15) Langeler, E. G., and Van Hinsbergh, V. W. M. *Am. J. Physiol.*, 260, C1052-C1059, 1991.
- 16) Phillips, P. G., Lum, H., Malik, A. B., and Tsan, M. *Am. J. Physiol.*, 257, C562-C567, 1989.
- 17) Rotrosen, D., and Gallin, J. I. *J. Cell Biol.*, 103, 2379-2387, 1986.
- 18) Shasby, D. M., Shasby, S. S., Sullivan, J. M., and Peach, M. J. *Circ. Res.*, 51, 657-661, 1982.
- 19) Phillips, P. G., and Tsan, M. *J. Histochem. Cytochem.*, 36, 551-554, 1988.
- 20) Mizuguchi, H., Fujii, A., Utoguchi, N., Nakagawa, S., and Mayumi, T. *Microvasc. Res.*, submitted.
- 21) Mizuguchi, H., Hashioka, Y., Fujii, A., Utoguchi, N., Kubo, K., Nakagawa, S., Baba, A., and Mayumi, T. *Brain Res.*, 651, 155-159, 1994.
- 22) Senger, D. M., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., and Dvorak, H. F. *Science*, 219, 983-985, 1983.
- 23) Keck, P. J., Hauser, S. D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., and Connolly, D. T. *Science*, 246, 1309-1312, 1989.
- 24) Brock, T. A., Dvorak, H. F., and Senger, D. R. *Am. J. Pathol.*, 138, 213-221, 1991.
- 25) Keller, R., Pratt, B. M., Furthmayr, H., and Madri, J. A. *Am. J. Pathol.*, 128, 299-306, 1987.
- 26) Merwin, J. R., Anderson, J. M., Kocher, O., Van Itallie, C. M., and Madri, J. A. *J. Cell. Physiol.*, 142, 117-128, 1990.
- 27) Delvos, U., Gajdusek, C., Sage, H., Harker, L. A., and Schwartz, S. M. *Lab. Invest.*,

- 46, 61-72, 1982.
- 28) Prockop, D. J., Berg, R. A., Kivirikko, K. I., and Uitto, J. *Biochemistry of Collagen*. G. N. Ramachandran, and A. H. Reddi, eds. Plenum Press, New York, pp. 163-273, 1976.
- 29) Hata, R., and Senoo, H. *J. Cell. Physiol.*, 138, 8-16, 1989.
- 30) Slater, T. E., Sawyer, B., and Strauli, U. *Biochem. Biophys. Acta*, 77, 383-393, 1963.
- 31) Tajima, S., and Pinell, S. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 106, 632-637, 1982.
- 32) Chojkier, M., Houghlum, K., Solis-Herruzo, J., and Brenner, D. A. *J. Biol. Chem.*, 264, 16957-16962, 1989.
- 33) Geesin, J. C., Hendricks, L. J., Gordon, J. S., and Berg, R. A. *Arch. Biochem. Biophys.*, 289, 6-11, 1991.
- 34) Peterkofsky, B., and Diegelmann, R. *Biochemistry*, 10, 988-994, 1971.
- 35) Sasaki, T., Majamaa, K., and Uitto, J. *J. Biol. Chem.*, 262, 9397-9403, 1987.
- 36) Partridge, C. A., Jeffrey, J. J., and Malik, A. B. *Am. J. Physiol.*, 265, L438-L447, 1993.
- 37) Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Moosker, M. S., and Goodenough, D. A. *J. Cell Biol.*, 103, 755-766.
- 38) Gumbiner, B., Lowenkopf, T., and Apatira, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88, 3460-3464, 1991.
- 39) Citi, S., Sabanay, H., Jakes, R., Geiger, B., and Kendrick-Jones, J. *Nature*, 333, 272-276, 1988.
- 40) Zhong, Y., Saitoh, T., Minase, T., Sawada, N., Enomoto, K., and Mori, M. *J. Cell Biol.*, 120, 477-483, 1993.
- 41) Audus, K. L., Bartel, R. L., Hidalgo, I. J., and Borchardt, R. T. *Pharm. Res.*, 7, 435-451, 1990.
- 42) Morodomi, T., Ogata, Y., Sasaguri, Y., Morimatsu, M., and Nagase, H. *Biochem. J.*, 285, 603-611, 1992.
- 43) Herron, G. S., Banda, M. J., Clark, E. J., and Werb, Z. *J. Biol. Chem.*, 261, 2814-2818, 1986.
- 44) Unemori, E. N., Bouhana, K. S., and Werb, Z. *J. Biol. Chem.*, 265, 445-451, 1990.
- 45) Folkman, J. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 4-6, 1991.
- 46) Mahadevan, V. *Eur. J. Cancer*, 27, 679-680, 1991.
- 47) Klagsbrun, M., Sasse, J., Sullivan, R., and Smith, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83, 2448-2452, 1986.
- 48) Montesano, R., Vassalli, J. D., Baird, A., Guillemin, R., and Orci, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83, 7297-7301, 1986.
- 49) Frater-Shroder, M., Risau, W., Hallmann, R., and Gautschi, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 5277-5281, 1987.
- 50) Roberts, A. B., Sporn, M. B., Assoian, R. K., Smith, J. M., Roche, N. S., Wakefield, L. M., Heine, U. I., Liotta, L. A., Falanga, V., Kehrl, J. H., and Fauci, A. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83, 4167-4171, 1986.
- 51) Ward, J. D., Hadfield, M. G., Becker, D. P., and Lovings, E. T. *Cancer*, 34, 1982-1991, 1974.
- 52) Ohtani, H., and Sasano, N. *Jpn. J. Cancer Res.*, 80, 360-365, 1989.

- 53) Ohtani, H., and Sasano, N. *J. Electron Microsc.*, 36, 204-212, 1987.
- 54) Bowman, P. D., Betz, A. L., and Goldstein, G. W. *In Vitro*, 18, 626-632, 1982.
- 55) Marks, R. M., Czerniecki, M., and Penny, R. *In Vitro Cell. Develop. Biol.*, 21, 627-635, 1985.
- 56) Fawcett, J., Harris, A. L., and Bicknell, R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174, 903-908, 1991.
- 57) Ryan, U. S., Ryan, J. W., Whitaker, C., and Chiu, A. *Tissue and Cell*, 8, 125-145, 1976.
- 58) Grant, D. S., Tashiro, K., Segui-Real, B., Yamada, Y., Martin, G. R., and Kleinman, H. K. *Cell*, 58, 933-943, 1989.
- 59) Cole, F. O., Fan, T. P. D., and Lewis, G. P. *Cell Biol. Int. Rep.*, 10, 399-405, 1986.
- 60) Kasai, M., Yamaguchi, Y., Hosokawa, M., Mizushima, Y., and Kobayashi, H. *J. Natl. Cancer Inst.*, 67, 417-422, 1981.
- 61) Friedland, J., and Silverstein, E. *Am. J. Clin. Pathol.*, 66, 416-424, 1976.
- 62) Diglio, C. A., Grammas, P., Giacomelli, F., and Wiener, J. *Tissue Cell*, 20, 477-492, 1988.
- 63) McGuire, P. G., and Orkin, R. W. *Lab. Invest.*, 57, 94-105, 1987.
- 64) Madri, J. A., and Williams, S. K. *J. Cell Biol.*, 97, 153-165, 1983.
- 65) Wu, N. Z., Kiltzman, B., Dodge, R., and Dewhirst, M. W. *Cancer Res.*, 52, 4265-4268, 1992.
- 66) Luscinskas, F. W., Brock, A. F., Arnaout, M. A., and Gimbrone Jr., M. A. *J. Immunol.*, 142, 2257-2263, 1989.
- 67) Pauli, B. U., and Lee, C. *Lab. Invest.*, 58, 379-397, 1989.
- 68) Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., and Minick, C. R. *J. Clin. Invest.*, 52, 2745-2756, 1973.
- 69) King, G. L., and Johnson, S. M. *Science*, 227, 1583-1586, 1985.
- 70) Meyer, J., Mischeck, U., Veyhl, M., Henzel, K., and Galla, H. *Brain Res.*, 514, 305-309, 1990.
- 71) Shah, M. V., Audus, K. L., and Borchardt, R. T. *Pharm. Res.*, 6, 624-627, 1989.

