

# 培養ヒト血管内皮細胞における 細胞密度依存性アポトーシス誘導

長谷 真<sup>1)</sup> 荒木 聡彦<sup>2)</sup>

Cell Density-Dependent Initiation of Apoptosis in Human Umbilical Vascular  
Endothelial Cells

Makoto HASE<sup>1)</sup> Satohiko ARAKI<sup>2)</sup>

## 【要 旨】

ヒト臍帯血管内皮細胞の栄養因子除去によるプログラム細胞死（アポトーシス）において、細胞密度がその動態に影響を与えていることを示した。本研究では細胞密度とアポトーシスの関連性を明らかにするために様々な細胞密度での統合的な解析を試みた。その結果、アポトーシス誘導開始に至るまでの時間が細胞密度依存性を示した。これまで筆者らは2つの異なる栄養因子（線維芽細胞増殖因子（FGF）経路ならびにウシ胎児血清（FBS）経路）除去によるアポトーシス経路を明らかにしているが<sup>1)</sup>、それら2つの経路においても細胞密度依存性を示した。さらにアデニル酸シクラーゼのアクチベーターである IBMX が高密度培養時のアポトーシス誘導の開始を遅延させうることを確認した。

## 【キーワード】

栄養因子除去 細胞密度 血管内皮細胞 プログラム細胞死

## 緒言

プログラム細胞死（あるいはアポトーシス）は胚発生時や組織分化、免疫系などで働く重要な生体制御機構である<sup>2)-5)</sup>。アポトーシスシグナルに関しては生化学、薬理学、分子生物学等から様々なアプローチが行われ、多くのアポトーシス促進因子、抑制因子が報告されているが、各種細胞での特異性などから未だ完全には

その機構解明はされていない。

正常な細胞増殖の調節は増殖能と増殖阻害のバランスによって調節されている。細胞は老化や細胞密度、強力な増殖因子要求性、足場依存性等によって増殖のネガティブな制御を行っている。正常細胞の細胞死に関してもこれらの機構による制御が関係しているものと示唆されている。アポトーシス細胞死の細胞密度依存性に関しても複数の報告があるが<sup>6)-9)</sup>、その詳細で再現性のある結論は導き出せていない。

<sup>1)</sup> 別府大学短期大学部

<sup>2)</sup> 名古屋大学理学研究科

生体内の器官として血管は様々な役割を担っている<sup>10)~12)</sup>。特に血管新生については、発生における脈管系・循環器系形成や、成人期の性周期関連の血管形成といった正常個体において重要な意義を持つ。血流と接する内皮細胞は特に、血液凝固、血管収縮、血管透過性の調節を担っている。さらに腫瘍血管形成や創傷治癒などの病的条件下においても血管新生、特に血管内皮系の反応は数多くの情報をもたらしている。このように内皮細胞の増殖、分化に関する制御機構を分子レベルで明らかにすることは生物学的にも、臨床、栄養学的見地からも重要となる。

我々は、血管変性の調節機構を明らかにするためにヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて解析を行ってきた<sup>1), 13)~15)</sup>。その過程で、HUVEC に細胞死を誘導する要因として、生存因子 (survival factor = SFs) 除去 (特に FGF や FBS 除去による細胞死誘導経路) や出血性へび毒等を見出しており、これらはさらにアポトーシスとしての特性を顕著に示している。今回、HUVEC へのアポトーシス細胞死誘導への感受性に影響を与える新しい要因としての細胞密度について報告する。

## 材料と方法

### (1) 材料

3-isobutylxanthine (IBMX) は、Rescarch Biochemicals International (Boston, Massachusetts, U.S.A.) より購入した。線維芽細胞増殖因子 (FGF) はウシ脳から Lobb の方法<sup>16)</sup>により抽出した。ヘパリンはシグマ社より購入。MCDB-104は極東製薬から購入した。ウシ胎児血清は GIBCO (ニューヨーク) から、バナジン酸・トリプシンは和光純薬 (大阪) から購入した。ヒト臍帯内皮細胞は Jaffe の方法<sup>17)</sup>により臍帯より分離し、培養し使用。細胞は第八抗原関連因子抗体により血管内皮細胞である事を確認した。

### (2) 方法

#### 1) 細胞培養

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の培養はコラーゲンコートをしたプラスチック培養皿 (直径 6 cm) にて行った。培養液は MCDB-104 を使用し、通常培養では 10% FBS、70ng/ml FGF、100 $\mu$ g/ml のヘパリンを添加し、5% CO<sub>2</sub>、37°C 条件下で実験に使用した。また全ての実験には集団倍加レベル (population doubling level) 20~30 の細胞を使用した。

#### 2) 生存率の計測

HUVEC はコンフルエントに達した状態 (高密度培養)、あるいは一つの培養皿上でコンフルエントになった細胞を 4 つの培養皿に分けて継代した低密度状態細胞を実験に用いた。細胞は通常培養液をカルシウム、マグネシウム無添加リン酸バッファー (PBS-) で洗浄後、FGF、FBS 無添加あるいは添加培養液に交換し、各実験に使用する薬剤を添加、所定期間培養後、PBS- で洗浄し培養皿に付着している細胞 (生細胞) ならびに培養皿から脱落し浮遊している (アポトーシス死を起こしている) 細胞の数を解析した。

バナジン酸ならびに IBMX は PBS-、dimethylsulfoxide (DMSO) それぞれに、100mM、15mM のストックソリューションを作製し使用時の最終濃度が 1% 以下になるように調節して使用した。(1% の PBS- と DMSO の培養液への添加が HUVEC の増殖やアポトーシス誘導へ影響を与えない事を確認している。)

アポトーシス死を起こした HUVEC は培養皿から剥離し浮遊状態になるのでそれらの細胞をコールターカウンターで 2 時間毎に計測した。細胞密度はトリプシンにて生細胞 (接着細胞) を剥がし細胞数を計測し算出した。アッセイは 3 サンプル以上を 3 回づつ計測し平均値をとった。又、PDL など培養条件による細胞状態の差異を最小にするために高・低密度における同一条件の実験は同一継代時の細胞を並行して使用し行っている。

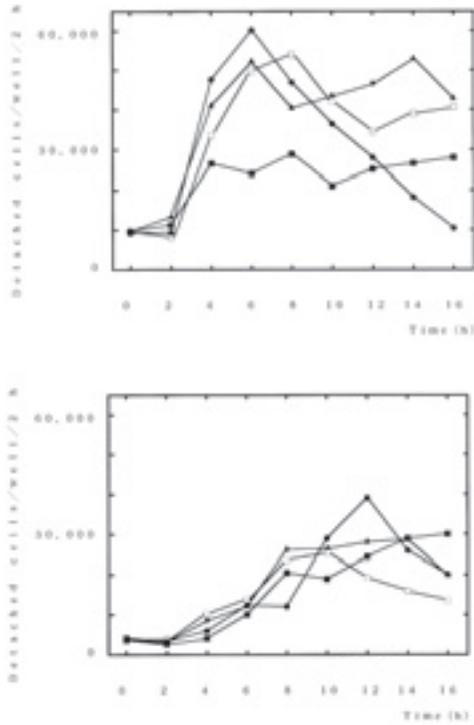


図.1 A B 異なる細胞密度における細胞死の時間経過  
 FGF ならびに血清除去後の細胞死率は培養皿からの剥離細胞数によって計算した。細胞を新鮮な FGF ならびに血清無添加の培養液に交換した時点をも 0 時間とし、培養を行った。2 時間毎に培養液を交換し、培養液中の浮遊細胞数を計測した。計測開始 2 時間後以降、浮遊細胞が見られ始めた。A) (上段) コンフルエント状態 (高密度条件) での培養条件における時間経過。●は  $3.3 \times 10^4$  細胞/cm<sup>2</sup>、▲は  $4.1 \times 10^4$  細胞/cm<sup>2</sup>、□は  $5.4 \times 10^4$  細胞/cm<sup>2</sup>、■は  $2.7 \times 10^4$  細胞/cm<sup>2</sup>。B) (下段) サブコンフルエント状態 (低密度条件) 培養での時間経過。●は  $1.7 \times 10^4$  細胞/cm<sup>2</sup>、▲は  $1.8 \times 10^4$  細胞/cm<sup>2</sup>、■は  $2.0 \times 10^4$  細胞/cm<sup>2</sup>、□は  $2.5 \times 10^4$  細胞/cm<sup>2</sup>。

結果

(1) 内皮細胞のアポトーシス死に対する細胞密度依存性

HUVEC は MCDB-104 を使用した通常培養から、血清 (FBS) と、FGF を除去 (生存因子 = SFs 除去) すると 48 時間でほとんどすべての細胞がアポトーシス死を起こす<sup>1)</sup>。これまでの長期の観察では細胞密度によるアポトーシスへの影響は解析できなかった。しかし今回、SFs 除去によるアポトーシス細胞死の時

間経過の詳細を調べることで、実験開始時の細胞密度がアポトーシス誘導に影響を与えることを見出した (図 1)。アポトーシス死を起こした細胞である浮遊細胞数は高密度状態の場合、SFs 除去後、2~6 時間の間にある程度と同調性を持って急激に増加していた。一方、低密度での培養の場合、SFs 除去刺激によるアポトーシス細胞数の増加率は、緩やかで経時的にも同期は見られなかった。このように細胞が死にいたる確率が最も大きい割合の時間、言い換えれば、アポトーシスの開始に必要な時間が実験開始前の細胞密度によって影響を受けていることが確認された。SFs 除去によるアポトーシス刺

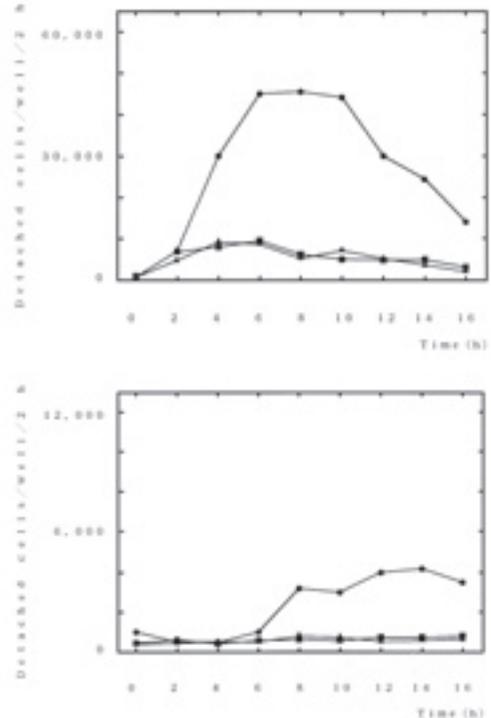


図.2 A B 様々な細胞密度における細胞死への FGF の影響

図 1 と同一の方法にて細胞死の割合を計測した。A) (上段) コンフルエント条件 ( $3.6 \times 10^4$  細胞/cm<sup>2</sup>) において血清と FGF を除去 (●)、血清は除去したが  $14 \text{ ng/mL LFGF}$  を添加 (▲)、■は血清は除去し、 $70 \text{ ng/mL LFGF}$  を添加した。B) (下段) サブコンフルエント条件 ( $8.7 \times 10^3$  細胞/cm<sup>2</sup>) において血清と FGF を除去 (●)、血清は除去し、 $14 \text{ ng/mL LFGF}$  を添加 (▲)、■は血清は除去し、 $70 \text{ ng/mL LFGF}$  を添加した。

激から4時間後の細胞の死亡率は高密度条件下で0.03~0.06、低密度条件下で0.008~0.017であり、その差異はおよそ2~6倍であった。

(2) アポトーシス開始における生存因子の影響

2つの異なる栄養因子によるアポトーシス阻害経路がHUVECで作動している<sup>1)</sup>。一つのシグナル伝達経路は、FGF、あるいはフォルボールエステルを起点とする経路であり、もう一方は血清やバナジン酸によって誘導される経路である。さらにこの2つの経路は協働して作用する事が分かっている。それ故、我々はこれ

らのシグナル伝達経路と細胞密度の変化との関係について観察した。その結果、2つの経路ともに細胞密度によるアポトーシス開始時間への直接的影響は認められなかった(図2-図4)。

高密度、低密度どちらの細胞条件下でも(図2)、アポトーシスを誘導するSFs除去培養液へのFGFの添加はアポトーシス死細胞数を減少させた。しかしFGF除去によりアポトーシス死の開始時間は細胞密度に依存した。通常の5分の1量のFGF(14ng/mL)存在下でも、高密度条件、低密度条件それぞれでアポトーシスの開始をほとんど完全に阻害していた。この結果は、高密度細胞培養時に、多量の細胞によ

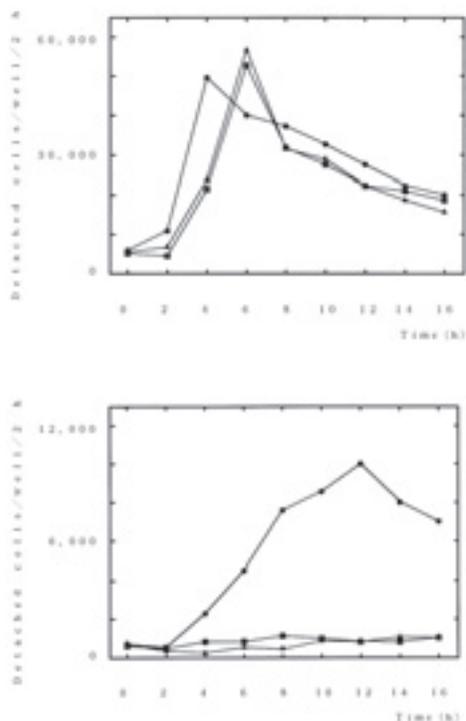


図. 3A B 異なる細胞密度における細胞死への血清の影響

図1と同一の方法にて細胞死の割合を計測。A) (上段) コンフルエント条件 ( $4.7 \times 10^4$ 細胞/cm<sup>2</sup>) において血清と FGF を除去 (●)、FGF は除去したが3%血清 (FBS) を添加 (▲)、FGF は除去し10%FBS を添加した (■)。B) (下段) サブ-コンフルエント条件 ( $1.1 \times 10^4$ 細胞/cm<sup>2</sup>) において血清と FGF を除去 (●)、FGF 除去・3%血清 (FBS) を添加 (▲)、■は FGF を除去し10%FBS を添加した。

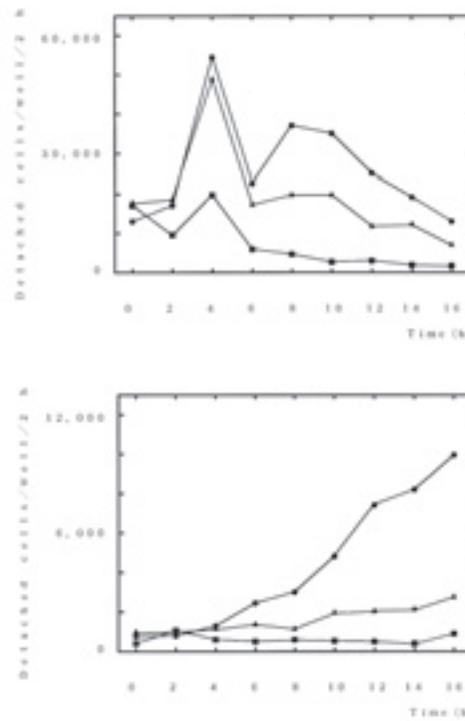


図. 4A B 異なる細胞密度における細胞死へのバナジン酸の影響

図1と同一の方法にて細胞死の割合を算出。A) (上段) コンフルエント条件 ( $3.6 \times 10^4$ 細胞/cm<sup>2</sup>) において血清と FGF を除去 (●)、血清と FGF を除去し10μMのバナジン酸を添加したもの (▲)、血清と FGF を除去し100μMのバナジン酸を添加したもの (■)。B) (下段) サブ-コンフルエント条件 ( $9.6 \times 10^3$ 細胞/cm<sup>2</sup>) において血清と FGF を除去 (●)、血清と FGF を除去し10μMのバナジン酸を添加したもの (▲)、血清と FGF を除去し100μMのバナジン酸を添加したもの (■)。

り生存因子が急激に消費されることによって短時間にアポトーシスが起きているのではないという事を示唆している。図3では、様々な細胞密度状態においての血清 (FBS) のアポトーシス開始時間についての影響について調べている。高密度細胞状態で、FGF ならびに FBS を添加していない培養液による培養 (=コントロール) と比較すると、FBS を添加するとややアポトーシスの開始が遅れた。ただこの遅延は誤差範囲であり、事実、より高濃度の FBS (30%あるいは50%、データ未掲載) を添加してもより多くの変動はなかった。低密度条件では通常より少量の FBS (3%) によって細胞死の開始が阻害されていた。

次にチロシンリン酸化酵素の阻害剤であるであるバナジン酸の様々な密度条件でのアポトーシス反応への影響を調べた (図4)。アポトーシス死の割合はバナジン酸の濃度に依存して減少していた。しかし総体的なアポトーシス死の時間経過はどの条件においてもほぼ同様の結果を示した (図4)。バナジン酸はアポトーシス死亡率には影響を与えたが、細胞死開始時間には何らかの作用を及ぼすことはなかった。

### (3) IBMX のアポトーシス開始への影響

上記の結果より、我々は既知の2つの栄養因子によるアポトーシス阻害経路以外の他の細胞内調節因子が HUVEC においてアポトーシス開始のタイミングを調節しているものと類推した。図5は、高密度条件下での、サイクリック AMP-ホスホジエステラーゼの阻害剤である IBMX (150  $\mu$ M) の有無によってアポトーシス死の開始時間が変化するかを調べている。IBMX 存在下での細胞死の経時変化は、低密度条件でのコントロールサンプルと非常に類似したパターンをとった (図2b、3b、4bを参照)。アポトーシス死の開始時間は右にシフトし、アポトーシスの経過に同期性はみられなかった。

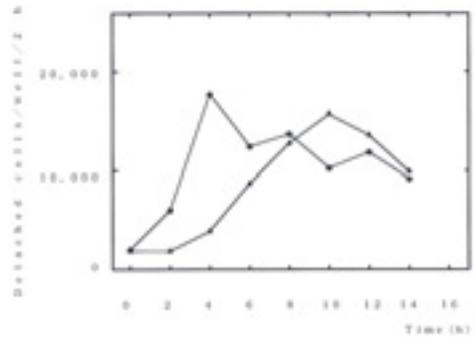


図5 細胞死に対する IBMX の影響

図1と同一の方法にて細胞死の割合を算出。コントロール条件 ( $3.1 \times 10^4$  細胞/cm<sup>2</sup>) において血清と FGF を除去 (●)、あるいは血清と FGF を除去し 30mM の IBMX を添加したもの (▲)。

## 考察

アポトーシス細胞死における細胞密度との相関関係は何例か報告されている<sup>6)-9)</sup>。例えば、コンディションメディウムの実験からバラクリン/オートクリン機構の関与<sup>8), 9)</sup>や、栄養因子や増殖因子除去条件<sup>7)</sup>での細胞密度感受性のアポトーシスが報告されている。我々の予備的実験では、HUVEC におけるアポトーシスへのコンディションメディウムの影響は観察されていない。それ故、我々は今回の細胞密度によるアポトーシス開始タイミングへの影響は、細胞外からのシグナル伝達系ではなく、むしろ細胞内環境 (例えば蛋白質リン酸化や細胞内情報伝達系の変化) によるものと考えている。また HUVEC でのアポトーシスにおいて、我々の調べている範囲では、細胞密度依存性アポトーシスは細胞周期という細胞内環境には依存していないと考えられる。DNA 合成酵素阻害剤である N-メチルマレイミドのメチオニン・グルタミン欠如培地への添加や細胞周期を S 期で停止させるアフィディコリンは、ともにアポトーシスの反応に影響を及ぼさなかった (データ未掲載)。これらの結果は HUVEC でのアポトーシスにおいて、細胞周期はその細胞死の開始に関与していないと示唆された。

我々はこれまで HUVEC におけるアポトー

シス死を阻害する様々な細胞内シグナル伝達経路を報告してきた<sup>1)</sup>。しかしながらそれらの情報経路にはアポトーシス細胞死の開始のタイミングに影響を与えるものは見出せなかった。特にチロシンフォスファターゼの阻害剤であるバナジン酸に関しては、Swiss 3 T 3細胞を使用した研究<sup>18)</sup>で、高密度時の細胞増殖抑制時にチロシンフォスファターゼ活性が上昇している事が報告されていたので、高密度状態への添加では、アポトーシス開始時間の(すなわち低密度条件での経緯と同じような)遅延を予期していたが、開始時間への作用は見られなかった。これらの結果から、アポトーシスの開始時期と細胞密度に関わるシグナル経路は、これまでのシグナル経路と異なる未知のものである可能性が示唆された。

cAMPはcAMP依存性蛋白質キナーゼを活性化する事が知られている。また様々な細胞種において多様な細胞内情報伝達系を担っており<sup>19) - 22)</sup>、さらに細胞密度の変動によって細胞内のcAMP濃度の変化が生じる事も報告されている。MC 3 T 3細胞においてコンフルエントに達するまで細胞内cAMP濃度が緩やかに上昇し、コンフルエントに達すると下降する事が明らかになっている<sup>23)</sup>。この報告と、コンフルエント時の細胞内cAMPの濃度の低下をIBMXによって上昇させることによりサブコンフルエント(=低密度状態)時に近い状況になっていると推察される我々のデータ(図5)とはよく相関しており、cAMPがアポトーシスの開始調節因子である可能性が示唆された。さらにcAMPのアナログであり、細胞内cAMP濃度を上昇させうる、8-bromo-cAMP(sodium salt)を高密度条件下で添加(500  $\mu$ M)するとIBMX使用時と同様にアポトーシス開始時期の遅れが見られた。

我々のこれまでの実験の結果からアポトーシス開始シグナルは、生理的条件、細胞間相互作用、受容体介在シグナルなどの様々な情報伝達系の関与が示唆されてきている。その中でも特に、我々は以前より蛋白質リン酸化、脱リン酸化のバランスが最終的なアポトーシス誘導の調

節を担っていると考えているが、今回新たにそのシグナル伝達物質候補としてcAMPを介したメカニズムを提示した。

## 引用文献

1. Hase, M., Araki, S., Ktti, K., and Hayashi, H (1994) Classification of signals for blocking apoptosis in vascular endothelial. *J.Biochem.* 116, 905-909
2. Wyllic, A. H., Kerr, J. F. R., and Curric, A. R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306
3. Murphy, K.M., Heimbergr, A.B., and Loh, D. Y (1990) Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4 + CD8 + TcR1 thymocytes *in vivo* *Science* 250, 1720-1723
4. Saunders, J. W. Jr. (1966) Death in embryonic systems. *Science*, 154, 604-612
5. Raff, M. C. (1992) Social controls of cell survival and cell death. *Nature* 356, 397-400
6. Maeda, S., Kimura, H., Koda, N., Lin, K. H., and Saito, T. (1993) Cell density-dependent DNA fragmentation and its suppression by heparin in primary culture of adult rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 195, 270-275
7. Kluck, R. M., Chapman, D.E., Egan, M., McDougall, C. A., Hamon, B. V., Moss, D. J., Kerr, J.F.R., and Halliday, J. W. (1993) Spontaneous apoptosis in NS-1 myeloma cultures: Effects of cell density, conditioned medium and acid pH. *Immunobiol.* 188, 124-133
8. Moulton, B. C. (1994) Transforming growth factor- $\beta$  Stimulates endometrial stromal apoptosis *in vitro*. *Endocrinology* 134, 1055-1060
9. Mathicu, C., Jozan, S., Mazars, R., Comc, M. G., Moisand, A., and Valette, A (1995) Density-dependent induction of apoptosis by transforming growth factor- $\mu$ l in a human ovarian carcinoma cell line. *Exp. cell. Res.* 216, 13-20
10. Jaffe, E. A. (1984) *Biology of Endothelial Cells*, pp. 1-456, Martinus Ntthoff Publishers, Boston
11. Wyllic, A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-557
12. O'Shea, J. D., Nightingale, M. G., and Chamley, W. A. (1977) Changes in small blood vessels during cyclical luteal regression in sheep. *Biol. Reprod.* 17, 162-177

13. Araki, S., Shimada, Y., Ktti, K., and Hayashi, H. (1990) Apoptosis of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor deprivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 1194 – 1200
14. Araki S, Simada Y, Kaji K, Hayashi H. (1990) Role of protein kinase C in the inhibition by fibroblast growth factor of apoptosis in serum-depleted endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172, 1081 – 1085
15. Araki, S., Ishida, T., Yamamoto, T., Kaji, K., and Hayashi, H. (1993) Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venom in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 148 – 153
16. Lobb, R. R., and Fett, J. W. (1984) Purification of two distinct growth factors from bovine neural tissue by heparin affinity chromatography. *Biochemistry* 23, 6295 – 6296
17. Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., and Minick, R. C. (1973) Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 52, 2745 – 2756.
18. Pallen, C. J., and Tong, P. H. (1991) Elevation of membrane tyrosine phosphatase activity in density-dependent growth-arrested fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6996 – 7000
19. Kram, R., Mamont, P., and Tomkins, G. M. (1973) Pleiotypic control by adenosine 3'5'-cyclic monophosphate: a model for growth control in animal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 1432 – 1436
20. Wang, L., Salter, M. W., MacDonald, J. F. (1991) Regulation of kainate receptors by cAMP – dependent protein kinase and phosphatases. *Science* 253, 1132 – 1135
21. Sung, C., Arleth, A. J., Storer, B., and Feuerstein, G. Z. (1991) Modulation of U937 cell adhesion to vascular endothelial cells by cyclic AMP. *Life Sci.* 49, 375 – 382
22. Berridge, M. V., Tan, A. S., Hilton, C. J. (1993) Cyclic adenosine monophosphate promotes cell survival and retards apoptosis in a factor – dependent bone marrow-derived cell line. *Exp. Hematology* 21, 269 – 276
23. Ito, N., Yamazaki, H., Nakazaki, M., Miyahara, T., Kozuka, H., and Sudo, H. (1987) Response of osteoblastic clonal cell line (MC 3 T 3 – E1) to [Asu<sup>1-7</sup>] eel Calcitonin at a specific cell density or differentiation stage. *Calcif. Tissue. Int.* 40, 200 – 205
24. Brautigam, D. L., and Pinault, F. M. (1991) Activation of membrane protein- tyrosine phosphatase involving cAMP- and Ca<sup>2+</sup> / phospholipid-dependent protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6696 – 6700