

1. 研究課題名：培養系における正常ヒト細胞の遺伝子および蛋白質の発現  
血管平滑筋細胞の増殖・分化にともなう蛋白質発現の変化
2. 研究機関：倉敷紡績株式会社 技術研究所 (yamamoto@lab.kurabo.co.jp)
3. 研究者：山本良平
4. 研究協力者：庭田 悟、柳瀬 浩、元野 満、北廣恒司 (倉敷紡績株式会社・技術研究所)  
Gary D. Shipley, Ann K. Shipley (Cascade Biologics, Inc., Portland, OR)  
妹尾久雄、村田善晴 (名古屋大学・環境医学研究所)  
加藤兼房 (愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所)
5. 研究期間：平成8年～10年

## 6. 要約

正常ヒト血管平滑筋細胞における  $\alpha$ -アクチンおよびストレス関連タンパク p20 の発現を調べた。

血管平滑筋細胞を我々の開発した増殖用培地および分化用培地で培養し、それぞれについて  $\alpha$ -アクチンの抗体染色を行った。その結果、増殖用培地で増殖中の細胞では  $\alpha$ -アクチンの染色は認められなかったが、分化用培地で培養した細胞は生体内におけるのと同様に  $\alpha$ -アクチンを発現していることが確認できた。

次いで、培養細胞では発現しないか、もしくは極めて低レベルの発現しか見られないストレス関連タンパク p20 の発現を調べた。上記と同じ条件で培養し、細胞抽出液について酵素免疫測定法により p20 を定量した。大動脈および肺動脈の血管平滑筋細胞について調べたところ、p20 は増殖用培地で増殖中の細胞ではほとんど検出されなかった。しかし、増殖用培地でほぼ100%コンフレントの状態になると低レベルながら p20 の発現が認められた。更に、分化用培地では生体組織と同レベルの p20 が検出された。

以上の結果より、分化用培地で培養した正常ヒト血管平滑筋細胞はインビボのモデル系として使用できることが示唆された。

## 7. 研究目的

培養系における正常ヒト細胞について遺伝子・蛋白質の発現を調べることにより、in vitro 生体モデルの材料としての可能性を把握する。具体的には、正常ヒト血管平滑筋細胞について  $\alpha$ -アクチンおよびストレス関連タンパク p20 の発現、および培養条件によるそれらの挙動を調べる。

## 8. 材料および方法

### 8-1. 細胞

正常ヒト大動脈血管平滑筋細胞(HASMC、倉敷紡績：Cascade Biologics)および正常ヒト肺動脈血管平滑筋細胞(HPASMC、倉敷紡績-Cascade Biologics)は凍結細胞(3次培養細胞)を解凍し、次に述べる培地で継代培養した。

## 8-2. 培地

基礎培地として HuMedia-SB2 (倉敷紡績) を用いた。Humedia-SB2 は A.Knedler(A.K.Shipley)らによって開発された正常ヒト血管内皮細胞用培地 MCDB 131 (2) を改良し、正常ヒト血管平滑筋細胞に最適化されたものである。増殖培地としてはこの基礎培地に FBS5%、rEGF 0.5ng/ml、rbFGF2ng/ml およびインスリン 5 µg/ml を添加したものをを用いた。細胞分化用には上記増殖因子の代わりに FBS1%とヘパリンを添加したものをを用いた (表 1)。

表 1 正常ヒト血管平滑筋細胞の増殖用培地および分化用培地

成分	増殖用培地	分化用培地
基礎培地	改変 MCDB131 *	改変 MCDB131 *
FBS	5.0 %	1.0 %
rEGF	0.5 ng/ml	-
rbFGF	2.0 ng/ml	-
インスリン	5.0 µg/ml	-
ヘパリン	-	30 µg/ml

\* HuMedia-SB2

## 8-3. 培養

細胞培養用 T25 フラスコに 2500 個/cm<sup>2</sup>または 4000 個/cm<sup>2</sup>の細胞を接種し、37 ° C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。増殖培地では 1 日ごとに培地交換を行った。

## 8-4. 抗体による染色

-アクチンモノクローナル抗体 (Boehringer Mannheim) およびファクター モノクローナル抗体 (Dako Co.) と Dako 社酵素抗体法染色キット DAKO LSAB Kit を用いて行った。p20 (3、4) については、加藤らの方法で作製した精製抗体 (ウサギ) を用い、第二抗体として蛍光標識抗体を用いた。

## 8-5. 酵素免疫測定法

p20 の定量は抗体固相化ポリスチレンビースト - D -ガラクトシダーゼ標識抗体を用いるサンドイッチ酵素免疫測定法によって定量した (3)。

## 9. 結果

### 9-1. 細胞の増殖

3 次凍結細胞を解凍し、表 1 の増殖用培地にて 4 次および 5 次の継代培養を行った。T25 フラスコに 2500 個/cm<sup>2</sup>の細胞を接種した場合、6 日後にはほぼコンフレントの状態になり、7 日間の培養で約 1 x 10<sup>5</sup> 個/cm<sup>2</sup>の細胞が得られ細胞の増殖は極めて良好であった。

増殖状態の細胞の形態は繊維芽細胞様の細長い紡錘形を示した(図1A)。この増殖細胞について -アクチンモノクローナル抗体およびファクター モノクローナル抗体を用いた染色を試みたが、いずれの抗体でも染色されなかった。

### 9-2. 細胞の分化

上記と同じ条件で4次培養を行い、これをT25フラスコに4000個/cm<sup>2</sup>接種し5次培養を行った。培養開始時は増殖用培地を用い、培養1日後に表1に示す分化用培地に交換した。分化用培地では細胞の増殖はほぼ停止し、培養3日目頃には細胞は大きく広がった形態に変化した(図1B)。

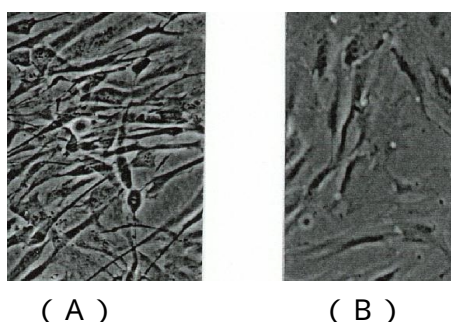


図1 血管平滑筋細胞

-アクチンモノクローナル抗体による染色を行ったところ、形態変化とともに染色されるようになり、培養6日目頃にはかなり強い染色が見られた。なお、比較の為にを行ったファクターモノクローナル抗体による染色では全く染色されなかった。

ヘパリンは血管平滑筋細胞の分化において重要な因子である(5)。そこで、ヘパリン存在下で、血管平滑筋細胞の増殖にとって重要な因子であるFBSの濃度を増殖用培地と同じ5%に増加させた分化用培地(基礎培地 + FBS5%、ヘパリン 30 µg/ml)を調製し、これを用いて上と同じ条件で培養を行った。この結果、細胞の形態変化および -アクチンモノクローナル抗体による染色が確認された。ただし、低血清培地に比べて染色性は弱かった。また、FBS1%の場合に比べ若干の増殖が認められ、細胞の広がりもやや少なかった。

### 9-3. ストレス関連蛋白 p20 の発現

大動脈平滑筋細胞について p20 の染色を行ったところ、増殖用培地では極めて低い発現しか認められなかったが、分化用培地で2日以上培養すると強く染色された。

分化用培地で培養した大動脈および肺動脈の平滑筋細胞より蛋白質を抽出し、p20 を定量した。その結果、いずれの細胞でも抽出蛋白質 1mg 当たり 100ng 以上の p20 が検出された。別途、大動脈および肺動脈から直接抽出した試料について定量したところ、抽出蛋白 1mg 当たりの p20 は 200ng から 300ng となり、細胞からの抽出液の場合とほぼ同じレベルであった。

## 10. 考察

*in vitro* の研究において細胞は生体モデルとして非常に有用な材料である。一般的に、細胞としては、適切な管理さえ行えば同じ性質の細胞が無限に得られる株化細胞が用いられる。しかし、細胞を用いる実験が *in vivo* のモデルとして実施されることを考えると、生体組織における性質をより多く保持している初代培養細胞を用いるのが好ましいことは言うまでもない。従来、研究者が初代培養細胞を必要とする場合は、組織の確保、細胞の分離、培養条件の設定等すべて自ら行う必要があり、多大の労力を要した。これに対して、最近ヒト細胞を中心に初代培養細胞およびその最適培地の供給体制が整い(6、7、8)、誰でも簡単に初代培養細胞を使用できるようになってきた。

ところで、これらの初代培養細胞はある程度の細胞数を確保するために数継代の培養が行われる。従って、現在入手できる初代培養細胞(正常細胞)用の最適培地は細胞の増殖に適した組成になっている。一方、生体組織では、細胞は増殖を停止し分化した状態で機能している場合が多く、研究目的によっては増殖培地では期待される結果が得られないこともある。即ち、初代培養細胞を用いる研究において増殖と分化を制御することは極めて重要と考えられる。血管平滑筋細胞については、今回の結果に見られるように、培地組成を工夫することにより増殖・分化の制御が可能である。ただし、我々は形態および  $\alpha$ -アクチンという限定された蛋白質の発現のみで細胞の分化を判定しているだけであり、今後、更に詳細な解析が必要である。しかしながら、少なくとも通常の株化細胞では十分な発現が見られなかった p20 がこの培養系で発現していることを考えると、本培養系は正常細胞の特質をある程度引き出しているものと考えてよいであろう。

## 11. 今後の展開

今後は、血管平滑筋細胞について p20 以外の蛋白質の発現についても解析して行く。また、mRNA レベルでの解析も行う。

細胞の集合状態、細胞と細胞の接触が細胞の機能に大きな影響を与えるというデータが多くの研究者によって発表されている(9、10)。我々が現在行っている培養法は主に単層培養であり、血管平滑筋細胞についても血管組織内での細胞の集合状態とは明らかに異なっている。将来、血管平滑筋細胞の三次元培養、更には血管内皮細胞との共存培養についても検討したい。

いずれにしても、最初に述べたように、細胞を単に増やして使用するのではなく、如何に *in vivo* に近づけるかということが益々重要になることは間違いない。我々は現在、血管平滑筋細胞以外に、血管内皮細胞、表皮角化細胞、メラニン細胞などの培養法、培地の検討を行っているが、これらについても細胞の機能、分化という側面からの検討を進めたい。

## 12. 参考文献

- (1) 柳瀬浩、平尾滋章、元野満、山本良平、竹下哲史、加藤兼房、渡邊正己：組織培養研究 16, 46 (1997)
- (2) Knedler, A.(Shipley, A.K.) and Ham, R. G.: *In Vitro Cell. & Develop. Biol.* 23, 481-

491 (1987)

- (3) Kato, K., Goto, S., Inaguma, Y., Hasegawa, K., Morishita, R. and Asano, T.:J.Biol.Chem. 269, 15302-15309 (1994)
- (4) Inaguma, Y., Hasegawa, K., Kato, K. and Nishida, Y.:Gene 178, 145-150 (1996)
- (5) Fager, G., Hansson, G., Gown, A.M., Larson, D.M., Skalli, O. and Bondjers, G.:In Vitro Cellular Develop. Biol.25, 511-520 (1989)
- (6) Torishima, H., Arakawa, H., Matsui, S. and Watanabe, M.:AATEX 1,20-26 (1990)
- (7) Torishima, H., Yamamoto, R. and Watanabe, M.:AATEX 3, 29-36 (1995)
- (8) Yazawa, H., Iida-Kubota, E. and Honda, K.:Japan J. Pharmacol. 62,339-343 (1993)
- (9) Hubbell, J.A.:Biotechnology 13, 565-576 (1995)
- (10) Koide, N.:Exp. Cell Res. 186, 227-235 (1990)

### 13 . 成果発表

#### 13 - 1 . 原著論文

- (1) 元野満、山本良平、G.D.Shipley, A.K.Shipley : 培地組成の制御による血管平滑筋細胞の分化。組織培養工学 24, 167-169 (1998)

#### 13 - 2 . 総説など なし

#### 13 - 3 . 国際学会発表 なし

#### 13 - 4 . 国内学会発表

- (1) 元野 満、山本良平、G.D.Shipley, A.K.Shipley : 培養条件の制御による正常ヒト血管平滑筋細胞の分化、日本動物細胞工学会 1996 年大会、平成 8 年 7 月 4 日 - 7 月 5 日、東京 .
- (2) 山本良平 : 正常細胞を用いた生体モデルの開発と応用、第 4 回ケラチン研究会、平成 8 年 1 2 月 6 日、大阪 .
- (3) 柳瀬 浩、平尾滋章、元野 満、山本良平、竹下哲史、加藤兼房、渡邊正己 : ラット肝細胞を用いた凍結ストレスの検討、日本組織培養学会平成 9 年大会、平成 9 年 5 月 2 2 日 - 5 月 2 3 日、横浜 .
- (4) 庭田 悟、元野 満、山本良平、G.D.Shipley, A.K.Shipley, 加藤兼房 : 正常ヒト血管平滑筋細胞の分化培地におけるストレスタンパクの誘導。日本動物実験代替法学会第 1 1 回大会、平成 9 年 1 1 月 2 6 日 - 1 1 月 2 7 日、東京 .

#### 13 - 5 . 新聞など なし

#### 13 - 6 . 特許 なし

14 .

(1) Expression of genes and proteins on normal human cells in vitro

Expression of proteins on normal human vascular smooth muscle cells in growth phase and in differentiation phase

(2) Technical Research Laboratory, Kurabo Industries Ltd.

(3) Ryohei Yamamoto

(4) Satoru Niwata, Hiroshi Yanase, Michiru Genno, Koji Kitahiro (Department of Biochemistry, Technical Research Laboratory, Kurabo Industries Ltd.)

Gary D. Shipley, Ann K. Shipley (Cascade Biologics, Inc., OR)

Hisao Seo, Yoshiharu Murata (The Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University)

Kanefusa Kato (Institute of Developmental Research, Aichi Prefectural Colony)

(5) 1996 – 1998

(6) Abstract

We studied the expression of  $\alpha$ -actin and p20, a member of the small heat-shock protein family, on normal human vascular smooth muscle cells.

The expression of  $\alpha$ -actin was examined on the vascular smooth muscle cells cultured in the growth medium or in differentiation medium, which we developed for the cells, by antibody-staining method. The cells growing in the growth medium were not stained. In the differentiation medium, the cells had a high expression of  $\alpha$ -actin.

Then, we examined the expression of p20, which was not or little expressed on usual cultured cell strains, by an enzyme immunoassay. The cells growing in the growth medium were not expressed p20, although there were cells that had a low p20 expression when the cells became confluent. However, the cells cultured in the differentiation medium had a high expression of p20 as well as in the tissue.

Normal human vascular cells cultured in the differentiation medium is expected to be a good model of *in vivo*.