



# Blood-brain barrier formation of grafted human umbilical vein endothelial cells in athymic mouse brain

秋山, 英之

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2115

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002115>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	あき　やま　ひで　ゆき 秋　山　英　之	（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第1258号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成12年3月31日	
学位論文題目	Blood-brain barrier formation of grafted human umbilical vein endothelial cells in athymic mouse brain （ヌードマウス脳内移植後のヒト臍帯静脈血管内皮細胞による脳血管関門形成）	
審査委員	主査 教授 玉 木 紀 彦 教授 岡 村 均                  教授 尾 原 秀 史	

## 論文内容の要旨

### はじめに

神経組織片を脳内移植した場合移植片内ではドナー由来と宿主由来とのモザイク状の血管新生が見られ、これらには脳血液関門が形成されることが報告されている。脳組織内の血管内皮細胞が脳血液関門を形成する能力はそれらの細胞固有のものではなく周囲の神経組織により誘導されと考えられている。アストロサイトは tight junction の形成に関し最も重要な役割を担っていると考えられているが、血管内皮細胞自体の働きに関してはまだほとんど解明されていない。脳組織以外から得られた血管内皮細胞を脳内へ移植した報告はまだなく、それらの脳内での血管形成に関する知見はほとんどない。本研究ではマーカー遺伝子を導入した臍帯静脈血管内皮細胞をヌードマウス脳内へ移植し移植部位での血管新生及び脳血液関門の形成について免疫組織学的に検討を行った。

### 方法

緑色蛍光を発する green fluorescent protein (GFP) をコードする遺伝子である pEGFPE-N1 をマーカー遺伝子として、電気穿孔法にてヒト臍帯静脈血管内皮細胞に導入した。G418を含む培養液にて選別を行い、pEGFPE-N1 が導入された細胞のみの subclones を得た。これらの細胞浮遊液 ( $1 \times 10^6$  cells /  $2 \mu$ l) を定位的にヌードマウス線条体へ移植した。移植後4週間で3つのグループに分けて組織学的検索を行った。免疫染色を目的とした第1のグループ (n=6) では0.1MPBSにて灌流後4% parahoraldheyde にて20分間灌流し、同溶液にて一日間固定した。移植片内外の血流状態の検討を目的とした第2のグループ (n=6) では血管内の血球を保存する目的で灌流せずに直接10% parahoraldheyde にて7日間固定した。第3のグループ (n=6) では脳血液関門の形成について検討を行う目的で20% Evans Blue/PBS をヌードマウス大腿静脈より0.2ml 静注し30分後に灌流固定を行った。vibratome により50 $\mu$ m 厚の組織切片を作成し、まず蛍光顕微鏡、Nissl 染色にて移植片を観察した。第3のグループでは血管内の赤血球に存在する endogenous peroxydase に反応する diaminobenzidine (DAB) にて処理し管腔内の赤血球の有無について検討した。免疫染色はラットのグリア細胞に特異的に反応する

anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP), 脳血液関門を有する脳血管内皮に特徴的とされる glucose transporter-1 (GLUT-1) を用いて行い, 宿主アストロサイトと管腔形成したヒト臍帯静脈血管内皮細胞との関係及び脳血液関門の形成について検討した。

## 結果

### 1. 移植細胞の宿主脳実質への統合

蛍光顕微鏡, Nissl 染色による観察ではヒト臍帯静脈血管内皮細胞は密な細胞集合体として宿主脳実質より明瞭に区別でき, また境界部では最大500 $\mu$ m まで移植細胞が宿主内へ遊走しているのが観察され, 移植片は宿主に良く統合されていると考えられた。

### 2. 移植片内外での血管形成

移植片辺縁部では宿主脳血管とは明らかに異なる多くの管腔形成が見られその直径は5-20 $\mu$ m であった。また宿主から移植片内へ延びる血管も存在した。移植片中心部では非常に高い細胞密度のため管腔形成は見られなかった。DBA による染色ではそれらの管腔内に赤血球の存在が示され, 新たに移植細胞によって形成された血管内に宿主の血流が存在することが示された。Evans Blue をヌードマウス大腿静脈より静注した組織の切片でも新生管腔内に Evans Blue の存在が認められ宿主の血流を有することが示された。

### 3. 脳血液関門の形成

Evans Blue をヌードマウス大腿静脈より静注した組織の切片では, 脳血液関門の存在しない脈絡叢では血管外への色素の漏出が見られたが, 宿主脳血管及び移植細胞により形成された血管からの色素漏出は見られず脳血液関門の形成が強く示唆された。また移植片より宿主脳内へ遊走した細胞により形成された血管の60-70%に Evans Blue が存在しており宿主からの血流を有することが示された。GFAP による免疫染色では移植細胞により形成された管腔の約20%においてその外周を裏打ちするように宿主アストロサイトが接着することが示され, 形態学的にも脳血液関門の形成が示唆された。これらはすべて比較的大きな血管で多層のヒト臍帯静脈血管内皮細胞により壁が形成されている血管であった。GLUT-1 による免疫染色では3-5%の新生管腔で陽性であり, GFAP 陽性のものと同様に比較的大きな血管に限られていた。

## 考察

血管内皮細胞は遺伝子導入のドナーとして以前より注目されており, 脳内では不死化された遺伝子導入血管内皮を直接移植する手法で, 主に脳腫瘍の治療の可能性という観点で研究されてきた。過去の報告では前眼房にアストロサイトを移植する実験において脳組織以外の血管内皮細胞が脳血液関門を獲得する上でアストロサイトが重要な役割を持っていることが示されており, また最近では *in vitro* でアストロサイトとの培養によりヒト臍帯静脈血管内皮細胞が脳血液関門を形成することが示されている。今回の研究により *in vivo* での毛細血管レベルにおいてヒト臍帯静脈血管内皮細胞が血管形成のみならず脳血液関門をも形成し得ることが初めて示された。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞は比較的手やすくこれまでも研究目的で広く用いられていることより, 遺伝子導入のドナーとしての今後の臨床応用の可能性を今回の研究により明らかにすることができた。

## 結論

ヌードマウス脳内への移植においてヒト臍帯静脈血管内皮細胞は宿主脳実質に非常によく統合され多数の新生血管が形成された。これらの新生血管は宿主からの血流を有し、さらに形態学的、機能的にも脳血液関門を有することが示され、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞は遺伝子導入のドナー細胞として非常に有用であると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

### はじめに

脳以外の組織及び臓器から採取された血管内皮細胞を脳内へ移植した報告は未だなく、それらの脳内での血管形成に関する知見はほとんどない。本研究ではマーカー遺伝子を導入したヒト臍帯静脈血管内皮細胞をヌードマウス脳内へ移植し血管及び脳血液関門の形成について免疫組織学的に検討を行った。

### 方法

緑色蛍光を発する green fluorescent protein (GFP) をコードする遺伝子である pEGFPE-N1 をマーカー遺伝子として、電気穿孔法にてヒト臍帯静脈血管内皮細胞に導入した。pEGFPE-N1 が導入された細胞のみの subclones を得た。これらの細胞浮遊液 ( $1 \times 10^6$  cells /  $2 \mu\text{l}$ ) を定位的にヌードマウス線条体へ移植した。移植後4週間で3つのグループに分けて組織学的検索を行った。

第1のグループ：(免疫染色を目的とした) ( $n=6$ ) 0.1M PBS にて灌流後4% parahoroldehyde にて20分間灌流し、同溶液にて一日間固定した。

第2のグループ：(移植片内外の血流状態の検討を目的とした) ( $n=6$ ) 血管内の血球を保存する目的で灌流せずに直接10% parahoroldehyde にて7日間固定した。

第3のグループ：(脳血液関門の形成について検討を行う目的とした) ( $n=6$ ) 20% Evans Blue/PBS を0.2ml 静注し30分後に灌流固定を行った。vibratome により50micro 厚の組織切片を作成し、まず蛍光顕微鏡、Nissl 染色にて移植片を観察した。第3のグループでは血管内の赤血球に存在する endogenous peroxydase に反応する diaminobenzidine (DAB) にて処理し管腔内の赤血球の有無について検討した。

免疫染色はラットのグリア細胞に特異的に反応する anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP)、脳血液関門を有する脳血管内皮に特徴的とされる glucose transporter-1 (GLUT-1) を用いて行い、宿主アストロサイトと管腔形成したヒト臍帯静脈血管内皮細胞との関係及び脳血液関門の形成について検討した。

### 結果

1. 移植細胞の宿主脳実質への統合：蛍光顕微鏡、Nissl 染色による観察ではヒト臍帯静脈血管内皮細胞は密な細胞集合体として宿主脳実質より明瞭に区別でき、また境界部では最大500 $\mu\text{m}$  まで移植細胞が宿主内へ遊走しているのが観察され、移植片は宿主に良く統合されていると考えられた。

2. 移植片内外での血管形成：移植片辺縁部では宿主脳血管とは明らかに異なる多くの管腔形成が見られその直径は5-20 $\mu\text{m}$  であった。また宿主から移植片内へ延びる血管も存在した。移植片中心部では非常に高い細胞密度のため管腔形成は見られなかった。DAB による染色ではそれらの管腔内に

赤血球の存在が示され、新たに移植細胞によって形成された血管内に宿主の血流が存在することが示された。Evans Blue を静注した組織の切片でも新生管腔内に Evans Blue の存在が認められ宿主の血流を有することが示された。

3. 脳血液関門の形成：Evans Blue を静注した組織の切片では、脳血液関門の存在しない脈絡叢では血管外への色素の漏出が見られたが、宿主脳血管及び移植細胞により形成された血管からの色素漏出は見られず脳血液関門の形成が強く示唆された。また移植片より宿主脳内へ遊走した細胞により形成された血管の60-70%に Evans Blue が存在しており宿主からの血流を有することが示された。GFAP による免疫染色では移植細胞により形成された管腔の約20%においてその外周を裏打ちするように宿主アストロサイトが接着することが示され、形態学的にも脳血液関門の形成が示唆された。

#### 考察と結論

今回の研究により *in vivo* での毛細血管レベルにおいてヒト臍帯静脈血管内皮細胞が血管形成のみならず脳血液関門をも形成し得ることが初めて示された。

本研究はマーカー遺伝子を導入したヒト臍帯静脈血管内皮細胞をヌードマウス脳内、線条体体内に移植し、血管及び脳血流関門の形成について免疫組織学的及び微細形態学的に研究したものである。その結果は従来ほとんど行われなかった。脳以外の組織及び臓器の血管内皮細胞の脳内移植について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。