慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	In vitroモデルを用いた血管新生に関する研究
Sub Title	Studies on angiogenesis using in vitro models
Author	上田, 晃然(Ueda, Akinori) 古賀, 理基(Koga, Masaki) 池田, 満里子(Ikeda, Mariko) 工藤, 奨(Kudo, Susumu) 谷下, 一夫(Tanishita, Kazuo)
Publisher	慶應義塾大学日吉紀要刊行委員会
Publication year	2005
Jtitle	慶應義塾大学日吉紀要. 自然科学 No.37 (2005.) ,p.1- 12
JaLC DOI	
Abstract	Angiogenesis is the formation of new microvessels by endothelialcell migration and proliferation from preexisting vessels. This process is essentialfor numerous physiological events such as embryonic development, ovulation,and wound healing. Angiogenesis is also beneficial in tissue recovery byreperfusion of ischemic tissue but is maladaptive for arteriosclerosis, diabetes andtumor growth. It is therefore important to be able to control angiogenesis. In vitroexperiments have significantly advanced our understanding of angiogenesis.Many kinds of in vitro angiogenesis models have been designed to study theeffects of angiogenesis regulators (e.g. growth factors) . We have assessed theeffect of shear stress and extracellular matrix on angiogenesis using several invitro models. Our results reveal that these factors affect properties of endothelialcells in angiogenesis and each model has a future prospect relating to thedirection of each specific study.
Notes	
Genre	Departmental Bulletin Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN10079809-20050000-0001

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Hiyoshi Review of Natural Science
Keio University No. 37, 1-13 (2005)

In vitro モデルを用いた血管新生に関する研究

植田晃然*・古賀理基*・池田満里子**・工藤奨***・谷下一夫*

Studies on Angiogenesis Using *in vitro* Models

Akinori UEDA*, Masaki KOGA*, Mariko IKEDA**, Susumu KUDO*** and Kazuo TANISHITA*

Summary —— Angiogenesis is the formation of new microvessels by endothelial cell migration and proliferation from preexisting vessels. This process is essential for numerous physiological events such as embryonic development, ovulation, and wound healing. Angiogenesis is also beneficial in tissue recovery by reperfusion of ischemic tissue but is maladaptive for arteriosclerosis, diabetes and tumor growth. It is therefore important to be able to control angiogenesis. *In vitro* experiments have significantly advanced our understanding of angiogenesis. Many kinds of *in vitro* angiogenesis models have been designed to study the effects of angiogenesis regulators (*e.g.* growth factors). We have assessed the effect of shear stress and extracellular matrix on angiogenesis using several *in vitro* models. Our results reveal that these factors affect properties of endothelial cells in angiogenesis and each model has a future prospect relating to the direction of each specific study.

Key words: angiogenesis, network formation, *in vitro* model, shear stress, extracellular matrix

*慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻（〒223-8522　横浜市港北区日吉3-14-1）：School of Fundamental Science and Technology, Keio Univ., 3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama, 223-8522, Japan.〔Received Jun. 30, 2004〕
**慶應義塾大学先端科学技術支援センター（〒223-8522　横浜市港北区日吉3-14-1）：Keio Leading-Edge Laboratory of Science and Technology, Keio Univ., 3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama, 223-8522, Japan.
***芝浦工業大学機械工学科（〒108-8548　東京都港区芝浦3-9-14）：Department of Mechanical Engineering, Shibaura Institute of Technology, 3-9-14 Shibaura, Minato-ku, Tokyo 108-8548, Japan.

1．序文

血管新生（angiogenesis）とは既存の血管から新しい血管ネットワークが生じる現象である。この現象は多くの疾患において重要な役割を果たしている。例えば，癌細胞は自ら血管新生を誘導することで，栄養分の補給路を確保して大きくなることから「腫瘍の成長は血管新生依存性である」とされており，また，糖尿病の患者の網膜では血管新生が生じることにより糖尿病性合併症である網膜症が発症，進展することが知られている。このため，従来からその調節因子や機構についての研究が行われてきた。最近では，虚血性疾患に対しての治療的血管新生が注目されるようになり研究が盛んになっている。さらに，臓器再生の際に，新生血管が形成されるという現象は必要不可欠であり再生医療の現場においても必須の課題であると言える。

この現象を理解するためには，発生過程における血管形成について知る必要がある。発生過程の血管形成は脈管形成（もしくは血管発生：vasculogenesis）と血管新生の２つの段階からなるとされている。胚発生の初期には中胚葉の誘導に伴い，内皮細胞と血球細胞に分化可能な幹細胞（血球血管芽細胞）が出現し，血島と呼ばれる細胞集団を形成する。血島の中で，外周付近の細胞は内皮細胞に分化し管腔形成した後，互いに融合し原始血管叢を形成する。一方，内側の細胞は血球に分化する。このような，血管内皮前駆細胞からの血管系の発生の過程を脈管形成という。こうして生み出された既存の血管の内皮細胞は，血管新生の刺激に反応して，基底膜や細胞外基質の融解・増殖・遊走により，発芽や嵌入を行い，新しい血管が作られる。この過程を血管新生と呼んでいる。つづいて血管内に血液が流れ始めると，それに応じて新生血管は分岐・融合・剪定などを繰り返し，全身に血管網を形成する。形成された血管は，当初内皮細胞のみで構成されるが，やがて壁細胞（大血管では平滑筋細胞，毛細血管ではペリサイト）によって囲まれ，成熟血管となる。

成体における新生血管の形成は壁細胞が内皮細胞から離脱する過程から始まる。壁細胞が離脱した内皮細胞は，促進因子の刺激に反応してプロテアーゼを産生する。それによって血管基底膜や周囲の細胞外基質を消化し，刺激の方向へ向かって遊走・増殖・管腔形成を行うことにより新生血管ネットワークを形成する。最後に壁細胞に囲まれることで，遊走･増殖が停止し，成熟した血管が構築される。従来，これらの現象は周囲にある既存血管の内皮細胞によって行われるという血管新生のみの過程と考えられてきたが，Asaharaらによって血管内皮前駆細胞（Endothelial Progenitor Cell: EPC）が発見され[2]，既存血管からの内皮細胞の増殖・遊走だけではなく，血管内皮増殖因子などの刺激によって骨髄中のEPCが血液によって目的部位まで到達し，その場所で分化・増殖・遊走するという脈管形成も新生血管形成に重要な役割を果たすことが分かってきている。

このような血管新生という現象には，さまざまな要因が影響を与えていることが知られている。特に血管新生の促進因子や抑制因子となる調節因子に関しては，従来から数多くの研究結果が報告されてきた[5)6)]。血管新生は促進因子と抑制因子のバランスによって調節されていて，

通常の成体では抑制因子が優位のため血管新生は抑制されている。このほかにも新生部位の酸素濃度[1)]や局所的な血流[9)]，細胞外基質の種類[10)]などが血管新生に影響を与えているという報告がなされている。

これらの研究結果を生かして，臨床においては血管新生抑制因子を用いた癌治療が従来から行われている。また，最近では，細胞増殖因子や前駆細胞を用いた血管新生療法などが試みられているが，疾患によっては病気を悪化させる危険性もある。そのため，血管新生療法を行う場合には，数多くの影響因子の中から血管新生の促進および抑制を制御する因子を把握し，血管の形成を時間的・空間的に制御しなければならない。

再生医療の観点からは，細胞が集まって細胞集合体（臓器）として有効に働くために，全体の調和の取れた統合性を実現することが必要になってくる。そのためには，細胞間コミュニケーションが不可欠であり，物質・情報の伝達を請け負う血管ネットワークが最重要になる。

以上のように新生血管ネットワークの制御は今後の医療において大変重要な課題である。そのためには*in vivo*の研究と並行して，*in vitro*モデルを用いて増殖因子や血流の影響などさまざまな血管新生の周辺環境を実現し，その影響を探ることが不可欠となってくる。細胞外基質や増殖因子を調整すると，*in vitro*においても内皮細胞は生体内と同様に管腔を持った血管様のネットワークを形成する。この性質を利用して，従来からいくつもの*in vitro*モデルが報告され，それらを用いた実験が行われてきた[13)]。本稿では任意のネットワーク形成制御を目指して我々が行ってきた*in vitro*モデルを用いた実験を紹介する。そして，そこから得られた知見と，これらのモデルの今後の可能性について言及した。

2．材料と方法

2.1　細胞培養

ウシ大動脈内皮細胞（BAEC，Cell Systems）およびウシ肺毛細血管内皮細胞（BPMEC，Cell Systems）を10% FBS，１%抗生物質，15 mM HEPESを含んだDulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM，GIBCO）で培養した。サブコンフルエントになったところで継代を行い，実験には６－９代目の細胞を用いた。

2.2　マトリゲルモデルの作製

EHS細胞が産生する基底膜類似の細胞外基質であるマトリゲル（Becton Dickinson）を24 multiple well plateに300 μl/wellの割合でコーティングした。37℃，1時間でゲル化させた後，2.0×10^5 cells/wellのBAECを播種した（図１A）。

2.3　コラーゲンサンドイッチモデルの作製

ラット尾より採取・作製した５mg/mlのType Ⅰコラーゲン，５倍濃縮DMEM，0.34 N NaOHを混合した。混合液を１ml/35 mm dishの割合で培養皿に流しこんだ後，37℃，30分

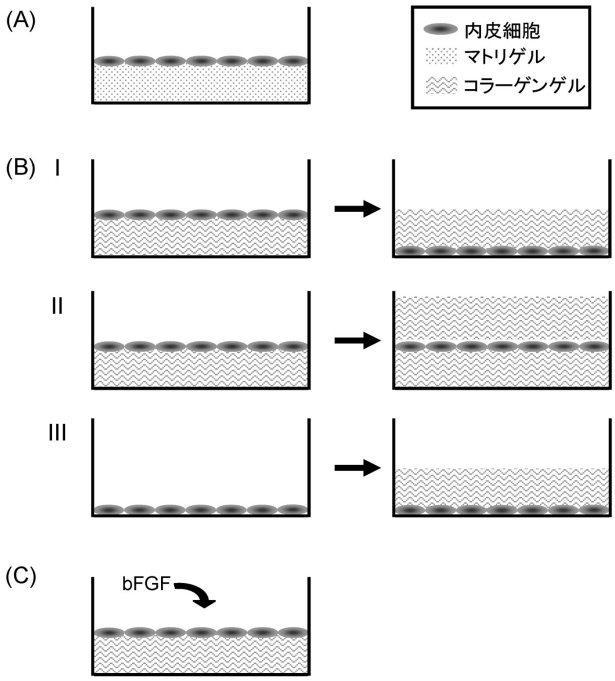

図１　実験モデルの模式図
(A)マトリゲルモデル，(B)コラーゲンサンドイッチ，(C)３次元モデルの模式図。

でゲル化させた。Collagenを用いたモデルはこの方法でゲル化させたものを用い，5.0×10^5 cells/35 mm dishのBAECを播種した。

モデルはⅠ：ゲル上にBAECを播種したものを裏返す，Ⅱ：ゲル上に播種したBAECをゲルで覆う，Ⅲ：培養皿上に播種したBAECをゲルで覆うの３つのタイプを作製した（図１B)。

2.4　３次元モデルの作製

3.0 mg/mlのブタ腱由来Type Ⅰコラーゲン（新田ゼラチン），５倍濃縮DMEM，0.1 N NaOHを８：１：１の割合で混合した。これを35 mmのガラスベースディッシュの底部にある窪みに流し込み，37℃で30分間ゲル化させた。その上に4.0×10^5個のBAECもしくはBPMECを播種した。72時間後にコンフルエントになったところで，培養液に30 ng/mlの割合で塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）を添加した（図１C)。

2.5　タイムラプス顕微鏡による観察

ネットワークの形成過程や細胞の遊走のような細胞の経時的な変化を調べるために，タイムラプス装置（Roper Scientific）を備えた位相差顕微鏡で観察を行った。

2.6　電子顕微鏡による観察

３次元的なモデルの垂直方向の様子を観察するために電子顕微鏡による観察を行った。ネットワーク形成後の３次元モデルを2.5%グルタールアルデヒドで固定した後，エポン包埋を行った。ミクロトームを用いて作製した切片を，透過型電子顕微鏡（JEM-100S，日本電子）により観察した。

2.7　共焦点レーザ走査型顕微鏡による観察

ネットワーク形成後の３次元モデルに25μMのCellTracker Green BODIPY（Molecular Probes）を37℃で45分間取り込ませた。無血清培地で２回洗浄した後，共焦点レーザ顕微鏡（MRC 600, BioRad）で撮影した。深さ方向５μmおきに蛍光観察してモデルの３次元的なネットワークの様子を観察した。

2.8　せん断応力の負荷

生体内において血流が負荷されている状態を模擬するため，血管新生３次元モデルに平行平板流路を用いて定常流によるせん断応力を負荷した。灌流液には30 ng/ml bFGF入りの培養液を用い，約0.3 Paのせん断応力が負荷された。

３．結果

3.1　マトリゲルモデルの観察

マトリゲル上に播種された内皮細胞は12時間ほどで，ネットワーク状の構造をとり始め（図２A), 24時間後には広い範囲において２次元的なネットワークが完成した(図２B)。ネットワーク構造の形態は，架橋部位に非常に細長く伸長した細胞が存在し，接点には細胞が凝集したような構造であった。その後，経時的な観察を行ったところ，ネットワークの網目構造が密から粗になってゆき，60時間ほど経つとネットワークの架橋部位が崩壊していくところが多く見られた（図２C)。

ネットワークが形成するまでの過程を位相差顕微鏡でタイムラプス観察したところ，マトリゲル上に接着した細胞は非常に活発な遊走・伸長を繰り返してして６時間内に近くの細胞同士で結合した。その後も同様の運動を繰り返すことで，離れたところにある細胞同士も結び付いて，広範囲に及ぶネットワーク状の形態をとることが分かった（図３)。

3.2　コラーゲンサンドイッチモデルの観察

コラーゲンゲルの上に内皮細胞を播種した場合，通常の培養皿の底面における培養と同様に細胞は増殖し，コンフルエントになった（図４A)。この細胞をゲルごと反転させて，ゲルと培養皿表面の間に細胞が挟まる状態にしたところ（図１B–I)，内皮細胞の形態は敷石状から伸長したものに変化し，５日後に図４Bのようなネットワーク状の構造を形成した。

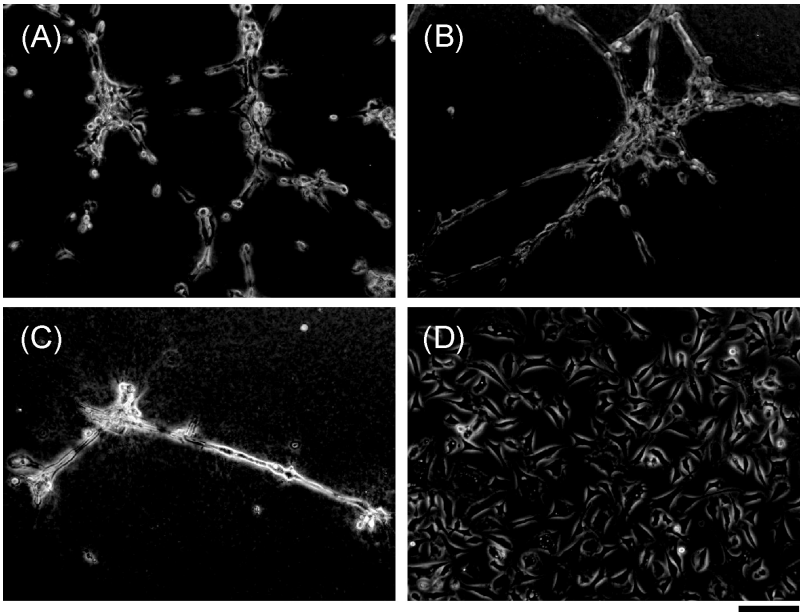

図２　マトリゲルモデルの経時的変化
BAECをマトリゲル上に播種後(A)12時間，(B)24時間，(C)60時間の様子。(D)通常の培養皿上に播種後12時間の内皮細胞。Bar scale，100μm。

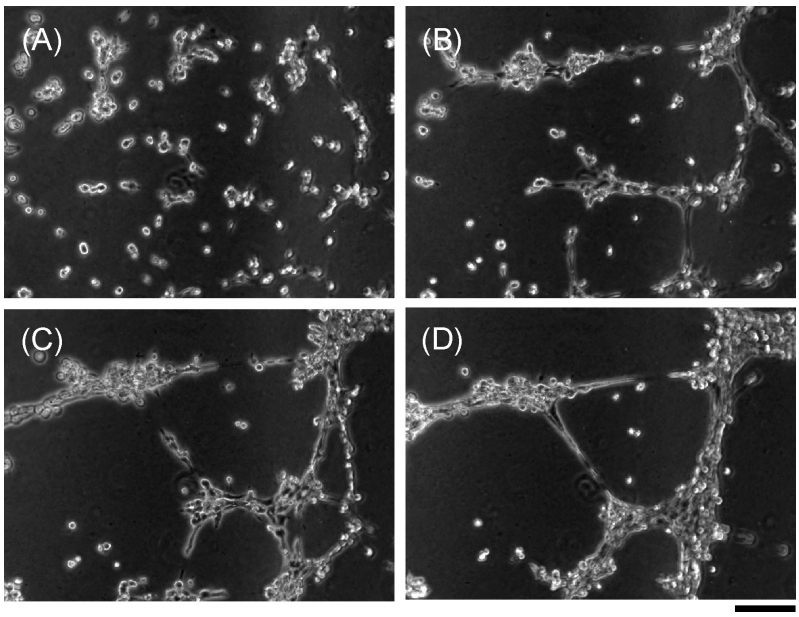

図３　マトリゲルモデルにおけるネットワーク形成過程
ネットワークの形成過程をタイムラプス観察した。マトリゲル上に播種後(A) 3 時間，(B) 6 時間，(C) 9 時間，(D)12時間。Bar scale，100μm。

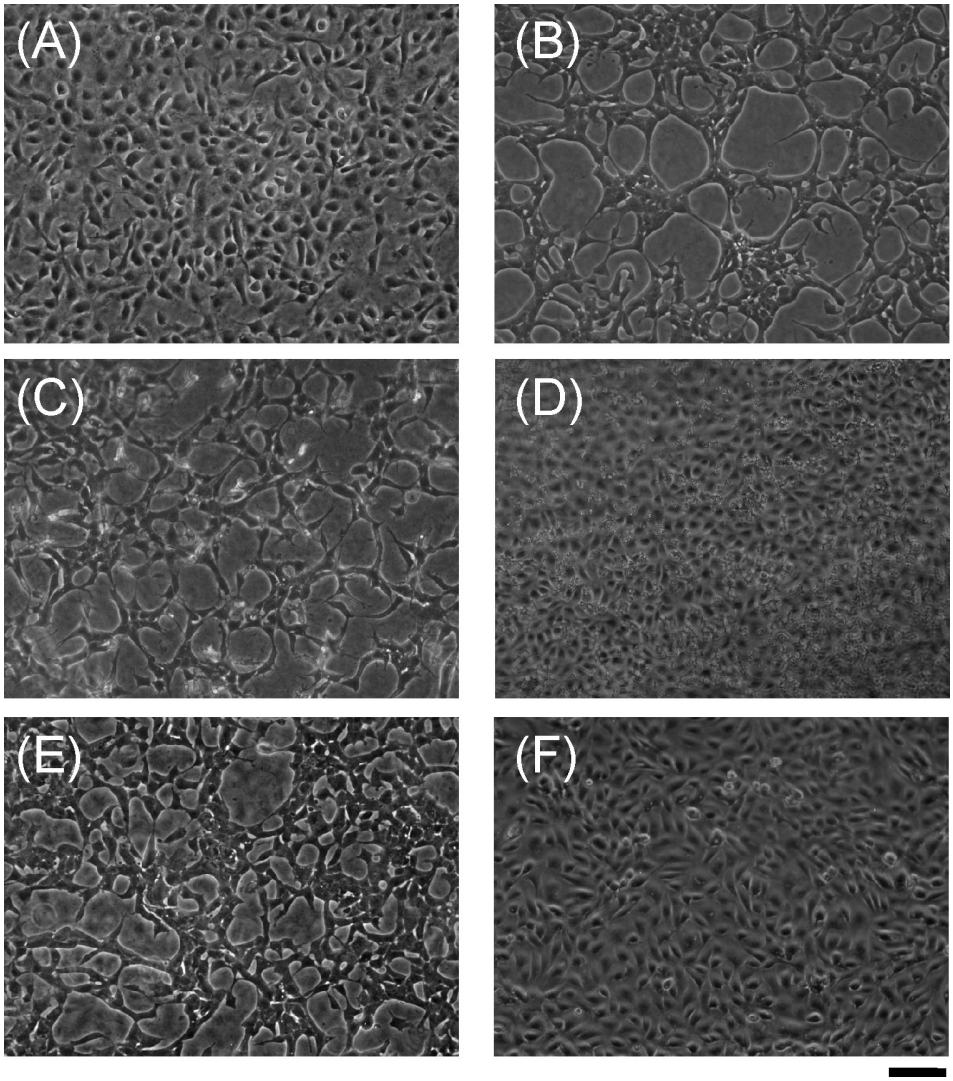

図４　コラーゲンサンドイッチモデルにおけるネットワーク形成
コラーゲンゲル上に播種して12時間後の細胞(A)を反転させた。その後６日でネットワーク様構造を示した(B)。コラーゲンゲル間で３日間培養した細胞はネットワークを形成した(C)が，上側のゲルを取り除いたところ，再び増殖してコンフルエントになった(D)。コラーゲンゲル下で１週間培養した細胞はネットワーク状の構造を示した(E)。通常の培養皿上の細胞は増殖してコンフルエントになり，ネットワーク状にはならなかった(F)。Bar scale，100μm。

２層のコラーゲンゲルの間で内皮細胞を培養した場合（図１B–II)，細胞は増殖してコンフルエントにはならずに，伸長して２－４日でネットワークを形成した。この構造は安定で，約２週間は保持された。形態としては，細長く伸びた細胞がネットワーク状の構造をとっていた(図４C)。つづいて，ネットワーク状の構造をとった後に，上側のゲルを取り除いた。直後からタイムラプス観察を行ったところ，ゲルを取り除かれた細胞の細長い形態は，数十分後には

通常の形態に戻り，その後増殖を続け，最終的にはコンフルエントになった（図４D)。

コラーゲンゲルの下で内皮細胞を培養した場合（図１B–III)，１週間ほどすると内皮細胞はネットワークの形態を示した（図４E)。この細胞をゲルごと反転させると，内皮細胞は速やかに元の形態に戻り，増殖してコンフルエントになった。

３.３　３次元モデルの観察

3.3.1　モデルの形態

コラーゲンゲル上でコンフルエントになったBAEC，BPMECにbFGF添加を添加したところ，どちらの細胞種を用いた場合でもネットワークの形成が観察された。ゲル上の内皮細胞が，bFGF添加の刺激によって内皮下にあるコラーゲンゲル内に侵入し，その後，伸長・分岐・融合を繰り返しながらネットワークが広がっていった（図５A–C)。発達したネットワークが観察されるまでの時間はBAECが約72時間，BPMECが約48時間とBPMECの方が早かった。

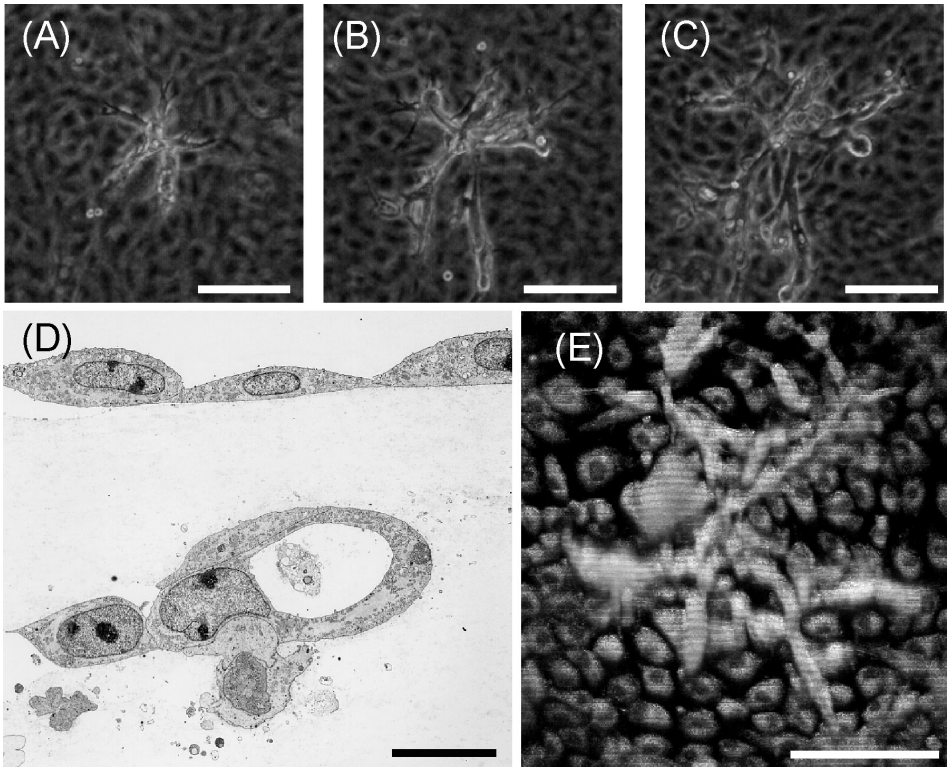

図５　３次元モデルのネットワーク形態
bFGFを添加したBPMECは，24時間後からゲル内への侵入を始め(A)，48時間後(B)，72時間後(C)とネットワークを広げていった。(D)モデルを電子顕微鏡で観察したところ，ゲル内には管腔構造を持ったネットワークが形成されていることが分かった。(E)共焦点レーザ走査型顕微鏡による蛍光観察から，ゲル上に一層の内皮細胞層が広がり，ゲル内には細胞が連続的につながったネットワークが存在していることが分かる。Bar scale，(A)–(C)，(E)，100μm；(D)，20μm。

BPMECを用いたモデルを詳しく観察した。このモデルの垂直切片を透過型電子顕微鏡で観察したところ，ゲル上にコンフルエントの細胞層が広がり，ゲル内に管腔構造のネットワークが形成されているのが確認できた（図５D)。また，共焦点顕微鏡での観察により，細胞が３次元的に連なった構造をしていることが分かった（図５E)。

3.3.2　モデルへのせん断応力負荷[12)]

ネットワーク形成を開始したモデルに培養液の流れによるせん断応力を負荷した。その様子をタイムラプス観察し，経時的なネットワーク長さの変化を調べたところ，静置状態のネットワークが一定の割合で成長しているのに対して，せん断負荷の場合は負荷後10時間前後から成長率が増加して，発達したネットワークが形成された。このように，せん断応力が負荷されている状態で形成されている３次元的なネットワークが，静置状態のものに比べて大きく成長することが分かった。

ネットワークの成長過程を調べるために，タイムラプス画像からネットワークの端点（ネットワークの先端部分）と分岐点（ネットワークが枝分かれしている部分）の数を経時的に計測した。その結果，静置培養では分岐点の数は増えたものの端点の数がほとんど増加しなかったのに対して，せん断応力が負荷された場合は分岐点と端点の数がともに増加した。せん断応力が負荷されている場合は，静置培養の場合に比してネットワークの先端部における伸長が非常に盛んになり，血管の分岐も多数見られ，伸長と分岐を繰り返すことでより広範囲にネットワークが形成されていった。また伸長速度が大きいため，静置培養の場合のように血管が再合流するという現象も少なかった。

このように，ゲル上の細胞に負荷したせん断応力が，ゲル内のネットワーク形成に影響を及ぼしたことから，ゲル上の細胞の動きに着目した。タイムラプス画像から，せん断応力を負荷，静置培養それぞれのモデルのゲル上の細胞層における内皮細胞の遊走速度を１時間ごとに計測したところ，せん断応力を負荷した細胞は，負荷後12時間前後から細胞速度が上昇し，静置培養のものと比べて有意に増加した。また，実験開始から24時間前後の細胞の遊走角度を観察すると，静置培養の場合，細胞はランダムな方向に遊走しているのに対し，せん断応力を負荷した細胞は流れの下流方向に遊走した。しかし，せん断応力を負荷した場合でもネットワークの近傍における遊走に方向性はなかった。

以上のように，この系を用いた研究では，せん断応力による新生血管ネットワーク形成の促進を明らかにしただけではなく，ネットワークの分岐点や端点を経時的に観察することで，せん断応力がネットワークの形成過程に及ぼす影響を調べたり，ゲル上の細胞の遊走を観察することにより，せん断応力が細胞遊走に及ぼす影響や細胞遊走とネットワーク形成の相互作用に関して観察したりすることが可能であった。

4．考察

4.1　モデルの比較

本稿ではマトリゲルモデル，コラーゲンサンドイッチモデル，３次元モデルの３タイプのモデルについて紹介した。まずは，それぞれのモデルの特徴を考察していく。

マトリゲルモデルの特徴はネットワーク形成の簡易さにある。ゲル化させた後，細胞を播種するだけで12時間後にはネットワーク様構造を示す。このネットワークは中に空隙のある血管様の構造を持つことが, Kubotaらの研究によって分かっている[10)]。また，２次元的にネットワークが広がるため，解析も容易で，これらの要因から広く血管新生能の指標として用いられてきた。一方で，留意すべき点としては以下のことが挙げられる。まず，本研究でも示したようにネットワークの保持時間が短く，長期的な観察には向かないこと。そして，マトリゲル上において内皮細胞は増殖を示さず，高度に分化しているということから血管新生の過程を再現するというよりは血管新生最終過程に特化した再現モデルと言える。さらに，マトリゲルにはラミニン，コラーゲンIV，ヘパラン硫酸プロテオグリカンなど多くの成分から構成されていることやFGFやTGF-βなどの因子も含んでいることも考慮しておく必要がある。

コラーゲンサンドイッチモデルは細胞を播種してゲルで覆うだけで２－４日後にネットワークが形成される。また，作製の容易さに加えて２週間程度の長期間に渡りネットワーク形態を維持することができた。このモデルも管腔のある血管様構造を持っていることが分かっている[8)]。細胞外基質がType Ⅰコラーゲンのみで構成されている点は現象の原因を特定していく際には利点となる一方で，生体内の再現性という面では不利な点となる。本実験でも示したように，ゲル間に挟まれた状態と細胞下にのみゲルが存在する状態を可逆的に変化させることができるため，遊走・増殖をする過程と管腔を形成する過程の内皮細胞の移り変わりを観察することも可能である。この可逆性についてはDeroanneらも報告している[4)]。細胞外基質に囲まれた状態で管を形成するというこの細胞の特性は，生体内において組織内に侵入した内皮細胞が管状構造をとって新生血管を形成していくという現象と一致しており，大変興味深い。また，このモデルは２次元的にネットワークが広がるため解析は容易であるが，既存の血管から新生血管が生じるという，生体内の血管新生の再現という観点からは３次元モデルの方が再現性は高いと言える。

３次元モデルは上記２種類のモデルに比べて生体内の現象の再現性が非常に高いことが特徴である。このモデルは既存の血管の細胞が細胞外基質内に侵入（発芽），増殖，遊走して管腔を形成していくという血管新生の多くの過程を再現している。また，ネットワークが３次元的に広がっていくことは，生体内の再現性という点でも，再生医療への応用を考えた場合でも利点となる。一方，解析においては２次元のモデルに比べて煩雑になり工夫を要する。

以上のようにそれぞれのモデルに長所・短所があることが分かる。これらを考慮に入れながら，研究課題や実験系に応じて適宜選択することが望ましい。

4.2　関連因子の血管新生への影響

今回の結果から，血管新生に関連するいくつかの因子についてその影響が明らかになった。

まず細胞種について述べる。マトリゲル，コラーゲンサンドイッチモデルでは大動脈由来の内皮細胞を，３次元モデルでは大動脈由来と毛細血管由来の２種類の内皮細胞を使用したが，いずれもネットワークを形成した。この結果は従来研究とも一致するところである[11)]。このように，大動脈由来であっても毛細血管由来であっても内皮細胞はネットワークを形成する能力を持っていることが分かる。一方，３次元モデルの実験においてはネットワーク形成までの時間に違いが見られた。ネットワークの形成しやすさの点では毛細血管由来の内皮細胞の方が優れているようである。このことは，成体において新生される血管のほとんどが毛細血管であることを考えても，妥当な結果であると言える。

せん断応力に関しては，*in vitro* の３次元的モデルにおける血管様ネットワークの形成が促進されることが分かった。この傾向は血流が血管新生に促進的に影響するという *in vivo* の研究[9)]にも一致する。*In vitro* モデルを用いた実験では，Gloeらがせん断応力を負荷後に静置状態に置くことで，内皮細胞が２次元的なネットワークを形成した[7)]ことから，ネットワーク形成がせん断応力負荷によって促進されることを示している。また，Cullenらは拍動流を負荷した細胞をマトリゲル上に播種する実験を行い，拍動流を負荷された内皮細胞のネットワーク形成能が促進されることを観察している[3)]。一方，本研究では，せん断応力が負荷されている状態で形成されている３次元的なネットワークが，静置状態のものに比べて大きく成長することが分かっただけではなく，その過程においても条件による違いがあることを観察することができた。生体内の過程を忠実に再現したモデルを用いて３次元的なネットワークについての制御因子を調べることができたことは，4.1で述べたような３次元モデルの優位性を考えると病気の治療や再生医療への応用に対しても有意義である。

4.3　モデルの応用

In vitro モデルはさまざまな細胞外基質の種類や硬さのような周辺環境のパラメータを変化させられるだけではなく，せん断応力や伸展張力といった機械的な刺激を負荷させることも可能である。さらには，EPCのような前駆細胞を組み入れることも可能で，そういった応用範囲の広さも特徴として挙げられる。

4.4　まとめ

本稿では，複数種類の *in vitro* モデルを使用した研究について述べた。それぞれのモデルには特徴があり，それらを活用することで，細胞外基質やせん断応力といった内皮細胞の周辺環境が血管新生に及ぼす影響が明らかになった。今後，*in vitro* のモデルを用いて周辺環境の血管新生に対する影響に関してさらなる知見を得ることができれば，適切な環境によって新生血管の制御を行い，その長さや太さを任意に変えることができるようになり，病気の治療にとっても再生医療にとっても重要な基幹技術となるのではないかと考えている。

謝辞

本研究の一部は慶應義塾大学21世紀COEプログラム「知能化から生命化へのシステムデザイン」の支援を受けて行われた。

引用文献

1）Akimoto T, Hammerman MR. (2003) Fibroblast growth factor 2 promotes microvessel formation from mouse embryonic aorta. Am J Physiol Cell Physiol., 284 (2), C371–C377

2）Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science., 275 (5302), 964–967

3）Cullen JP, Sayeed S, Sawai RS, Theodorakis NG, Cahill PA, Sitzmann JV, Redmond EM. (2002) Pulsatile flow-induced angiogenesis: role of G (i) subunits. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 22 (10), 1610–1616

4）Deroanne DF, Lapiere DM, Nusgens BV. (2001) In vitro tubulogenesis of endothelial cells by relaxation of the coupling extracellular matrix-cytoskeleton. Cardiovasc Res., 49 (3), 647–658

5）Folkman J, Browder T, Palmblad J. (2001) Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. Thromb Haemost., 86 (1), 23–33

6）Folkman J, Shing Y. (1992) Angiogenesis. J Biol Chem., 267 (16), 10931–10934

7）Gloe T, Sohn HY, Meininger GA, Pohl U. (2002) Shear stress-induced release of basic fibroblast growth factor from endothelial cells is mediated by matrix interaction via integrin alpha(v)beta3. J Biol Chem., 277 (26), 23453–23458

8）Hayashi J. (1999) Angiogenesis in vitro. Hum Cell., 12 (1), 31–35

9）Ichioka S, Shibata M, Kosaki K, Sato Y, Harii K, Kamiya A. (1997) Effects of shear stress on wound-healing angiogenesis in the rabbit ear chamber. J Surg Res., 72 (1), 29–35

10）Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. (1988) Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. J Cell Biol., 107 (4), 1589–1598

11）Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. (1995) Leukemia inhibitory factor (LIF) inhibits angiogenesis in vitro. J Cell Sci., 108 (Pt 1), 73–83

12）Ueda A, Koga M, Ikeda M, Kudo S, Tanishita K. (2004) Effect of shear stress on micro-

vessel network formation of endothelial cells with in vitro three-dimensional model. Am J Physiol Heart Circ Physiol., 287 (3), H994–H1002

13) Vailhe B, Vittet D, Feige JJ. (2001) In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. Lab Invest., 81 (4), 439–452