

Title	過酸化低比重リポ蛋白による線維芽細胞障害の細胞周期S期選択性
Author(s)	小杉, 圭右
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35816">https://hdl.handle.net/11094/35816</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 【21】

氏名・(本籍)	小 杉 圭 右
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 7820 号
学位授与の日付	昭 和 62 年 7 月 9 日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	過酸化低比重リポ蛋白による線維芽細胞障害の細胞周期S期選択性
論文審査委員	(主査) 教 授 鎌田 武信 (副査) 教 授 垂井清一郎 教 授 北村 幸彦

## 論 文 内 容 の 要 旨

## [目 的]

血中低比重リポ蛋白(以下LDL)は動脈硬化症の主要な危険因子である。LDL自体が血管内皮細胞を障害し、動脈硬化症の引き金になるという説は近年注目を集めている。LDLの細胞障害性は血管内皮細胞のみならず、平滑筋、線維芽細胞などでもみられ、特に細胞分裂の盛んな細胞で強く認められる。この細胞障害性はLDLの過酸化に起因すると報告されているが、その機構については未だ不明である。そこで私は過酸化LDL(以下O-LDL)の細胞障害機構を解明する第一段階として細胞分裂サイクル(G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M期)のどの時期に細胞障害がおこるかを培養線維芽細胞を用い検討した。

## [方法ならびに成績]

ヒト線維芽細胞は15%ウシ胎仔血清を含むDulbecco-Vogt Minimal Essential培地, HamF-12培地を1:1に混合した培地(以下DV/F12培地)にて継代培養し、0.05%トリプシンで処理後、組織培養用Clusterに播種し用いた。

細胞周期を同調させるため、3日間の低栄養条件下(1%Plasma derived serumのみ含むDV/F12培地)にG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期で周期を止めた後Platelet derived growth factor(10ng/ml)またはEpidermal growth factor(100ng/ml)を含む高栄養(3.2~5.4mg/mlのLipoprotein deficient serum(以下LPDS)を含む)DV/F12培地に変更し細胞周期を開始させ実験に用いた。

LDLおよびLPDSは健常人クエン酸血より超遠心法にて分離した。LDLは1μMFeSO<sub>4</sub>を含む4℃生理食塩水、48-72時間透析することにより鉄イオンを媒体として過酸化した。実験には、FeSO<sub>4</sub>を除くため、さらに24時間、生理食塩水で透析した後のO-LDLを用いた。

非過酸化LDL (Native LDL, 以下n-LDL) もしくはO-LDLの細胞の障害の指標としては、一定時間LDL (最終コレステロール濃度250~400  $\mu$ g/ml) と培養孵置した後の残存細胞数およびLactate dehydrogenase (LDH) の培地中への遊出を用いた。残存細胞数はリン酸緩衝液により2回洗浄後、トリプシン処理し、Coulter Counterにて計数し、培地中LDHは酵素法により測定した。過酸化脂質はMalondialdehyde (MDA) を基準としてチオバルビツール酸法により測定した。

O-LDL (1.1~2.0nmolMDA/ml) を含む培地にて線維芽細胞を48~66時間培養した場合、O-LDLは細胞に障害を与え、培養開始時およびn-LDL群の細胞数のそれぞれ約40~70%、8~25%まで残存細胞数を減少させた。細胞の遊走能は保たれる程度の放射線照射 (1570rads) により細胞分裂を阻止した場合、O-LDLによる細胞障害は認められなかった。S期の前で細胞周期を停止させるHydroxyurea (以下HU, 2mM) 添加にて細胞分裂を阻止した場合も、O-LDLは細胞を障害しなかった。一方、S期にてDNA合成は阻害せず、M期にて細胞周期を阻止するColchicine (20nM) 添加は細胞分裂は阻止しえたが、O-LDLの細胞障害は認められた。

同調した細胞をO-LDL (0.8~1.7nmolMDA/ml) 添加下に培養し、細胞数、<sup>3</sup>H-Thymidineとりこみにより細胞周期をモニターしながら残存細胞数、LDHの培地中への遊出を継時観察した時、細胞障害はS期を過ぎた後、認められ始めた。またO-LDL (0.9nmolMDA/ml) を含む培地で一定時間培養後、O-LDLを除去し細胞分裂させた場合、S期を過ぎた以後にO-LDLが除かれた細胞のみ障害が認められた。

これらの結果はS期にてO-LDLが細胞を障害する可能性を示したが、これを確認するため、HUによりS期の前で細胞周期を停止させO-LDLを含む培地にて48時間培養後、HU、O-LDLとともに除去しS期より細胞周期を開始させた。O-LDLのない条件下でS期を通過した場合、前もってO-LDLと接していたにもかかわらず細胞障害は認められなかった。S期を過ぎた後、G<sub>2</sub>期の細胞にO-LDLおよびHUを添加し、O-LDL添加下にM期を通過し次のS期の前で細胞周期を停止させた場合、O-LDL添加下に細胞は分裂したが、細胞障害は認められなかった。

#### [総括]

- 1) O-LDLは細胞分裂しているヒト線維芽細胞を障害した。
- 2) 放射線照射、HUによりS期の前で細胞分裂を阻止した場合、O-LDLは細胞を障害せず、一方ColchicineによりM期にて分裂を止めてもO-LDLによる細胞障害は認められた。
- 3) O-LDLによる細胞障害はS期を過ぎた後、はじめて認められた。
- 4) S期通過時にO-LDLが存在しなかった場合、O-LDL添加下にM期を通過し細胞分裂しても細胞障害は認められなかった。

以上より

線維芽細胞に対するO-LDLの細胞障害性は、細胞周期のS期にのみ特異的に出現することが明らかとなった。これはO-LDLの細胞障害機構をさらに解明することを容易にした。

## 論文の審査結果の要旨

過酸化低比重リポ蛋白（O-LDL）の内皮細胞障害は動脈硬化症の引き金として注目されている。その障害機構を解明する第一段階として細胞分裂サイクルのどの時期に細胞障害がおこるかを知ることが重要である。

細胞分裂サイクルを同調させたヒト線維芽細胞を内皮細胞障害のモデルとし、種々の細胞分裂阻止法を用い検討した結果、O-LDLの細胞障害が細胞周期のS期（DNA合成期）にのみ特異的に出現することを見出した。この事実はO-LDLの細胞障害機構の解明に新知見をもたらし、細胞生物学、動脈硬化症研究の上で大きな意義をもつものと考えられる。