



Title	組織培養レベルにおける虚血モデルの確立と血管内皮細胞の低酸素ストレス応答
Author(s)	小川, 智
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38284">https://hdl.handle.net/11094/38284</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">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名 お 小 川 さとし 智

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 0 3 3 7 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 4 年 6 月 8 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 名 組織培養レベルにおける虚血モデルの確立と血管内皮細胞の  
低酸素ストレス応答

論 文 審 査 委 員 (主査)  
教 授 鎌 田 武 信

(副査)  
教 授 多 田 道 彦 教 授 木 下 タ ロ ウ

## 論 文 内 容 の 要 旨

### (目 的)

臓器での虚血を理解するためには細胞レベルでの虚血モデル、低酸素負荷システムが不可欠である。血管内皮細胞は血管腔内に一層の細胞層を形成し、血液と臓器のインターフェイスとして、血管機能の維持に極めて重要な役割を担っており、臓器虚血に際して最初に低酸素に暴露される血管内皮細胞の虚血ストレス応答の解明は、虚血性血管傷害の病態生理を理解する上で極めて重要である。本研究は細胞培養レベルでの虚血モデルを確立、血管内皮細胞の低酸素ストレス応答を分子レベルで理解せんとしたものである。

### (方法ならびに成績)

#### 1. 組織培養と低酸素環境の達成

ウシ大動脈より Schwartz らの方法により大動脈血管内皮細胞 (BAE) を分離、継代培養し以下の実験に供した。低酸素環境は Coy 社の嫌気チャンバーを用い迷入する酸素をバナジウム触媒を用いて水素と反応、除去し達成した。これによりチャンバー内の酸素分圧は数ppm 下、チャンバー内細胞培養液中の酸素分圧は約8 torr となった。

#### 2. 血管内皮上に低酸素によって誘導される蛋白 (ORPs, Oxygen Regulated Proteins) の検討

低酸素暴露により血管内皮上に誘導される蛋白の存在を確認するため、BEA を一定時間低酸素に暴露、<sup>35</sup>S-methionine でラベルしたのち超遠心で膜分画を採取、二次元電気泳動後そのfluorogram を PD Quest (PDI 社製二次元 gel 解析プログラム) によって解析した。低酸素暴露は血管内皮細胞上に少なくともfluorogram 上約20個のスポットを誘導し、その maximal induction が低酸素暴露後24時間以内に見られる蛋白群 (early ORPs) と、それ以後に maximal induction の見られる蛋白群 (delayed ORPs) が見られた。またこれらは酸素濃度に関しても様々な dose response を示した。

#### 3. 血管内皮細胞上に誘導される他のストレス蛋白との比較検討

これら血管内皮細胞上に誘導される ORPs のストレス蛋白と同一であるかを検討するため、BAE を Heat Shock (43°C 3時間) 及び Glucose deprivation (glucose free 24時間) に暴露し同様に fluorogram を PD Quest にて解

析, 検討した。Heat shock, glucose deprivation は血管内皮上に fluorogram 上認識可能な約10個の heat shock proteins および glucose regulated proteins を誘導したが, これらは ORPs と異なる蛋白群を形成していた。

#### 4. 血管内皮上に誘導される凝固活性の測定と characterization

低酸素ストレスの血管内皮細胞凝固活性におよぼす影響を検討するため, 低酸素に暴露された BAE の血漿中でフィブリン塊形成能力(凝固時間)を評価した。BAE 上の凝固能は低酸素暴露によって経時的に, 酸素濃度の低下に伴って亢進した。この活性は tissue factor の中和抗体で失活せず tissue factor と異なる凝固活性であった。

<sup>125</sup>Iラベルした血液凝固第X因子 (Factor X) が低酸素暴露された BAE によって Xa に活性化されていることを SDS-PAGE の autoradiography にて確認, この凝固活性が Factor X を直接活性化する事を示した。またウシ第VII及びX凝固因子欠損血漿を用いた凝固アッセイによれば, この活性は低酸素によって BAE 膜上に蛋白新生により誘導される cystein proteinase で, その活性は既存の外因系凝固因子の中和抗体で失活せず, Ca を要求, optimal pH は約6.8であった。

#### 5. 低酸素によって血管内皮上に誘導される凝固活性 FAXA の精製

5X10<sup>8</sup>個の BAE を72時間低酸素に暴露したのち超遠心によって膜分画を得, これを  $\beta$ -octyl glycopyranoside で可溶化, preparative isoelectric focusing に供した。各 fraction の Factor X を Xa に変換する活性を凝固アッセイにて評価し, pI=5 の fraction にその活性を見いだした。この操作を5回行い活性を認めた fraction を濃縮, preparative SDS-PAGE を行った。電気泳動後 gel をスライスとし, 各スライスの活性を同様に測定した。活性を認めたスライスを還元, 非還元の条件下で SDS-PAGE に供し, 100kDa 付近に活性の存在することを確認, 一部の lane は銀染色をおこなった。FAXA は, 還元状態でも非還元状態でも分子量約100kDa の single band として染色され, 還元状態では失活した。

(総括)

細胞培養レベルでの虚血モデルを開発, それを用い, 低酸素に対する血管内皮細胞の応答現象を蛋白レベルで解析, 血管内皮機能が低酸素によって傷害され, 血栓準備状態に陥ることを証明した。これに関与する新しい凝固因子 FAXA を精製し, 低酸素ストレスによって血管内皮上に誘導される ORPs の一部であることを示した。これらの蛋白の精製は虚血病態下での循環障害のメカニズム解明に極めて重要な意味を持っていると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

虚血による臓器障害をより詳細に検討するためには, 細胞レベルにおける虚血モデルが不可欠である。本研究では, 大規模な嫌気チャンバーにおいて, 迷入する酸素をバナジウム触媒によって水素と反応・除去することにより, 組織培養における虚血モデルを確立, これを用いて血管内皮細胞の低酸素ストレス応答を蛋白レベルで明かとしている。また, 実験的脳虚血モデルに見られる虚血巣周辺部での微小血栓の存在など, 従来より虚血・低酸素環境での血栓傾向が指摘されてきたが, 血管内皮細胞を用いたこの実験系でも同様に, 低酸素が血管内皮細胞機能を修飾し血栓準備状態とする事から, 本実験モデルの有用性を示している。さらに大量の血管内皮細胞を低酸素に暴露, この現象に関与すると考えられる新しい凝固活性因子の精製に成功している。以上, 動物モデルでのアプローチが主であった虚血性臓器障害の病態生理の解明法に組織培養の手法を導入, 分子生物学的なアプローチへの展望を開いた点で, これまでにないユニークな研究であり, 学位に値するものと考えられる。