



Title	低酸素暴露マクロファージによる血管内皮増殖因子の産生
Author(s)	桑原, 敬介
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38930">https://hdl.handle.net/11094/38930</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">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	桑 原 敬 介
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 2 8 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 6 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	低酸素暴露マクロファージによる血管内皮増殖因子の産生
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 鎌 田 武 信 (副査) 教 授 早 川 徹 教 授 谷 口 直 之

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

創傷治癒や虚血に陥った部位への血管新生には、低酸素状態における血管内皮細胞 (EC) の増殖が必要である。現在までに、我々はバナジウム触媒により迷入酸素をほぼ完全に除去でき、大量の培養細胞を一度に低酸素負荷し得る低酸素チャンバーを用いて、培養 EC における虚血モデルを確立し、低酸素下では EC の増殖が強く抑制されること、その EC は外来性の bFGF で増殖反応を示し、EC の bFGF に対する高親和性のレセプター数も上昇していることを示してきた。このことは、おそらく低酸素下における血管新生を目的として、何らかの因子が虚血部位での選択的な EC の増殖、およびその制御を誘導している可能性を強く示唆する。本研究では、虚血下血管新生に関与するメカニズムの解明を目的とし、Knighton らにより組織学的に関連が指摘されたマクロファージ (Mφ) に注目し、低酸素負荷による Mφ の増殖因子の産生の有無ならびにその同定を試みた。

### 【方法ならびに成績】

#### 1) 細胞培養と低酸素負荷

ヒト末梢血から濃度勾配遠心分離にて単球分画を採取し、組織培養プラスチック容器に37度で4時間粘着させて分離した。粘着細胞 (単球) は、10%ヒト血清を含むRPMI1640にて10-14日間培養してMφとして使用した。ヒト血管平滑筋細胞 (SMC) は Colucci らの方法により分離し、ヒト繊維芽細胞 (FBR) も同様の方法で単離した。ウシ血管内皮細胞 (BAE) は生後すぐの仔牛の大動脈より、scraping にて採取し、第2-12代目のものを実験に使用した。ウシ副腎毛細血管内皮細胞 (BCE) は Furie らの方法に従って単離し、第10-20代目のものを使用した。培養細胞は低濃度酸素の加湿空気で維持された低酸素チャンバー内で低酸素暴露した。この実験系では、48時間の低酸素負荷時培養液の酸素分圧は10 torr 以下で、その pH は7.3-7.4であった。

#### 2) 低酸素負荷により Mφ から産生される成長因子の同定

Mφ, SMC, FBR を低酸素に暴露すると、SMC や FBR の上清中には低酸素下 EC の  $^3\text{H}$ -thymidine uptake を増加させる活性は認められなかったが、Mφ の培養上清は低酸素下で増殖中の BCE の  $^3\text{H}$ -thymidine uptake を最大で約20倍に、BAE のそれを約5倍に増加させた。更に、その EC 増殖活性は Mφ がより低い酸素濃度にさらされるほど強く誘導され、低酸素負荷開始後24時間に最大となった。この Mφ 上清中の増殖活性は、ヘパリンカラムによるクロマトグラフィーにて、異なった NaCl 濃度で溶出される3つのピークに分離され、各々の増殖活性はそれぞれ PDGF,

aFGF, bFGF の中和抗体にて抑制された。また、カラムにて分離する前の低酸素暴露 Mφ の培養上清について上記 3 種の抗体全てを混合して加えた場合、その活性はコントロールのレベルにまで抑制された。メタボリックラベルした Mφ の immunoprecipitation では、PDGF, aFGF, bFGF と思われるバンドが、低酸素負荷 Mφ の培養上清および cell-lysate においてのみ認められ、正常酸素下の Mφ には認められなかった。intact な cell のレセプターに結合する PDGF および bFGF の Mφ 培養上清中の抗原量を確認する目的で、3T3 細胞, BHK 細胞を用いたラジオレセプターアッセイを施行した。Mφ 培養上清中の PDGF の抗原量は低酸素暴露後 16 時間で  $10^6$  個細胞当たり  $1.0\text{ng}/\text{ml}$  の最大値を示し、bFGF は 24 時間後に  $10^6$  個細胞当たり  $2.5\text{ng}/\text{ml}$  で最大となった。また、両者ともシクロヘキシミドおよびアクチノマイシン D で抑制された。さらに、同ラジオレセプターアッセイを用いて、代謝阻害剤である deoxyglucose, fluoride, azide および重金属の Co, Ni による正常酸素下 Mφ の PDGF, bFGF 誘導に対する影響を検討した。代謝阻害剤では影響は認められなかったが、Co, Ni は正常酸素下 Mφ に両因子 (bFGF, PDGF) を誘導させた。

#### 【総括】

Mφ は低酸素暴露により、bFGF をはじめとする増殖因子を分泌し、低酸素下の EC の増殖を促進し得ることが明らかとなった。この事実は、局所低酸素部位での選択的な血管新生が誘導される際に Mφ が極めて重要な役割を担っている可能性を示している。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、血管新生におけるマクロファージの役割を検討する目的で、低酸素暴露マクロファージによる低酸素下血管内皮細胞増殖因子の産生の有無の検討、またそれらの因子の同定を行ったものである。低酸素負荷されたマクロファージの培養上清中には、低酸素下に増殖を抑制された血管内皮細胞の増殖を誘導する血管内皮細胞増殖因子が蛋白新生により産生され、それらは PDGF, aFGF, bFGF であることが初めて同定された。このことは低酸素環境下の内皮細胞増殖における細胞間の相互応答を考える上で意義深い。本研究は、脳虚血や動脈硬化など、in vivo における虚血下血管新生の関与する病態を究明する上で極めて重要であり、学位に値する研究であると考えられる。