

Title	Purification and Characterization of a Novel Vascular Endothelial Cell Growth Inhibitor Secreted by Macrophage-like U-937 Cells
Author(s)	中野, 法彦
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41620">https://hdl.handle.net/11094/41620</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"〉</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">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	中野法彦
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 14446 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Purification and Characterization of a Novel Vascular Endothelial Cell Growth Inhibitor Secreted by Macrophage-like U-937 Cells (マクロファージ様U-937細胞から分泌される新規血管内皮細胞増殖抑制因子の精製と解析)
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之  (副査) 教授 中村 敏一 教授 高井 義美

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

血管内皮細胞は、生体内では通常は増殖をしていない静止期の状態にあり、特殊な状況においてのみ増殖を開始する。その制御は、血管内皮細胞の増殖因子と抑制因子のバランスによると考えられている。固形腫瘍の増殖には、腫瘍自身への栄養源の補給を行うために血管新生を起こすことが必須である。また、糖尿病網膜症、乾癬症、関節リウマチ、動脈硬化などの疾患は血管新生が病態の進行を促進する要因となっている。これらの疾患に対しては血管内皮細胞の増殖を阻止することが有効であると考えられ、最近では angiostatin, vasculostatin, endostatin などが報告されている。マクロファージは固形腫瘍、動脈硬化巣、創傷など血管新生が生じる部位に多く見られ、血管新生を制御すると考えられている。マクロファージ様細胞に分化する U-937細胞は、leukemia inhibitory factor (LIF), oncostatin M (OSM), transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1) および tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) を産生することが報告されている。そこで U-937細胞の培養上清から血管内皮細胞の増殖を特異的に抑制する新たな因子を見つけることを目的に精製を試み、新規の蛋白質性の因子を見出した。さらに本因子の精製とその生物学的特性の解析を行った。

#### 【方法ならびに成績】

マクロファージ様細胞株 U-937細胞を無血清下で 60nM phorbol ester により刺激して得られた培養上清を、銅キレート、ヘパリンアフィニティー、陽イオン交換、逆相 HPLC を用いて部分精製した。血管内皮細胞増殖抑制活性はウシ大動脈より単離・培養した血管内皮細胞への [ $^3$ H] thymidine の取り込み抑制を指標とした。部分精製した活性分画のヘパリンセファロースに対する親和性を調べたところ、これまでに報告のある LIF, OSM および TGF- $\beta$  1 はそれぞれ 0.2M, 0.8M, 0.5M NaCl で溶出され、TNF- $\alpha$  は結合しなかったが、活性分画は 0.75M NaCl で溶出された。この活性分画は濃度依存性に増殖抑制活性を示し、その ED50 の 120 倍相当量の既知の 4 因子に対する抗体でウェスタンブロッティングを行ったが検出されなかった。また、これら 4 因子の飽和活性濃度において活性分画を加えると、さらに増殖抑制が認められた。この活性分画を血管内皮細胞に添加すると細胞増殖は抑制されたが、この活性分画を含まない培養液に換えると再び正常に増殖した。したがって、この活性分画には新規の血管内皮細胞増殖抑制因子が存在すると考えられた。

このU-937細胞由来の新規血管内皮細胞増殖抑制因子を精製し機能解析を行うため、完全精製を試みた。U-937細胞の無血清培養上清50Lを濃縮した後、銅キレート、ヘパリンアフィニティー、陽イオン交換カラムおよびフェニルとC4の逆相HPLCにて分離精製した。精製標品は、還元下および非還元下でのSDS電気泳動において65kDaを示した。トリプシン消化物のアミノ酸配列分析の結果、QSRVQISWの配列を得た。既知の蛋白質との相同性は認められなかったため、仮にendothelial cell inhibitor (ECI)と名付けた。ECIは、血管平滑筋細胞の増殖には効果を示さず、血管内皮細胞特異的に濃度依存性に増殖を抑制した。また、fibroblast growth factor-2 (FGF-2)あるいはvascular endothelial growth factor (VEGF)による血管内皮細胞増殖誘導を抑制し、FGF2やVEGFの受容体に競合するためではなく、特異的受容体を介して増殖抑制能を示すものと考えられる。ECIは、マクロファージ由来の増殖抑制因子TGF- $\beta$ 1およびTNF- $\alpha$ と同程度の増殖抑制能を有し生理活性物質であると考えられる。

#### 【総括】

マクロファージ様細胞株U-937細胞の培養上清から血管内皮細胞特異的な新規増殖抑制因子を精製した。本因子は、還元下および非還元下でのSDS電気泳動において65kDaのバンドを示した。また、本因子は血管平滑筋細胞には効果を示さず、血管内皮細胞に濃度依存性に増殖を抑制し、その抑制活性はTGF- $\beta$ 1およびTNF- $\alpha$ と同程度であった。さらに、FGF2やVEGFによる血管内皮細胞増殖誘導を抑制した。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒトマクロファージ様細胞U-937細胞が分泌する新規血管内皮細胞増殖抑制因子を精製し、その生物学的特性を解析したものである。

血管新生は、多くの固形腫瘍、動脈硬化巣、糖尿病網膜症、関節リウマチなどで認められ、血管内皮細胞の増殖がその主体である。これを抑制することはこれらの病気の治療に貢献する。マクロファージは固形腫瘍、動脈硬化巣、創傷部位など血管新生が見られる部位に多く存在する。これまでに報告されているマクロファージ様細胞U-937細胞が分泌する血管内皮細胞増殖抑制因子は、血管内皮細胞に対する特異性は低い。そこで血管内皮細胞に特異的増殖抑制因子の精製を行った。

ヒトマクロファージ様細胞株U-937細胞の培養上清から銅キレート、ヘパリンアフィニティー、陽イオン交換、逆相HPLCを用いて精製を行い、還元下および非還元下でのSDS電気泳動において65kDaの蛋白質を得た。アミノ酸配列解析の結果、本因子は既知の蛋白質との相同性は認められなかった。本因子は血管平滑筋細胞の増殖には効果を示さず、血管内皮細胞の増殖を濃度依存性に抑制し、その抑制活性は既知の血管内皮細胞増殖抑制因子のTGF- $\beta$ 1およびTNF- $\alpha$ と同程度であった。さらに、血管内皮細胞増殖因子であるFGF-2やVEGFによる増殖誘導を本因子は抑制した。

血管内皮細胞に対する新規増殖抑制因子を精製したことは、血管新生疾患である固形腫瘍、動脈硬化、糖尿病網膜症、関節リウマチなどの治療法の確立という観点からも学位の授与に値すると考えられる。