Osaka University Knowledge Archive

Title	Localization of CD9, an Enhancer Protein for Proheparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor, in Human Atherosclerotic Plaques-Possible Involvement of Juxtacrine Growth Mechanism on Smooth Muscle Cell Proliferation
Author(s)	西田, 誠
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42805
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【66】

氏　　名	西田　誠（にしだ　まこと）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15743　号
学位授与年月日	平成12年10月13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	Localization of CD9, an Enhancer Protein for Proheparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor, in Human Atherosclerotic Plaques－Possible Involvement of Juxtacrine Growth Mechanism on Smooth Muscle Cell Proliferation－ （膜結合型 Heparin-Binding EGF-like Growth Factor の作用増強因子 CD9のヒト動脈硬化巣における局在－血管平滑筋細胞における Juxtacrine 増殖機構の可能性－）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　松澤　佑次 （副査） 教　授　荻原　俊男　　教　授　谷口　直之

論　文　内　容　の　要　旨

[目的]

動脈硬化形成過程において血管平滑筋細胞の増殖は極めて重要な現象であると考えられている。私達は血管平滑筋細胞に対して増殖因子活性を示す Heparin Binding EGF-like Growth Factor（HB-EGF）がヒト大動脈・冠動脈に発現し、動脈硬化形成に関与することを示してきた。また近年、*in vitro* において、膜結合型 HB-EGF（ProHB-EGF）が、隣接する細胞に対して増殖因子活性をもつこと（Juxtacrine 増殖機構）、更に膜蛋白である CD 9 がその作用を著明に増強することが示されている。しかし、*in vivo* における血管平滑筋細胞での Juxtacrine 増殖機構は明らかではない。

本研究では、CD 9 の動脈硬化形成過程における関与を明らかにするため、ヒト動脈硬化巣における CD 9 の局在を検討すると共に、培養血管平滑筋細胞において CD 9 分子が ProHB-EGF の Juxtacrine 増殖活性に及ぼす影響を検討した。

[方法ならびに成績]

1）対象及び材料

家族の承諾の得られた34剖検例より胸部大動脈および冠動脈を採取し、10%中性緩衝ホルマリンで固定、パラフィン切片を作成した。抗 CD- 9 モノクローナル抗体および HB-EGF の C 末端側および N 末端側を認識する 2 種類の抗 HB-EGF 抗体を用い免疫組織学的検討を行った。また、Juxtacrine 活性に関する検討はヒト大動脈由来平滑筋細胞、マウス L 細胞に CD 9 や ProHB-EGF を発現させた細胞を用いた。

2）ヒト動脈硬化形成過程における CD 9 の局在の検討

CD 9 免疫活性は、新生児期から青年期の血管では殆ど認められなかった。また動脈硬化の少ない血管でも同様であった。

一方、動脈硬化巣を有する症例においては、内弾性板付近およびプラークに強い CD 9 免疫活性を認めた。

3）CD 9 陽性細胞の同定

動脈硬化巣での二重染色により、平滑筋細胞およびマクロファージの一部で CD 9 免疫活性が認められた。

4）CD 9、ProHB-EGF 及び PCNA の局在の検討

動脈硬化巣における ProHB-EGF と CD 9 の局在を検討したところ、CD 9 と ProHB-EGF の両免疫活性を強く認

める部位は内弾性板付近であった。また、このような部位では、CD 9 陽性平滑筋細胞に密接して PCNA（Proliferating Cell Nucleus Antigen）陽性細胞が観察された。

5）培養血管平滑筋細胞での CD 9 の発現及び Juxtacrine 増殖活性の測定

共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、CD 9 及び ProHB-EGF 免疫活性は、培養血管平滑筋細胞における細胞辺縁に認めた。予め固定した平滑筋細胞（2M NaCl で前処理し、細胞外マトリックスに結合した増殖因子を取り除いた後）を別に培養中の平滑筋細胞に添加、接触させると平滑筋細胞のチミジンの取り込みは増加し、その効果は抗 CD 9 抗体添加により ProHB-EGF の阻害剤投与時と同様に抑制された。

6）CD 9 および ProHB-EGF 発現細胞の接触による平滑筋細胞増殖能の検討

CD 9 および ProHB-EGF 発現細胞を固定し、平滑筋細胞を添加し検討したところ、CD 9 と ProHB-EGF を共発現した細胞を接触させた時に、チミジンの取り込みは約 5 倍に増加した。また CD 9 のみ、または ProHB-EGF のみを発現させた細胞の接触では、増殖能の亢進は殆どみられなかった。

［総括］

本研究により、ヒト動脈において CD 9 が動脈硬化巣に局在し、内弾性板付近の CD 9 陽性平滑筋細胞に PCNA 陽性細胞が密接して存在すること、および培養血管平滑筋細胞において CD 9 と ProHB-EGF が細胞接触時の増殖機構に関与していることが示され、動脈硬化形成過程における平滑筋細胞増殖に CD 9 を介する Juxtacrine 機構も関与していることが推察された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、proHB-EGF の作用増強因子である CD 9 の動脈硬化巣での存在を明らかにするとともに、細胞相互に接触した状態で作用する juxtacrine 機構による血管平滑筋細胞増殖の存在を示唆したものである。これまで、膜結合型 HB-EGF である proHB-EGF は、CD 9 との共発現により増殖活性が促進されることが報告されてきたが、血管平滑筋細胞における作用は明らかでなかった。しかし今回以下の点が示されている。正常のヒト動脈においては proHB-EGF の発現を認めたが、CD 9 の発現を認めなかった。しかし動脈硬化巣において、内弾性板付近の平滑筋細胞に CD 9 と proHB-EGF の発現を認め、さらに内弾性板付近の CD 9 陽性平滑筋細胞に接した PCNA 陽性細胞の存在を示した。これにより、*in vivo* での CD 9 の動脈硬化形成への関与と juxtacrine 機構による血管平滑筋細胞増殖の存在が示唆された。また、*in vitro* において、血管平滑筋細胞が juxtacrine 増殖活性をもつことを明らかにした。そして、その juxtacrine 増殖活性が、CD 9 の阻害により、HB-EGF の阻害時と同程度の抑制をうけることを明らかにし、juxtacrine 機構による血管平滑筋細胞増殖における CD 9 の関与を示唆した。また、CD 9 と proHB-EGF の共発現細胞が平滑筋細胞の増殖能を亢進させることも確認している。

本研究は血管平滑筋細胞における juxtacrine 機構による細胞増殖の可能性を示し、動脈硬化巣形成における血管平滑筋細胞の増殖機構を解明する上で、極めて意義深いもので、学位に十分値するものである。