

審査の結果の要旨

氏名 和田洋一郎

本研究は動脈硬化現象における種々の血管壁細胞の役割と動脈硬化誘発因子の同定を目的として、血管平滑筋細胞、内皮細胞および単球、マクロファージ細胞を混合培養する実験系を構築し、泡沫細胞の形成過程の観察、解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. 血管壁混合培養による泡沫細胞形成系の構築.

まず、ウサギ大動脈から平滑筋細胞と内皮細胞を初代培養方法を開発した。次にこれをケモタキシスチャンバーに重層培養して、血管壁モデルシステムを作成した。機能的内皮細胞層が2週間以上維持されることと平滑筋が各種細胞外マトリックスを形成することを示した。酸化 LDL を使用することによって単球の内皮下への遊走現象を形態的かつ定量的に証明した。さらに、マトリックス内に移動後三日目で単球が Mφ に分化をとげること、一週間後には細胞質内に大量の脂肪滴を含む泡沫細胞が出現すること、この細胞が Mφ マーカーを発現していることを示し、泡沫細胞形成系としての有用性を明らかにした。

2. 低酸素培養による平滑筋細胞への脂質蓄積現象の検討.

当混合培養系において最大 5 mg/ml まで LDL 負荷でも泡沫細胞が形成されなかったため、生体内にある生理的な刺激を検討し、低酸素刺激によって混合培養中に脂質蓄積細胞が出現すること、また、これが平滑筋細胞であることを示した。実際に平滑筋細胞を用いて、酸素分圧の低下によって、LDL 負荷による脂質蓄積が亢進すること、これが LDL 粒子の取り込みによること、さらに LDL 受容体を介していないことを明らかにした。さらに細胞質には中性脂肪である Triglyceride が蓄積することを確認し、β 酸化能の低酸素下での低下がその一因であることを明らかにした。

3. 脂質蓄積平滑筋細胞の動脈硬化促進作用の検討.

低酸素下で脂質を蓄積した平滑筋の病変形成促進作用を検討するため、網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果 VEGF, GLUT3, Nip3 など低酸素との関連が知られている遺伝子が含まれており、酸素分圧の影響を反映していることが示された。さら

に leptin, adipophilin など脂肪細胞に類似した遺伝子発現パターンが観察された。また、CL-100, pim-1 等の発現が亢進していることから MAPK 経路とくに p38 経路が活性化している様子が明らかになった。さらに、IL-6, 8, MCP-1 などを盛んに産生して、病変形成に寄与する様子が示された。

4. 複合培養を負荷する混合培養系の構築

未変性リポ蛋白の添加から、Mφ 由来の泡沫細胞形成を観察するため、内皮細胞には力学的刺激を、平滑筋細胞には低酸素刺激を加えつつ白血球とリポ蛋白を高濃度に添加して同時に培養するシステムを構築した。シミュレーションによって、内皮細胞培養面には、乱流刺激が加わることを示した。最初に従来と同様の 6 穴プレート用のケモタキシスチャンバーにウサギ大動脈平滑筋と内皮細胞を重層培養し、さらに、新規に開発した乱流低酸素刺激付き血管壁混合培養装置(MK-2000)にセットして、平滑筋層には低酸素刺激を、内皮細胞には乱流刺激と未変性 LDL を加えて3日間培養した。その後ヒト末梢血単球を加えて、一週間培養を継続したところ、マクロファージ細胞が内皮層を通過してマトリックス内部に移動していることが示された。

以上、ウサギ初代培養血管壁細胞を混合培養した血管壁モデルにおいて、酸化 LDL の使用によってヒト単球からの泡沫細胞形成システムを構築した。生体内では高リポ蛋白血症によって動脈硬化が進展することが知られており、その脂質変性過程を明らかにするため未変性 LDL を添加したところ、低酸素刺激が平滑筋への脂質蓄積を介して動脈硬化に促進的に作用することが明らかになった。さらに単球からの泡沫細胞形成系を構築するために、力学的刺激と低酸素刺激を同時に加える装置を開発した。これは今後動脈硬化の予防及び治療薬のスクリーニングを可能とする基盤技術であり、学位の授与に値するものと考えられる。

(以上)