Mercury compounds induce a rapid increase in procoagulant activity of monocyte-like U937 cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 金子, 寛 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1554

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 277号	学位授与年月日	平成10年 3月 9日
氏名	金子 寛		
論文題目	Mercury compounds induce a rapid increase in procoagulant activity of monocyte-like U937 cells (水銀化合物による単球様細胞 U937 における凝固活性の増強に関する研究)		

博士(医学) 金子 寛

論文題目

Mercury compounds induce a rapid increase in procoagulant activity of monocyte-like U937 cells

(水銀化合物による単球様細胞U937における凝固活性の増強に関する研究)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

水銀の毒性については水俣病をはじめよく知られている。その生物学的影響は多岐にわたり、中毒を起こさない程度の塩化第二水銀をマウスやラットに持続的に投与すると免疫複合体による糸球体障害を起こす。このような炎症組織では、フィブリン沈着を伴った凝固系の活性化は普通にみられ単球、マクロファージや内皮細胞表面に分泌される組織因子によるものと考えられている。この組織因子は膜表面の糖蛋白で外因系凝固カスケードの initiator であり、活性型Ⅶ因子との複合体はX・Ⅸ因子を活性化しトロンビンの生成、フィブリンの沈着を促す。我々は、塩化第二水銀などの重金属が単球系の培養腫瘍細胞である U937細胞に作用し、細胞内カルシウム濃度の上昇とともに組織因子活性を増強することを認めたので報告した。

〔方法〕

U937細胞は増殖期の細胞を使用した。細胞刺激物質は、塩化第二水銀の他に硝酸銀、酢酸フェニル水銀、塩化カドミウム、塩化亜鉛、塩化ニッケルおよびカルシウムイオノフォアを使用した。凝固活性の測定は、2段階凝固法にて行なった。細胞を塩化カルシウム存在下に刺激物質とインキュベートし、塩化カルシウム、正常人血漿を加え凝固時間を測定した。さらに発色合成基質法により組織因子活性を測定した。刺激した細胞と塩化カルシウム、活性型Ⅶ因子、活性型Ⅹ因子の発色基質をインキュベートし、Ⅹ因子を加え反応させた。この反応が蛋白合成を必要とするかみるためアクチノマイシンDやサイクロヘキシマイドを使用した。細胞内カルシウム濃度の測定は、細胞に Fura 2 を負荷し塩化第二水銀を加え、Fura 2 の蛍光の変化を測定した。細胞表面のフォスファチジルセリンは、塩化第二水銀で刺激した細胞と塩化カルシウム存在下での活性型Ⅴ因子と活性型Ⅹ因子によるプロトロンビンの活性化率の上昇から半定量的に測定した。組織因子の免疫学的定量は、¹²⁵I でラベルした組織因子に対する抗体を使用し細胞への結合を測定した。

〔結果〕

U937細胞を塩化第二水銀存在下に培養すると、組織因子由来の凝固活性の増強が認められた。50 μM の塩化第二水銀では15分後に、10 μM の塩化第二水銀では30分後に最高値に達した。硝酸銀、酢酸フェニル水銀、カルシウムイオノフォアも同様に組織因子活性を増強した。この組織因子活性の増強は蛋白合成を必要としなかった。同じ実験条件では塩化カドミウム、塩化亜鉛、塩化ニッケルは組織因子活性の増強を来さなかった。細胞内カルシウム濃度は塩化第二水銀により、濃度依存的に10~12倍に上昇した。硝酸銀、酢酸フェニル水銀、カルシウムイオノフォアでも塩化第二水銀と同様に上昇したが、塩化カドミウム、塩化亜鉛、塩化ニッケルでは上昇しなかった。塩化第二水銀により細胞表面におけるホスファチジルセリンの濃度は約15倍と大幅に上昇したが、細胞表面の組織因子抗原の量は変化しなかった。

〔考察〕

塩化第二水銀などの重金属が U937細胞の組織因子活性を増強した。その特徴は組織因子活性のピークが刺激後短時間（15～30分）に現れ、細胞の蛋白合成を阻害しても影響を受けないことであった。従来、サイトカインや免疫複合体などは単球、内皮細胞に作用して刺激後約2時間で組織因子活性を現し、4時間から8時間後にそれがピークとなる反応が知られており、しかも蛋白合成を必要とした。これとは別のメカニズムで組織因子活性が細胞表面に発現することが認められた。U937細胞の表面にはもともと組織因子が存在するが、生理的な状態では活性が低い。塩化第二水銀は細胞内カルシウムの上昇をきたすのと同じようなメカニズムにより、細胞膜外側層にホスファチジルセリンを露出し細胞表面の極性を変化させ、組織因子活性を大幅に増強するものと考えられた。この反応が水銀化合物の生物学的活性に関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者はSH基をもつメタロプロテイナーゼが凝固系にどのように影響があるか調べていた。メタロプロテイナーゼは水銀イオンにより阻害される。その過程で塩化第二水銀を用いていた所、これが培養腫瘍細胞 U937に組織因子活性を発現させることを見いだした。その機序を調べようとしたのが本研究である。

〔方法と結果〕

U937細胞を培養し、そこに塩化第二水銀、硝酸銀、酢酸フェニル水銀、塩化カドミウム、塩化亜鉛、塩化ニッケル、カルシウムイオノフォアールを用いた。組織因子は血中のⅦ因子と複合体を作り、Xを活性化する。その結果生成されたX₂はプロトロンビンをトロンビンにし、これがフィブリノーゲンをフィブリンにして凝固をおこさせる。従ってアッセイ法として、細胞、カルシウム、Ⅶ₂の存在下で塩化第二水銀などを加え、X₂の活性をS-2222の水解で見る方法、さらに細胞内のカルシウムはfura2を負荷した後、蛍光の変化をみた。また膜のホスファチジルセリンは細胞、X₂、Ⅶ₂、カルシウムを培養し、形成されたプロトロンビナーゼの活性をS-2238の水解で調べた。

その結果、塩化第二水銀は組織因子活性を高め、ホスファチジルセリンの発現を高め、カルシウムの流入を高めることが分かった。しかし抗組織因子抗体を用いた検討では細胞の組織因子の量は塩化第二水銀の添加で変化しなかった。即ち組織因子は構造を変化させ、Ⅶ₂との結合力を上昇させたと考えられた。水銀中毒では多くの組織変化、細胞の変化が引き起こされる。申請者はそれが組織因子の発現亢進、凝固活性の上昇、さらに血栓形成による血流の障害にもよっている可能性があることを示した。

〔結論〕

結論として水銀イオンは細胞膜の組織因子活性を亢進させ、細胞内にカルシウムの流入を高める作用がある。これが水銀イオンの細胞毒の原因の一端を担うと考えられる。

以上の発表の後で、この論文に関する下記のような質問が出された。

- 1) 塩化第二水銀（50 μ M）で細胞障害はでないか
- 2) 水銀によるカルシウムの上昇と組織因子の発現の関係は直接的か

- 3) この作用は細胞のメタロプロテイナーゼ阻害によるものではないか
- 4) 水銀の作用部位は膜のカルシウムチャンネルなのか
- 5) 塩化第二水銀はカルモジュリンの活性に作用するのか
- 6) 塩化第二水銀は糸球体細胞、血小板、HUVECなどにも同じように作用するのか
- 7) シスプラチンのようなプラチナの組織因子発現作用はどうか
- 8) 体内で最も組織因子を発現している部位はどこか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 高 田 明 和

副査 教授 数 井 暉 久 副査 助教授 小 林 隆 夫