Enhanced secretion of tissue plasminogen activator by simultaneous use of retinoic acid and ascorbic acid from tissue cultured gastroepiploic artery

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 吉野, 篤人 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1648

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　３７１号	学位授与年月日	平成１５年　２月２１日
氏　　名	吉　野　篤　人		
論文題目	Enhanced secretion of tissue plasminogen activator by simultaneous use of retinoic acid and ascorbic acid from tissue cultured gastroepiploic artery (レチノイン酸とアスコルビン酸併用刺激による培養胃大網動脈からの組織型プラスミノーゲンアクチベーター分泌の亢進)		

博士(医学)　吉野篤人

論文題目

Enhanced secretion of tissue plasminogen activator by simultaneous use of retinoic acid and ascorbic acid from tissue cultured gastroepiploic artery

(レチノイン酸とアスコルビン酸併用刺激による培養胃大網動脈からの組織型プラスミノーゲンアクチベーター分泌の亢進)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

血管内の線溶活性は組織型プラスミノーゲンアクチベーター(tPA)とプラスミノーゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI-1)のバランスで決定される。tPA は主に血管内皮細胞で産生される。PAI-1 は血管平滑筋、脂肪組織、肝臓で産生されるが、種々の刺激により血管内皮細胞でも産生が高まる。線溶活性の調節機構の検討には培養血管内皮細胞が用いられるが、その培養には増殖因子を含む多くの因子が必要なため、必ずしも生理的状態を反映していない。

今回我々は amorphous calcium phosphate(ACP)でコートした培養プレートを用いることにより、リング状に短切した胃大網動脈を組織培養することに成功した。この方法を用いて血管壁からの tPA と PAI-1 の分泌に対するレチノイン酸(Vit.A)とアスコルビン酸(Vit.C)の影響を検討し、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)での結果と比較した。

〔材料ならびに方法〕

血管組織培養

informed consent が得られた胃切除患者より摘出した胃大網動脈を 2-3mm の厚さに短切し、ACP コートした培養プレートで培養した。10%牛胎児血清を添加した RPMI 1640 培地を用いた。

培養血管の viability の評価

摘出直後と 9 日間培養後の短切胃大網動脈血管組織を HE 染色と免疫染色(抗 vWf 抗体、抗 tPA 抗体、抗 PAI-1 抗体)により比較した。短切胃大網動脈を12日間培養し、培地上清中の tPA と PAI-1 の抗原量を測定してその変動を検討した。

組織培養血管へのビタミン刺激

血管組織を 7 日間培養した後、Vit.A、Vit.C、及びその両者の併用刺激による tPA と PAI-1 の抗原量の変化を比較した。

HUVEC からの tPA と PAI-1 産生の変化

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を 2 %牛胎児血清、rEGF、ステロイド、rFGF-βなどが含まれる専用培地で培養し、Vit.A、Vit.C、その両者の併用刺激(24時間)による tPA と PAI-1 の抗原量の変化を比較した。

〔結果〕

血管組織培養

胃大網動脈の短切組織は培養後も組織的構築は正常に保たれており、抗 vWf 抗体による免疫染色の結果から、血管内皮細胞層も正常であることが確認された。tPA と PAI-1 による免疫染色では両者とも血管

内皮と平滑筋に局在が認められ、新鮮組織と培養後の組織の間に差異は認めなかった。tPA と PAI-1 の産生量も12日間の培養期間を通してほぼ一定に維持されていた。

組織培養血管に対するビタミンの影響

tPA 産生量は Vit.C 添加により 2 倍に増加した。Vit.A 添加群では刺激中には1.5倍に、刺激後は2.7倍に増加した。Vit.A と Vit.C の併用添加群では刺激中に1.7倍に、刺激後に3.2倍に増加した。PAI-1 の産生量は Vit.C 添加群で低下傾向にあった。

HUVEC に対するビタミンの影響

tPA の産生量は Vit.C 刺激中は増加しなかったが、刺激後には約 2 倍に増加した。Vit.A 添加では刺激中(約2.5倍)および刺激後に増加した。Vit.A、Vit.C 併用では刺激後に 3 倍となった。PAI-1 の産生量については有意な変化はなかった。

〔考察〕

Vit.A や Vit.C によって tPA 活性や線溶活性が培養哺乳動物血管内皮細胞の培養液中で増加することが報告されてきた。本研究によってヒト血管組織培養でも Vit.A と Vit.C 及びその併用刺激により tPA 抗原が増加することが確認できた。

Vit.A は培養血管内皮細胞において retinoic receptor-αへの結合を介して tPA の合成を増加させることが報告されている。しかし Vit.C が tPA 活性を増強するメカニズムは明らかにされていない。抗酸化作用によって過酸化リポ蛋白等による PAI-1 の誘導を抑制して tPA 活性を増強するとの仮説もある。しかし今回の結果より Vit.C が培養血管内皮細胞および培養血管で直接 tPA 産生量を増加させることが明らかになった。

本研究で Vit.C 添加により培養血管組織からの PAI-1 産生量は減少傾向にあったが、HUVEC からの PAI-1 産生の抑制は認めなかった。平滑筋など血管内皮細胞以外の細胞における PAI-1 の産生が抑制されることによると考えられ、血管壁構造全体での検討の有用性が示された。

〔結論〕

本研究においてリング状に短切した血管が ACP コートした培養プレートで培養可能であることを示した。これを用いて Vit.A と Vit.C が血管壁に対して線溶促進に働くことを示した。

論文審査の結果の要旨

血管内の線溶活性は組織型プラスミノゲンアクチベーター(tPA)とプラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1(PAI-1)のバランスで決定される。tPA は主に血管内皮細胞で産生され、PAI-1 は血管平滑筋、脂肪組織、肝臓で産生されるが、種々の刺激により血管内皮細胞でも産生が高まる。そこで申請者は、血管を組織培養し、内皮細胞と平滑筋細胞が共存した状態での tPA および PAI-1 の産生調節を観察することができる培養系の開発を試みた。さらに、その培養系を用いて、レチノイン酸(Vit.A)とアスコルビン酸(Vit.C)による tPA および PAI-1 産生への影響を検討した。

方法は以下の通りである。

まず、血管組織培養の開発を試みた。informed consent が得られた胃切除患者より摘出した胃大網動脈を 2-3mm の厚さに短切し、amorphous calcium phosphate(ACP)コートした培養プレートで10%牛胎児血清

を添加したRPMI 1640培地を用いて培養した。培養血管のviabilityの評価をするために、摘出直後と9日間培養後の血管組織をHE染色と免疫染色(抗vWf抗体、抗tPA抗体、抗PAI-1抗体)をした。短切胃大網動脈を12日間培養し、培地上清中のtPAとPAI-1の抗原量を測定してその変動を検討した。

続いて、血管組織を7日間培養した後、Vit.A、Vit.C、及びその両者の併用刺激によるtPAとPAI-1の抗原量の変化を比較した。

さらに、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)においてVit.A、Vit.C、その両者の併用刺激によるtPAとPAI-1の抗原量の変化を比較した。

結果は以下の通りである。

胃大網動脈の短切組織は培養後も血管構築や内皮細胞は正常に保たれていた。tPAとPAI-1による免疫染色では両者とも血管内皮と平滑筋に局在が認められ、摘出直後と培養後の組織の間に差異は認められなかった。tPAとPAI-1の産生量も12日間の培養期間を通してほぼ一定に保たれていた。

tPA産生量はVit.CおよびVit.A添加で増加した。PAI-1の産生量はVit.C添加により低下した。

HUVECにおいてtPAの産生量はVit.CおよびVit.A添加で増加した。PAI-1については変化しなかった。

以上の結果から、申請者はACPコートした培地で血管組織を培養することが可能であることを示した。さらに、Vit.AやVit.CによってtPA抗原量が増加することを示した。また、内皮細胞だけの培養系と血管組織培養系ではVit.CによるPAI-1産生量への影響が異なったことを示した。

委員会では、血管組織の培養系を確立したことと、Vit.AおよびVit.CにおけるtPAおよびPAI-1の産生調節を解明したことを高く評価した。

本論文内容の説明の後、論文内容と関連の深い以下の点について申請者との間に質疑応答がなされた。

1) ビタミンCによるtPA産生亢進のメカニズムについて
2) ビタミンCによるPAI-1産生抑制のメカニズムについて
3) amorphous calcium phosphateと血管組織との接着について
4) 胃大網動脈を実験に用いた理由について
5) 培養血管におけるtPAとPAI-1産生のtime courseについて
6) tPA、PAI-1のELISA測定法について
7) ビタミンCによりtPA産生が亢進した細胞について
8) ビタミンAによるtPA産生亢進のメカニズムについて
9) ビタミンA、ビタミンCの添加濃度の設定根拠について
10) vWfを内皮細胞マーカーとしたことについて
11) 血管平滑筋細胞がtPA抗体で染色されたことについて

以上の質問に対する申請者の解答は概ね適切であり、問題点も十分理解しており、本論文は博士(医学)の学位授与にふさわしい内容を備えていると審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者　主査　梅村和夫
副査　金山尚裕　副査　渡邉裕司