

氏 名 (本籍)	はし 橋	つゆ 爪	えい 英	じ 二
学位の種類	博 士 (医 学)			
学位記番号	医 第 3009 号			
学位授与年月日	平成 9 年 9 月 10 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当			
最終学歴	昭和 62 年 3 月 25 日 東北大学医学部医学科卒業			
学位論文題目	血管平滑筋細胞増殖に対する T リンパ球由来増殖 因子の検討			

(主 査)

論文審査委員	教授 里 見	進	教授 田 林 暁 一
	教授 佐 藤 靖 史		

論文内容要旨

研究目的

動脈硬化巣でのTリンパ球の役割はいまだ明らかではない。培養細胞を用い、血管平滑筋細胞増殖に対するTリンパ球由来増殖因子について検討する。

研究方法及び結果

マウス及びヒトのTリンパ球分離後24時間までのTリンパ球調整培地に血管平滑筋細胞増殖作用が認められた。この分離後24時間までのマウスTリンパ球調整培地の平滑筋細胞増殖作用における、bFGFの関与を調べるために中和抗体を用い検討した。その結果、分離後24時間までの調整培地には、bFGFの活性は認められなかった。さらにマウスTリンパ球におけるbFGF-mRNAの発現をRT-PCR法にて検討すると、分離後24時間までは、bFGF-mRNAの発現を認めなかった。一方、IL-2 (50U/ml) 及び、ConA (1 μ g/ml) 添加による刺激を加えると、IL-2添加群で非添加群と差異を認めなかったが、ConA添加群で分離後12時間でbFGF-mRNAの発現を認めた。この分離後24時間の調整培地中の増殖因子を検討するため、Heparin-Sepharose columnを用い調整培地を分離した。非結合分画、1M NaCl遊離分画、1.5M NaCl遊離分画中の小分子量及び、大分子量の分画と、2M NaCl遊離分画の5分画に分けられた。血管平滑筋細胞増殖活性は、非結合分画、1.5M NaCl遊離の大分子量分画、2M NaCl遊離分画の3分画に認められ、非結合分画に最も強い活性が存在した。

次にTリンパ球調整培地の経時的变化を調べるためマウスTリンパ球を、無血清培地 (SFH) 及び、IL-2 (50U/ml) を添加した2群で、2日毎に培地を回収し1週間培養した。この調整培地による血管平滑筋細胞増殖活性は経時的に増強した。しかしIL-2添加の有無による差異を認めなかった。

これら経時的に採取したヒトおよびマウスの調整培地について、Western blotting法によりbFGFの存在を検討した。bFGFは、Tリンパ球分離後24時間から1週間まで認められ、時間とともに増加した。IL-2の添加の有無について検討すると、bFGFでは明らかな差を認めなかった。RT-PCR法にてbFGF-mRNAの発現を検討すると、IL-2の添加の有無に関係なく分離後48, 72時間にbFGF-mRNAの発現を認めた。次に、これらの調整培地中のHB-EGFの存在をWestern blotting法にて検討した。HB-EGFはTリンパ球分離後24時間から1週間まで認められ、経時的に減少していた。IL-2の添加の有無について検討すると、HB-EGFでは、IL-2添加群でむしろ発現が低下していた。

考 察

最近 Srully Blotnick らが *In vitro* において、IL-2 で 1 週間刺激した T リンパ球が bFGF, HB-EGF を分泌していることを報告した。我々の検討においては、分離後 24 時間の T リンパ球調整培地に血管平滑筋細胞増殖を亢進させる作用が認められた。この分離後 24 時間の T リンパ球調整培地の平滑筋細胞増殖作用は、bFGF の関与を認めず、また bFGF-mRNA も、分離後 24 時間まではその発現を認めなかった。IL-2 添加群及び ConA 添加群での bFGF-mRNA 発現の検討では、IL-2 添加群では非添加群と差異を認めず、ConA 添加群では 12 時間で発現した。以上のことより、T リンパ球は、IL-2 添加による刺激以外の何らかの刺激により bFGF を発現すると考えられた。カラムによる検討では、この T リンパ球分離後 24 時間までの調整培地において平滑筋細胞増殖活性を最も強く認めた分画が Heparin 非結合分画であった。HB-EGF は、非常に強い Heparin 親和性をもち、Heparin 非結合分画において認められたこの平滑筋細胞増殖活性は、bFGF, HB-EGF 以外の新しい増殖因子による可能性が考えられた。

経時的に T リンパ球を培養すると、その調整培地の血管平滑筋細胞増殖活性は、IL-2 添加の有無に関係なく増強した。bFGF, HB-EGF はともに Western blotting 法にて分離後 24 時間から 1 週間まで培地中に存在した。これら bFGF, HB-EGF は IL-2 の添加と関係なく、経時的にその発現量を変化させ、調整培地全体の活性としては増強していくと考えられた。しかし、調整培地の平滑筋細胞増殖活性の増加を、bFGF, HB-EGF の変化だけでは説明できず、分離後 24 時間までの調整培地で認められた Heparin 非親和性物質の関与も考えられた。

以上の事より、T リンパ球は、動脈硬化巣において自らも活性化され、bFGF, HB-EGF, Heparin 非親和性物質を発現し、周囲の細胞に多様な影響を与え、動脈硬化巣の発生進展に重要な役割を果たしていると考えられた。

審査結果の要旨

動脈硬化の病態を慢性の炎症反応と理解した場合、Tリンパ球は、動脈硬化巣において重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら動脈硬化巣におけるTリンパ球の役割についてはいまだ明らかではない。本研究ではTリンパ球培養を行い、その調整培地の培養血管平滑筋細胞増殖に対する作用を検討し、さらに調整培地中の平滑筋細胞増殖活性物質の詳細な検討を行っている。

ヒト末梢血及びC57BL/6J雌マウスの脾臓細胞より分離したTリンパ球を無血清培地で24時間培養し、その調整培地のウサギ血管平滑筋細胞増殖能を検討した。調整培地中のbFGF (basic fibroblast growth factor)の有無について中和抗体を用いた検討と、RT-PCR法によるmRNAの発現の検討を行った。さらにヘパリン・セファロースカラムを用い、各分画の平滑筋増殖活性の有無についても検討した。また、Tリンパ球分離後24時間から1週間までの調整培地の平滑筋細胞増殖活性の変化について検討し、それらの培地中のbFGFについてWestern blotting法、mRNAの発現をRT-PCR法で検討した。調整培地中のHB-EGF (heparin binding EGF like growth factor)についてもWestern blotting法を用い検討した。

その結果、分離後24時間までのTリンパ球調整培地には血管平滑筋細胞増殖能を認め、ヘパリン非親和性分画に最も強い活性が存在した。bFGFは、分離後24時間までの調整培地中に活性を認めず、mRNAも分離後48時間以降に発現をみとめた。一方Tリンパ球にIL-2、ConAを添加し刺激すると、IL-2添加したTリンパ球ではbFGF-mRNAの発現は差異を認めないものの、ConA添加ではbFGF-mRNAの発現が分離後12時間と早まった。

以上よりTリンパ球におけるbFGFの発現にはIL-2とは別の何らかの刺激が必要と考えられた。Tリンパ球分離後24時間から1週間の調整培地の平滑筋細胞増殖作用は、経時的に増強した。それらの調整培地中にはbFGF、HB-EGFが存在し、bFGFは漸増し、HB-EGFは漸減する傾向を示し、Tリンパ球調整培地中の血管平滑筋細胞増殖因子は経時的にその発現量を変化させる可能性が示唆された。

本研究ではヒト及びマウスTリンパ球は、分離直後より血管平滑筋細胞増殖作用をもち、この作用には、3種類の増殖因子の関与が考えられた。Tリンパ球の細胞増殖活性について、従来考えられていたサイトカイン以外の、未知の因子を含む増殖因子の関与を明白にしたことは、極めて独創的な研究である。また種々の疾患におけるTリンパ球の作用を究明する上で、新たな機能の面から検討する端緒を示した点で意義のある研究である。それ故、本研究は学位授与に値するものである。