

氏 名 (本籍) なか むら あき ひろ
 中 村 明 浩

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 第 3 0 7 3 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 0 年 9 月 9 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 6 3 年 3 月 1 2 日
 岩 手 医 科 大 学 医 学 部 卒 業

学 位 論 文 題 目 Smooth muscle cells derived from small and
 larger arteries exhibit distinct morphology
 and growth in culture.
 (異なる形態と増殖能を示す細い血管と太い血管
 の平滑筋細胞)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 白 土 邦 男 教 授 田 林 暁 一

 教 授 名 倉 宏

論文内容要旨

【背景と目的】

動脈硬化や高血圧などに伴う多くの血管性病変には、血管平滑筋細胞の異常な増殖が関与しており、これらの病変には同一血管床でも発生部位や程度に差が認められる。たとえば、同一血管床において、粥状動脈硬化による内膜肥厚は太い血管で起こりやすく、細い血管では起こりにくい。高血圧による中膜肥厚は太い血管より細い血管で起こりやすい。

一方、最近、血管壁に存在する中膜血管平滑筋細胞は homogeneous なものではなく、 heterogeneous な細胞集団であることが報告されている。

これらの観察から、同一血管床の細い動脈と太い動脈では異なる subtype の血管平滑筋細胞が存在するのではないかという仮説を立てた。

本研究の目的はこの仮説を検証するため、同一血管床のより細い動脈と太い動脈から各々の平滑筋細胞を単離、培養し、両者の細胞形態と増殖能を比較検討することである。

【方 法】

同一血管床としてラットの腸間膜動脈を用い、細い血管（内径： $85 \pm 19 \mu\text{m}$ ）は同血管の抹消側から、太い血管（内径： $867 \pm 33 \mu\text{m}$ ）は中枢側から各々摘出した。この際、小腸から腸間膜を切除し、腸間膜動脈起始部から 5% 酸化鉄を含んだ培養液を注入した後に、磁石を用い動脈のみを選択的に単離した。この動脈組織片を酵素処理をした後に培養皿にエクスプラントし、 37°C 、5% CO_2 ・95% O_2 の条件下で培養した。エクスプラントより血管平滑筋細胞が遊離、増殖し、コンフルエントの状態時に、0.05% トリプシン-EDTA を用いて細胞を剥離、継代し、1:2 または 1:3 でスプリットし、培養を繰り返した。培養平滑筋細胞の同定は抗平滑筋細胞 α アクチン（抗 α SM アクチン）抗体による染色陽性所見により行った。細胞形態は位相差顕微鏡による観察と抗 α SM アクチン抗体を用いた免疫および蛍光染色法による観察で行った。増殖能は、血清、PDGF、機械的伸展刺激時の ^3H -クミジン取込みによる DNA 合成能、細胞数の経時的変化およびその倍加時間で検討した。実験には、8 あるいは 16 継代細胞を用いた。

【結 果】

コンフルエントの形態は、細い血管から得られた平滑筋細胞（以下、S-SMCs）で顕著な hill-and-valleys を呈する細胞配列像を示したのに対し、太い血管から得られた平滑筋細胞（以下、L-SMCs）ではシート状ないし渦巻き状の細胞配列像を示した。

個々の細胞形態は、S-SMCs, L-SMCs のいずれにおいても両極に細長い紡錘形を呈した細胞 (bipolar cells) と胞体の大きい、多形性の細胞 (polygonal cells) が認められたが、S-SMCs では bipolar cells が $52 \pm 2\%$ 、polygonal cells が $22 \pm 1\%$ と bipolar cells が多くを占められていたのに対し、L-SMCs では bipolar cells が $25 \pm 1\%$ 、polygonal cells が $55 \pm 3\%$ と polygonal cells が多くを占めていた。

抗 α SM アクチン抗体を用いた蛍光染色法による観察では、S-SMC のアクチン線維は両極に並行してみられ、一方、L-SMC では核から放射状に走行してみられた。

これら細胞形態の相違は第 16 継代の培養平滑筋細胞でも認められた。

5% および 20% 血清刺激による ^3H -チミジン取込み能は、5% 血清刺激で、 1.9 ± 0.1 倍、20% 血清刺激で 1.5 ± 0.1 倍と S-SMCs が L-SMCs に比べ有意に高かった。また、細胞数の増加速度も有意に S-SMCs で高く、その倍加時間は S-SMCs が 46 ± 4 時間、L-SMCs が 68 ± 5 時間と S-SMCs が L-SMCs に比べ有意に短かった。PDGF-AB (5, 10, 20ng/ml) 刺激による ^3H -チミジン取込み能および細胞数の増加速度も、S-SMCs が L-SMCs に比べ有意に高く、倍加時間は S-SMCs で 52 ± 4 時間、L-SMCs で 75 ± 1 時間であった。10% 機械的伸展刺激による ^3H -チミジン取込み能も S-SMCs が L-SMCs に比べ有意に高かった。

【考 察】

同一血管床の細い動脈と太い動脈から得られた平滑筋細胞の形態は異なり、増殖能にも差を認めた。血管径の異なる部位では異なった性質を有する平滑筋細胞の集団から構成されていると考えられた。血管中膜平滑筋細胞は heterogeneous な細胞集団であるとする報告はこれまでもあるが、同一血管床の太い部位と細い部位では異なった性質を有する平滑筋細胞が存在することを示した報告はこれまでにない。本研究の結果は、何故高血圧や動脈硬化などにおける血管平滑筋細胞の異常な増殖が血管径の大きさによって異なるのか、何故、臓器への血流供給の調節に果たす役割が大きな血管と小さな抵抗血管とで異なるのかといった病的あるいは機能的な病態解明の大きな第一歩である。

審査結果の要旨

本論文は同一血管床の細い動脈と太い動脈では異なる subtype の血管平滑筋細胞が存在することを証明した研究である。

動脈粥状硬化病変あるいは高血圧性血管病変形成は部位により異なる。また、臓器血流調節の面からみた機能も径の大きい血管、小さい血管によって異なる。そこで、本研究では、同一血管床の細い動脈と太い動脈では異なる subtype の血管平滑筋細胞が存在するのではないかという仮説を立て、この仮説を検証するため、同一血管床のより細い動脈と太い動脈から各々平滑筋細胞を単離、培養し、両者の細胞形態と増殖能を比較検討したものである。

同一血管床としてラットの腸間膜動脈が用いられ、細い血管（内径： $85 \pm 19 \mu\text{m}$ ）は同血管の末梢側から、太い血管（内径： $867 \pm 33 \mu\text{m}$ ）は中枢側から各々摘出された。この際、動脈のみを選択的に単離するために、あらかじめ腸間膜を小腸から切除し、その後腸間膜動脈起始部から5%酸化鉄を含んだ培養液を注入し、磁石を用いて動脈のみを回収するという工夫がなされた。そして、この動脈組織片を酵素処理した後、培養皿にエクスプラントし、継代・培養して平滑筋細胞が得られた。細胞形態は位相差顕微鏡による観察と抗 αSM アクチン抗体を用いた免疫および蛍光染色法による観察で行われ、増殖能は血清、PDGF、機械的伸展刺激時の ^3H -チミジン取込みによるDNA合成能、細胞数の経時的変化およびその倍加時間で検討された。

コンフルエントの形態は、細い血管から得られた平滑筋細胞（以下、S-SMCs）で顕著な hill-and-valleys を示したのに対し、太い血管から得られた平滑筋細胞（以下、L-SMCs）ではシート状ないし渦巻き状を示した。個々の細胞形態は、S-SMCs、L-SMCs のいずれにおいても両極に細長い紡錘形を呈した細胞（bipolar cells）と胞体の大きい、多形性の細胞（polygonal cells）が認められたが、S-SMCs では bipolar cells 多く占められていたのに対し、L-SMCs では polygonal cells が多くを占めていた。S-SMC のアクチン線維は両極に並行してみられ、一方、L-SMC では核から放射状に走行してみられた。血清刺激、PDGF、機械的伸展刺激による ^3H -チミジン取込み能は、S-SMCs が L-SMCs に比べ有意に高く、細胞数の増加速度も有意に S-SMCs が高かった。以上の結果から、同一血管床の細い動脈と太い動脈から得られた血管平滑筋細胞はその形態が異なり、増殖能にも差があることが示された。

血管中膜平滑筋細胞は heterogeneous な細胞集団であるとする報告はこれまでもあるが、同一血管床の太い部位と細い部位では異なった性質を有する平滑筋細胞が存在することを示したのは本研究が初めてである。本研究の結果は、何故高血圧や動脈硬化などにおける血管平滑筋細胞の異常な増殖が血管径の大きさによって異なるのか、何故、臓器への血流供給の調節に果たす役割が大きな血管と小さな抵抗血管とで異なるのかといった病的あるいは機能的な病態解明の大きな第一歩であり、博士論文に値するものと考えられる。