氏名(本籍)	三浦賢司（東京都）
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博甲第1019号
学位授与年月日	平成4年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	酸化的ストレスによる血管内皮細胞のシスチン取り込みとグルタチオンレベルの変化（Dissertation形式）

主査	筑波大学教授	医学博士	藤木素士
副査	筑波大学教授	医学博士	阿部帥
副査	筑波大学教授	薬学博士	後藤勝年
副査	筑波大学教授	医学博士	田村昇
副査	筑波大学助教授	医学博士	山根一秀

論文の要旨

〈目　的〉

酸化的ストレスの防御には，多くの細胞でグルタチオンが重要な役割を果たしていることが知られている。グルタチオンの細胞内レベルは，シスチンの取り込みによって維持されていることが培養細胞による研究で指摘されている。本研究は，ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を分離，培養して，シスチンの取り込みについて解析し，その取り込みを媒介する輸送系が細胞内のグルタチオンレベルの維持に果している役割を検討するとともに，酸化的ストレスを負荷したとき，シスチン輸送や細胞内のグルタチオンレベルがどのように応答するかについて調べることを目的とした。

〈方　法〉

ヒト臍帯静脈より血管内皮細胞を単離し，ウシ胎児血清，エンドテリアルマイトジェン，ヘパリンを含むMCDB107培養液を用い，37°C，湿度100%，5%CO_2，95%空気の条件下で培養した。使用した細胞はコンフルエント時に敷石状の形態を示し，免疫蛍光法により第Ⅷ因子関連抗原を確認することにより血管内皮細胞であることを同定した。

細胞集団倍加数が9～23の細胞を用いて，^{3}Hでラベルされたアミノ酸を取り込ませ，アミノ酸輸送系を解析した。グルタチオンの定量はTietzeの方法により行った。細胞内アミノ酸の定量は，グリシンとグルタミン酸についてはアミノ酸分析機（JEOLJLC-300）を用いて行た。システインについては分光蛍光光度計により測定した。酸化的ストレスの負荷は，血管内皮細胞を播種して1日培養した後，培地にキサンチンオキシダーゼ（XO）を加えることによりO_2^-，H_2O_2を負荷した。培地

中のH_2O_2濃度は，ルミノールを用いた化学発光法により測定した。XOによるO_2^-の発生はSODによって阻害されるフェリチトクロームCの還元を，550nmの吸光度を測定することにより求めた。

〈結果と考察〉

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞によるシスチン取り込みはNa^+に依存しないことがわかった。また，グルタミン酸，ホモシステイン酸，α-アミノアジピン酸などの酸性アミノ酸によって強く阻害された。これらのアミノ酸はXc^-系のアミノ酸輸送系の基質であるが，Xc^-系の基質でないアスパラギン酸によってほとんど阻害されなかった。グルタミン酸によるシスチン取り込みの阻害型式は競合阻害であった。このことから血管内皮細胞によるシスチン取り込みは，Xc^-系によって行われていることがわかった。

血管内皮細胞を，メチオニンは含むがシスチンを含まない培地で培養すると，細胞内のグルタチオンレベルは急速に低下した。グルタミン酸を過剰に加えて培養するとグルタチオンレベルは低下し，システインレベルも対照に比しいちじるしく低下した。しかし，このときシスチンを加えると，細胞内グルタチオンレベルの低下は認められなかった。これらのことから，細胞内のグルタチオンレベルはシスチン取り込みに依存していることがわかった。

シスチン取り込み活性は，H_2O_2によって誘導され，上昇する。細胞内のグルタチオンレベルはH_2O_2によって低下した。これは，細胞内から細胞外へのグルタチオン輸送が促進されたためと考えられた。

以上のことから，シスチン取り込み活性の上昇は，細胞の酸化的ストレスに対する誘導現象であり，細胞内のグルタチオンを補うように働くことにより，酸化的ストレスに対する防御機構としての役割を果していると考えられた。

審　査　の　要　旨

本論文は，ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を培養してシスチン輸送系の解析を行い，さらに酸化的ストレスを加えて，シスチン取り込み活性および細胞内のグルタチオンレベルを調べ，シスチン取り込み活性の上昇は，細胞の酸化的ストレスに対する誘導現象で，細胞内グルタチオンを補うように働くことにより，酸化的ストレスに対する防御機構としての役割を果たしていることを示唆したものであり，博士（医学）学位論文として十分評価に値するものと判断される。

よって，著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。