

氏名(本籍)	やま した ゆう こ (東京都)		
学位の種類	医 学 博 士		
学位記番号	博 甲 第 777 号		
学位授与年月日	平成 2 年 3 月 23 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	Effects of Heparin on Proliferation of Endothelial Cells, Vascular Smooth Muscle Cells and Fibroblasts of the Lung (肺の内皮細胞, 平滑筋細胞, 線維芽細胞の増殖に対するヘパリンの作用) (dissertation 形式)		
主 査	筑波大学教授	医学博士	小 形 岳 三 郎
副 査	筑波大学教授	医学博士	阿 部 帥
副 査	筑波大学教授	医学博士	上 野 賢 一
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	三 井 清 文

論 文 の 要 旨

〈目 的〉

肺の線維化性病変の成り立ちには昔から肥満細胞の関与が病理形態学的に示唆されてきたが、その機序については未だ十分に解明されていない。一方、肥満細胞の顆粒内に含まれるヘパリンの作用として、従来細胞増殖に対してむしろ抑制効果が強調されてきた。

本研究では、肺を構成する非上皮性の細胞即ち血管内皮細胞、血管平滑筋細胞及び線維芽細胞の増殖に対するヘパリンの作用を、各々の自家樹立した培養細胞を用いて検討すると共に、内皮細胞由来の細胞増殖因子である basic fibroblast growth factor (bFGF) の存在下でのヘパリンの作用についても検討することによって、肺障害に続いて生じる増殖性病変の成り立ちの機序を解明しようとするを目的とした。

〈材料及び方法〉

1) 肺血管系細胞に対するヘパリンの作用

標的培養細胞として子牛の肺動脈より自家樹立した内皮細胞株と平滑筋細胞株を用い、bFGF とヘパリンを別々に種々の濃度に培養液に加え、3日後に細胞数を測定し、これらの細胞の増殖に及ぼす影響をみた。次に 1 ng/ml bFGF と種々の濃度のヘパリンとを同時に培養液に加え、3日後に細胞数を測定し、両者の相加作用の有無に就いて検討した。

この内皮細胞培養系に於いて毛細血管様構造物を形成する事に成功したので、その電子顕微鏡的

観察も行った。

2) 肺間質細胞に対するヘパリンの作用

標的培養細胞としてヒト胎児肺より自家樹立した diploid の線維芽細胞株 (TIG) を用い、上記と同様な方法にて、ヘパリンの細胞の増殖に及ぼす影響をみると共に、0.01ng/ml または 0.3ng/mg の bFGF と種々の濃度のヘパリンを同時に培養液に加え、両者の相加作用の有無に就いて検討した。

次に、ラット腹腔の肥満細胞を compound48/80 にて刺激し放出反応を起こさせた培養上清液を用いて、線維芽細胞に対する細胞増殖促進効果を確認した上、その効果がヘパリンナーゼ並びにプロタミン (ヘパリン拮抗剤) により阻害されるか否かを検討した。

<結 果>

1) 肺血管系の内皮細胞、平滑筋細胞に対するヘパリンの作用

- a) 内皮細胞に対してヘパリンは検索した全ての濃度にてその増殖抑制を示した。これに対し、平滑筋細胞に対して高濃度では抑制したが、低濃度 (1 ug/ml 以下) にて軽度ながら増殖促進効果がみられた。
- b) bFGF の存在下では、低濃度のヘパリンにても内皮細胞、平滑筋細胞共に、強い増殖促進効果を示した。
- c) この内皮細胞の増殖過程に於いて、培養系において毛細管様構造物を形成させる事に成功し、電顕的にも毛細血管と類似していた。

2) 肺間質の線維芽細胞に対するヘパリンの作用

- a) 肺線維芽細胞に対して、高濃度 (10ug/mg 以上) のヘパリンでは増殖抑制効果を示したが、低濃度 (0.01-10ug/ml) ヘパリンでは 2 相性の増殖促進効果を示した。
- b) bFGF の線維芽細胞の細胞増殖作用もヘパリンにより著しく増強した。
- c) 肥満細胞を compound48/80 にて刺激してえた上清液は線維芽細胞の増殖活性を示し、その活性はヘパリンナーゼ及びプロタミン処理にて減少したことから、実際に肥満細胞由来のヘパリンが線維芽細胞の増殖活性を有することを明らかにした。

<考察及び結論>

従来、ヘパリンの細胞増殖抑制効果が強調されてきたが、今回の実験にて、ヘパリンのすべての濃度にて増殖抑制効果がみられたのは内皮細胞のみで、平滑筋細胞や線維芽細胞では低濃度にて増殖促進効果が観察された。このことは今回は低濃度のヘパリンの効果まで検討した結果と考えられる。

更に、このヘパリンの増殖促進効果が bFGF の存在下で増強することを明らかにした。その理由は明らかではないが、bFGF とヘパリンと結合性があることに関係していると考えられる。

審 査 の 要 旨

山下氏は in vitro の実験系にて、低濃度のヘパリンは平滑筋や線維芽細胞に対してむしろ増殖促進

効果があることを指摘し、更に、内皮細胞より分泌されると考えられている bFGF の存在下では、その増殖促進効果が増強することを明らかにした。このことは肺血管障害時に生じる血管壁や間質における筋細胞や線維芽細胞の増殖する機序に内皮細胞由来の bFGF と肥満細胞由来のヘパリンの相乗作用を考慮すべきことを示しており、細胞間の interaction の面からの肺血管や肺間質の病変の解明に大きく貢献した論文である。特に、高度な技術を必要とする内皮細胞の培養をもとにした研究であり、この分野では評価の高い論文である。

よって、著者は医学博士の学位を受けるに十分な資格があるものとみとめる。