

氏名(本籍)	かわしまやすこ 川島泰子(東京都)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2419号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	血管内皮細胞の抗凝固および抗血小板凝集特性に対する TNF- $\alpha$ の影響
主査	筑波大学教授 医学博士 山田 巖
副査	筑波大学教授 医学博士 田中直見
副査	筑波大学助教授 医学博士 戸村成男
副査	筑波大学助教授 医学博士 長田道夫

## 論文の内容の要旨

### (目的)

血管内皮細胞が有する抗凝固・抗血小板凝集特性は、生理的状态における血栓形成の抑制作用を有し、その破壊は血栓形成とそれに続く臓器障害をもたらす。血管内皮細胞障害が深く関わりと考えられる敗血症性 disseminated intravascular coagulation (DIC) の発症機転について、そのメディエーターである炎症性サイトカイン tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) が血管内皮細胞の抗凝固・抗血小板凝集特性に与える影響を検討した。本研究の目的は凝固特性に関しては、アポトーシスに伴い細胞膜外層に発現する phosphatidylserine (PS) の作用に焦点をあて、PS発現への caspase 活性や酸化ストレスの関与について、抗血小板凝集特性に関しては ecto-5'-nucleotidase (5'-NT) の関与に焦点をあて、TNF- $\alpha$  による影響とその機序を明らかにすることにある。

### (対象と方法)

TNF- $\alpha$  刺激時のヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) のアポトーシスを観察した。また、HUVEC の凝固特性として tissue factor (TF) 活性、TF 抗原量および prothrombinase 活性を測定し、TNF- $\alpha$  による影響を評価した。Annexin V による阻害実験から、これら向凝固特性における PS の影響を評価した。向凝固特性誘導における caspase 及び酸化ストレスの関与を、caspase-3 阻害剤あるいは抗酸化剤の影響から検討した。5'-NT の活性は、HUVEC 上でインキュベートした adenine nucleotide の血小板凝集抑制作用と nucleotidase 活性から評価し、HUVEC の抗血小板凝集特性における 5'-NT の活性の役割を評価し、続いて 5'-NT の活性への TNF- $\alpha$  及び酸化ストレスの影響を検討した。

### (結果)

TNF- $\alpha$  は、HUVEC にアポトーシスを誘導するとともに向凝固特性 (TF 活性、prothrombinase 活性) を発現させた。Annexin V の中和作用から、この向凝固特性は表出する PS の触媒活性に強く依存することが示された。caspase-3 阻害剤、抗酸化剤の影響から、この PS 発現の課程に caspase-3 活性、酸化ストレスが関与する可能性が示唆された。HUVEC 上の 5'-NT は AMP から adenosine を産生し、血小板 ADP 凝集を抑制した。5'-NT 阻害剤を用いた結果から、5'-NT は特に ADP 低濃度域で抑制効果を発揮し、血小板凝集の閾値を上げる働きがあると考えら

れた。また、TNF- $\alpha$ は、HUVECの5'-NT活性を低下させたが、抗酸化剤の添加がこれを抑制した。膜結合型5'-NTの活性は酸化ストレスに感受性を示したが、可溶型5'-NT活性は影響を受けず、脂質過酸化の影響が考えられた。

#### (考察)

TNF- $\alpha$ は、未刺激では抗凝固特性を示すHUVECに著明な向凝固特性を誘導した。この向凝固特性は、アポトーシスに伴い細胞表面に表出したPSに強く依存しており、TF等の凝固触媒蛋白の発現のみならず細胞膜リン脂質の変化が血栓形成に深く関わると考えられた。また、caspase-3活性はDNA断片化のみならずPS表出の過程にも関与する可能性が示された。酸化ストレスもまたPS表出に促進的に関与する可能性が示唆された。その機序としては脂質輸送体の活性の変化やPS自身の過酸化による輸送効率の低下が考えられる。HUVECのecto-5'-NTは、adenosine産出により血小板ADP凝集を抑制した。内皮細胞の抗血小板凝集特性には、アゴニストを分解するATP diphosphohydrolase (ATPDase) の関与も大きい。5'-NT活性を阻害すると特にADPの比較的低濃度域で血小板凝集が亢進するため、5'-NTは内皮細胞上での血小板凝集反応の閾値を上げ、ATPDaseと5'-NTが協調して血小板凝集を素子していると考えられた。5'-NTの基質であるAMPはATPDaseの代謝産物であるため、両者が協調することが必要であり、両者の活性を低下させるTNF- $\alpha$ は、血小板凝集を亢進させると考えられた。また、TNF- $\alpha$ による5'-NT活性の抑制には、酸化ストレスの関与が示唆された。

#### (結論)

1. TNF- $\alpha$ によりHUVECは向凝固特性を獲得した。この向凝固特性には、アポトーシスに伴い表出するPSの触媒活性が深く関与していた。また、このPS表出の過程にcaspase-3及び酸化ストレスが関与する可能性が示唆された。
2. HUVECは、ATPDaseと5'-NTの協調的なadenine nucleotide代謝により抗血小板凝集特性を示し、5'-NT活性は血栓形成の初期段階において抑制作用を示すと考えられた。
3. TNF- $\alpha$ はHUVECの5'-NT活性を抑制し、血小板凝集を亢進させた。
4. 5'-NT活性の低下に酸化ストレスが関与する可能性が示唆された。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、血管内皮障害に基づく凝固障害のモデルにヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて、(1) 敗血症性DICの発生機序における血管内皮細胞障害の関わりを明らかにするためにTNF- $\alpha$ が血管内皮細胞の凝固特性に与える影響についての検討および、(2) 血管内皮細胞の5'-nucleotidase (5'-NT) 活性を評価し、内皮細胞の持つ抗血小板凝集特性への関与を明らかにすることから構成されている。これらは多彩な生理機能によって内的環境の恒常性維持に寄与している血管内皮細胞の機能障害の病態に関する重要な臨床的問題点でもある。研究の成果として、(1) TNF- $\alpha$ は、HUVECにアポトーシスを誘導するとともに、向凝固特性 (TF活性, prothrombinase活性) を発現させ、この向凝固特性は表出するPSの触媒に強く依存すること、(2) PS発現の過程にcaspase-3活性、酸化ストレスが関与する可能性が示唆されたこと、(3) 5'-NTは特にADP低濃度域で抑制効果を発揮し、血小板凝集の閾値を上げる働きがあること、以上3点の貴重な新知見が得られた。

これらの研究成果により、血管内皮細胞が有する抗凝固、抗血小板凝集能の機序の解明のみならず、血栓に対する治療法へ研究が発展する可能性が期待される。

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られる。