

Title	Fluid Shear Stress Attenuates Tumor Necrosis Factor- α -Induced Tissue Factor Expression in Cultured Human Endothelial Cells
Sub Title	培養ヒト血管内皮細胞のTNF α 誘導組織因子発現に対するずり応力の影響
Author	松本, 豊
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.4 (2006. 12) ,p.16-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20061202-0016

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Fluid Shear Stress Attenuates Tumor Necrosis Factor- α -Induced Tissue Factor Expression in Cultured Human Endothelial Cells

(培養ヒト血管内皮細胞のTNF α 誘導組織因子発現に対するずり応力の影響)

松 本 豊

内容の要旨

血管内皮細胞は血管の内腔を一層に覆う細胞で、絶えず血流に曝されている。血流によりもたらされる血行力学的な物理力であるずり応力が血管内皮細胞の種々の機能に遺伝子発現レベルにおいて影響を与えることが報告されている。内皮細胞の抗血栓性及び向血栓性機能に関してもずり応力による調節を受けているものがあることが報告されている。川合らは培養血管内皮細胞の線溶活性がずり応力及び炎症性サイトカイン刺激により相乗的に高まることを報告している。本報告においては、培養ヒト臍帯静脈内皮細胞において腫瘍壊死因子 α (TNF α)により誘導した組織因子 (TF) 発現に対するずり応力の影響を改良型コーン・プレート型粘度計を用いて検討した。生理学的レベルと考えられる大きさ (18 dynes/cm²) のずり応力はTNF α (100U/mL)により誘導したTF mRNAの発現を減弱させた。この抑制作用はずり応力の負荷時間に依存しており、ずり応力の負荷をTNF α 添加15時間前より開始しRNAのサンプリング時まで継続させた場合には、TNF α 添加1及び3時間後のTF mRNAレベルはずり応力負荷によりそれぞれ76%及び69%減少した。また、抗原量レベルにおいてもTF発現はずり応力の大きさに依存して有意に抑制された。抗TFモノクロナル抗体を用いたフローサイトメトリーにより測定した細胞表面におけるTF発現も18 dynes/cm²のずり応力をTNF α 添加の15時間前より負荷することにより1/3に減少した。さらに、活性化凝固第VII因子及びCa²⁺の存在下で凝固第X因子の活性化を指標に測定したTFの機能的活性も18 dynes/cm²のずり応力の負荷により有意に低下した。しかし、TFのmRNAの安定性はずり応力の負荷により影響を受けなかった。これらの結果より、ずり応力が内皮細胞におけるTF発現の重要な調節因子であることが示唆された。

論文審査の要旨

血管内皮細胞は血管内腔を一層に覆う細胞であるため血流によるずり応力を絶えず受けている。近年、培養血管内皮細胞を用いた試験において、内皮細胞の機能や遺伝子発現がずり応力の影響を受けることが報告されている。本研究においては、外因性凝固経路の開始因子である組織因子 (TF) のTNF α 刺激による発現が、mRNA、抗原量及び活性レベルのいずれにおいてもずり応力により抑制されることが示された。また、この抑制作用はずり応力の負荷時間及び強度に依存することが示された。

これまで、ずり応力を培養血管内皮細胞に負荷することにより血小板の凝集を抑制するPGI₂及びNOの産生が増加すること、線溶活性化因子であるtPAの産生が増加する一方で、その阻害因子であるPAI-1の産生が低下すること、凝固抑制因子であるトロンボモジュリンの発現が増加することが報告されていることと本研究の結果を考慮合わせると、ずり応力刺激は血管内皮細胞の機能を協動的に抗血栓性に変化させ、血液の流動性を保つうえで重要な役割を果たしていることが示唆された。

審査では以上のような研究に対して、まず本研究で用いられたCone-Plate型粘度計が、近年汎用されているParallel plate型装置と比較して試験目的に適しているかどうかが議論された。当研究者は、Cone-Plate型粘度計は少量の培地で実験が可能で、培養シャーレ全体に均一なずり応力を負荷できるという利点があり、特に長時間のずり応力負荷試験に適していると回答した。それに加え、Cone-Plate型粘度計では培地全体のグルコースなどの栄養成分の濃度が均一に保たれるという利点があることが指摘された。

次に本試験でmRNAの定量法として用いられているRT-PCR-Southern blot法は定量性に欠けるのではないかと指摘がなされた。本試験で使用したPCR cycle数では生成物量の直線性が維持されていることを確認しており、定性的にはmRNAの増減を正確に判断できていると考えているとの回答がなされたが、Real time PCRなどのより定量性の高い方法が好ましいとの指摘がなされた。

本in vitro試験の結果は生体内において生理的な意味を有しているかとの議論がなされた。実験動物の敗血症モデルやヒト動脈硬化巣の病理像において、内皮細胞ではTF発現が認められないとの報告が幾つかなされており、本試験の結果がin vivoの観察においても支持されているとされた。

ずり応力によるTF発現の抑制機序について議論がなされた。本研究では阻害剤を用いた実験によりPGI₂及びNOによる間接的な抑制作用ではないことを示唆しているものの、内皮細胞は他にも多くの生理物質を産生しており、より多くの因子の関与を検討すべきであるとの指摘がなされた。

以上のように本論文ではmRNAの定量性の問題や作用機序の解明など改善すべき点があり、加えて論文が多少古いものの、その知見の生理的意義は現在でも保たれており、有意義な論文であると判断された。

論文審査担当者 主査 内科学 池田 康夫
医化学 末松 誠 病理学 岡田 保典
免生・分化生物学 須田 年生
学力確認担当者：池田 康夫、末松 誠
審査委員長：末松 誠

試験日：平成18年8月2日