

学位論文題名

血管内皮細胞における Thy-1 の発現と機能

学位論文内容の要旨

接着とシグナル伝達を媒介するラット血管内皮細胞上の接着分子, Thy-1, ICAM-1, および CD44 を, それぞれに対するモノクローナル抗体で刺激した時の血管透過性の変化について, *in vitro* および *in vivo* の検討を行った.

正常ラット下大静脈由来培養血管内皮細胞 (REC) の膜表面には, Thy-1, ICAM-1, CD44, および RT1A の発現が間接フローサイトメトリー法にて確認された. これら各接着分子に対するモノクローナル抗体を反応させた時の REC のアルブミン透過性変化を, multiple pore filter を用いた *in vitro* の実験系で測定した. 各接着分子に対するマウス IgG1 モノクローナル抗体のうち, 抗 Thy-1 抗体; OX7 を添加した時のみ, 明らかな REC のアルブミン透過性亢進が誘導された. 抗 ICAM-1; 1A29, 抗 CD44; OX50, および抗 RT1A; OX18 の各抗体添加では透過性変化は認められなかった. 従って OX7 により誘導された透過性亢進は, REC 上の任意の分子を 2 価の抗体で架橋したためにおこった現象ではなく, 抗 Thy-1 抗体と REC 上の Thy-1 との結合により媒介された現象であると考えられた. 一方 REC を, 抗 Thy-1 抗体を含む培養液中で 24 時間培養しても, 有意の細胞傷害性や増殖修飾作用は認められなかった. 抗 Thy-1 抗体による REC の有意のアルブミン透過性亢進現象は, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の抗体濃度で観察され, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上ではプラトーに達した. またこの現象は抗体添加 1 時間後からすでに観察され, 12

時間の反応時間で透過性亢進の程度は最大であった。

マウス胸腺細胞では、モノクローナル抗体との結合を介して細胞内にシグナルを伝える特定の Thy-1 上のエピトープの存在が知られている。REC 上の Thy-1 にシグナル伝達を媒介する特異的なエピトープが存在するか否かに興味を持たれ、5 種類の異なる抗 Thy-1 抗体；OX7, R-1-5B1, R-1-6C1, R-1-12C5, および TM78-8 を用いて実験を行った。これらはいずれも REC に同程度のアルブミン透過性亢進を誘導したが、間接フローサイトメトリー法を用いて各抗体の結合部位の競合阻害を検討した結果、これらは互いに近接するエピトープを認識することが示されたため、REC における Thy-1 上のシグナル伝達を媒介する特異的なエピトープの存在の有無について、結論づけるには至らなかった。

抗 Thy-1 抗体により誘導される REC のアルブミン透過性亢進現象を媒介する細胞内シグナル伝達物質について、3 種類の細胞内シグナル伝達阻害剤を用いた検討を行った。抗 Thy-1 抗体により誘導される REC のアルブミン透過性亢進現象は、カルモジュリンアンタゴニストの W-7, およびプロテインキナーゼ阻害剤の H-7 と HA-1004 のそれぞれの単独添加により、いずれも有効に抑制された。また W-7 と H-7 の同時添加ではほぼ完全に抑制された。W-7 はカルシウムのカルモジュリンへの結合を競合的に阻害することにより、カルシウム-カルモジュリン依存性キナーゼの活性化を妨げる。H-7 と HA-1004 はいずれも各種プロテインキナーゼ活性を阻害するが、プロテインキナーゼ C に対する阻害効果が H-7 では強く、HA-1004 では弱い。従って、上記実験結果から、抗 Thy-1 抗体により誘導される REC のアルブミン透過性亢進現象は、カルモジュリンやプロテインキナーゼ C を含む各種プロテインキナーゼなどの細胞内シグナル伝達物質により媒介されている可能性が示唆された。

最近になって、ヒスタミンにより誘導される内皮細胞透過性亢進現象は、カルシウム-カルモジュリン依存性のミオシン軽鎖キナーゼや、プロテインキナーゼ C などの細胞内シグナル

伝達物質により媒介されることが示されており，抗 Thy-1 抗体により誘導される REC のアルブミン透過性亢進現象とヒスタミンにより誘導される内皮細胞透過性亢進現象とは，一部共通の経路により媒介されている可能性が考えられた。

正常ラットの血管内皮細胞には Thy-1 はほとんど発現しておらず，REC における発現は，単離，継代培養の過程で獲得されたものと考えられた。ヒト臍帯静脈由来培養血管内皮細胞は，*in vitro* の培養条件下で自ら IL-1 を産生し自己活性化調節を受けることが知られている。IL-1 などの炎症性サイトカインが血管内皮細胞上に新たに Thy-1 を発現誘導する可能性が考えられた。我々の検討においても，REC 上の Thy-1 発現は IL-1 β 処理により増強した。一方，ラット MLR (mixed lymphocyte reaction) 上清処理では REC 上の Thy-1 発現は減弱した。MLR 上清中には IFN- γ や TNF- α など多数のサイトカインが含まれていることが知られている。今回の検討では REC 上の Thy-1 発現を減弱する因子については，IFN- γ 単独または TNF- α 単独ではないこと以外，明らかにされなかった。一方 *in vivo* では，フロイント完全アジュバントで誘発した皮膚炎症局所の血管内皮細胞に，炎症惹起 24 時間後より漸増する Thy-1 発現が認められた。

各接着分子に対するマウス IgG1 モノクローナル抗体を全身投与した時の，フロイント完全アジュバント誘発皮膚炎症局所における血管透過性変化について観察した。非炎症部位における血管透過性は，抗体投与の有無および投与する抗体の種類によらずわずかであった。一方，炎症局所においては抗体非投与群でも明らかな血管透過性亢進が観察された。すなわち古典的な炎症部位における血管透過性亢進現象を示す結果が得られた。これに対し，抗 Thy-1 抗体投与群では，抗体非投与群に比べて有意の透過性亢進の増加が認められた。炎症局所の血管内皮細胞に発現誘導された Thy-1 と静脈内投与した抗 Thy-1 抗体との結合により，内皮細胞に血管透過性亢進の細胞内シグナルが伝達された結果と考えられた。抗 CD44 と

抗 R T 1 A の各抗体投与では，血管透過性亢進の程度は抗体非投与群と差がなかった．抗 I C A M-1 抗体投与群では，軽度ながら有意の透過性亢進抑制現象が観察された．これは他に報告のある，抗 I C A M-1 抗体の抗炎症効果と同様であった．

これまでに報告されていないラット血管内皮細胞における Thy-1 の発現と，血管透過性調節能をはじめとするその機能的役割について解析を進めることは，すでに Thy-1 の発現と何らかの機能的意義が示唆されている神経細胞や胸腺細胞の，血管内皮細胞との生物学的な相互作用についての理解や，これらの異常により発症することが推察される疾病の病因論的理解に役立つ新しい知見につながる可能性があり，十分に意義のあることと思われる．

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 小 野 江 和 則

副 査 教 授 上 出 利 光

学位論文題名

血管内皮細胞における Thy-1 の発現と機能

血管透過性調節因子は従来、可溶性物質とそのレセプターを中心に調べられてきた。本研究では、接着分子を介する血管透過性調節機構の有無について検討した。

正常ラット下大静脈由来培養血管内皮細胞上には、接着とシグナル伝達を媒介する接着分子、ICAM-1, CD44, Thy-1, およびRT1Aの発現が認められた。各接着分子に対する抗体添加による、in vitro血管内皮細胞透過性を測定した結果、抗Thy-1抗体添加で明らかな透過性亢進が誘導された。抗ICAM-1, 抗CD44, および抗RT1Aの各抗体添加では透過性変化は認められなかった。この現象は、抗Thy-1抗体による内皮細胞傷害性や増殖修飾作用によらず、抗体濃度および反応時間に依存した。また細胞内シグナル伝達阻害剤を用いた検討から、この現象は、カルモジュリンやプロテインキナーゼCを含む各種プロテインキナーゼにより媒介されている可能性が示唆された。

Thy-1は、ラット生体内の血管内皮細胞には殆ど発現していないが、フロイント完全アジュバント誘発皮膚炎局所の血管内皮細胞に、炎症惹起後の時間経過と共に増強する発現が認められた。同部位の血管透過性は、抗Thy-1抗体を静脈内投与することにより、有意に増加した。

以上より、炎症局所の血管内皮細胞に発現誘導されるThy-1は、炎症の場における血管透過性調節機構の一端を担う分子で

あると考えられた。

口頭発表において小野江教授より，血管内皮細胞上 Thy-1 のリガンドおよび Thy-1 を介した細胞内シグナル伝達に関して，また上出教授より，用いた抗 Thy-1 抗体の結合エピトープの違いについてと，ラット Thy-1 腎炎とヒト腎炎の関係について詳細な質問があったが，申請者は概ね妥当な解答をした。また小野江，上出両教授には個別に審査を戴き，合格と判定された。

ラット血管内皮細胞における Thy-1 の発現と，血管透過性調節能をはじめとするその機能について検討した本研究は，すでに Thy-1 の発現と機能が示されている神経細胞や胸腺細胞の，血管内皮細胞との相互作用についての理解や，これらの異常により発症することが推察される疾病の病因論的理解を深めるための基礎的研究として意義は大きく，学位授与に値するものと考ええる。