

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

林 京子

専攻分野：形成外科学

コース：

指導教授：梶川 明義

主論文の題目：

ヒト培養表皮細胞においてヒルジンが血管作動性物質産生に及ぼす影響

共著者：

菅谷 文人、関 征央、住江 玲奈、宮野 竜太郎、
武内 嵩幸、梶川 明義、井上 肇

緒言

マイクロサージャリーにおける血管吻合では、血栓形成により皮弁壊死に陥ることがある。このような血栓形成による微小循環障害に対し、皮弁でのヒルの吸引が有用であることはよく知られている。ヒルの唾液から分泌されるヒルジンは、トロンビン機能を阻害することで血管の抗凝固作用を発揮し、また血管平滑筋や、内皮細胞に作用して、血管拡張や血管作動性物質の放出など血流の再開通にかかわることも知られている。こういったヒルジンの二次的作用は、血管系・毛細血管系については検討されているが、周囲組織に対する影響についてはあまり検討されていない。

そこで、今回、ヒルジンが皮弁の構成要素の一つである表皮細胞が分泌する血管作動性物質に及ぼす影響を調べるため、ヒト培養表皮細胞を

用いて血管作動性物質の遺伝子発現を解析し、検討した。

方法・対象

培養した未分化表皮細胞、および分化表皮細胞において、無添加、ヒルジン・トロンビン単独添加、共存添加で8群を作成し、定量的PCRを用いて遺伝子発現を測定した。培地上清中の生合成産物を Enzyme Immune Assay 法を用いて測定し、Tukey-Kramer 検定を用い $p < 0.05$ の時に有意差ありとした。本研究は、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会（臨床試験部会）における承認（承認番号第 1548 号）の下、書面同意を得た上で組織の提供を受けた。

結果

未分化および分化培養表皮細胞は、ともにエイコサノイド合成酵素関連遺伝子、エンドセリン-1 (EDN1) 遺伝子を発現した。トロンボキサン A2 (TBXAS1) と EDN1 遺伝子発現は培養した表皮細胞の分化が進んだものほど遺伝子発現が増強した。これら遺伝子の発現はトロンビンの存在で増強され、ヒルジンで抑制された。トロンボキサン B₂ (TXB₂) と エンドセリン-1 (ET-1) 産生は分化誘導で各々20倍、5倍以上増加した。トロンビンは TXB₂ 産生を有意に増強し ($p=0.0065$)、ET1 産生を増強する傾向にあった ($p=0.1168$)。ヒルジンは、トロンビン刺激下の、TXB₂ 産生を減少させた ($P=0.0027$)。ET-1 産生の平均値は減少していたが有意ではなかった。

考察

本研究で我々は、表皮細胞におけるプロスタグランジン類の遺伝子発現を一斉分析した。非刺激時の自然発現を指標とした場合、シクロオキシゲナーゼ 2 (COX2)、プロスタグランジン E₂ (PTGES)、プロスタグラン

ジン F₂(PTGFS:AKR1C3)、TBXAS1 合成酵素遺伝子の発現を認め、プロスタグランジン D₂(PTGDS)、プロスタグランジン I₂(PTGIS) 合成酵素遺伝子発現は極めて弱いか無発現であった。PTGIS 遺伝子発現産物である PGI₂ は、血管内皮細胞特異的である。一方、表皮細胞は、色素細胞の増殖・色素沈着に関与すると考えられている ET-1 を大量産生することが知られており、この産生量は血管内皮細胞よりも多いとされている。

今回、我々は血管系・凝固系に影響する表皮細胞由来 TXA₂ と ET-1 の産生がヒルジンによっていかなる影響を受け、分化の段階によってこれら生理活性物質の合成・分泌がどのように調節されているかを検討した。TBXAS1 遺伝子発現は、未分化表皮細胞においては、ヒルジン添加の有無やトロンビン刺激の有無、さらにトロンビンとヒルジンの共存下においても、遺伝子の発現に変化を認めなかった。しかし、表皮細胞を分化誘導した際には、トロンビンの添加によって遺伝子発現が増強傾向にあった(p=0.055)。

TBXAS1 遺伝子を介して誘導される TXA₂ 合成酵素は、プロスタグランジン H₂ を基質とし TXA₂ を産生する。TXA₂ は、強力な血管平滑筋収縮作用と血小板凝集作用により凝固系に関与して、微小循環を障害するため脳血管障害などの原因となる。今回の結果は、創傷治癒過程で増殖と分化を繰り返す表皮からの TBXAS1 遺伝子発現の増強が、微小循環に影響する可能性を強く示唆している。この状態で、未分化表皮細胞の場合、トロンビン共存時にヒルジンを添加しても遺伝子発現に影響しなかったが、分化を誘導した表皮細胞においては、トロンビンの添加によって増強した TBXAS1 遺伝子発現をヒルジンが抑制する傾向にあり、ヒルジンが表皮細胞が産生する凝固関連物質を阻害することが明らかになった。これまで、ヒルジンの効果は抗トロンビンなどの血管に対する直接効果と考えられてきたが、今回の我々の研究結果から、表皮細胞の血管作動性物質産生にまで影響が及ぶことが明らかになり、ヒルジンの効果は総合的にその作用機序を検討する必要があると考えられた。

結論

表皮細胞が産生する血管作動性物質の遺伝子発現を分析し、ヒルジンが表皮細胞の血管作動性物質産生に及ぼす影響を検討した。その結果、表皮細胞は分化誘導時のトロンビン刺激時に血管平滑筋収縮性のTBXAS1, EDN1 遺伝子の発現が変化し、その遺伝子産物であるTXA₂(TXB₂), ET-1 産生が亢進し、さらに、この反応をヒルジンが抑制することが判明した。本研究により、ヒルジンは血管の血液凝固系への直接作動だけでなく、血管外組織に対し循環機能に影響する生理活性物質の産生にまで関与していることが強く示唆された。