Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Effect of hypoxia on cholesterol accumulation in cultured rabbit aortic smooth muscle cells

築谷, 学

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
1985-12-11

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
乙0992

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000992

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

〔94〕

氏名・(本籍)	築谷（つきたに） 学（まなぶ） (兵庫県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博ろ第864号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	昭和60年12月11日
学位論文題目	Effect of Hypoxia on Cholesterol Accumulation in Cultured Rabbit Aortic Smooth Muscle Cells (家兎大動脈培養平滑筋細胞におけるコレステロール蓄積に対する低酸素の影響)
審査委員	主査 教授 福崎 恒 教授 馬場茂明 教授 杉山武敏

論文内容の要旨

I. 緒　言

動脈壁の細胞への脂質蓄積は，動脈硬化の初期像として重要視されており，それに関与する細胞として，中膜から遊走してきた血管平滑筋細胞が考えられている。これらの細胞に最も著明に蓄積する脂質はコレステロールエステルであり，蓄積がさらにすすんで泡沫細胞が形成されると考えられている。

動脈壁における低酸素状態は，動脈硬化形成の重要な要素と考えられている。すなわち，高脂血家兎を用いた in vivo の実験において低酸素吸入させることにより，動脈硬化が促進されることが報告されている。しかしながら，食餌性高脂血家兎を用いた実験では，低酸素吸入させることにより，血清コレステロール，トリグリセライドの増加を伴うため，血清脂質の増加を介した現象である可能性が否定出来ず，血管壁に対する低酸素の直接的な影響を観察しているとは断定出来ない。

高コレステロール食で飼育した動物の高脂血血清の添加により，種々の培養細胞において，コレステロール蓄積をきたすことが報告されている。低酸素条件下での，動脈組織や培養細胞における脂質代謝に関して，いくつかの研究がなされているが，低酸素がコレステロールの蓄積を促進するかどうかは明らかでない。

本研究は，家兎培養血管平滑筋細胞を用い，低酸素の細胞内コレステロール蓄積に及ぼす影響を，正脂血家兎血清含有培地あるいは食餌性高脂血家兎血清含有培地において in vitro で観察し，血管壁組織低酸素と動脈硬化症発症との関連を追求する目的でなされた。

Ⅱ．対象および方法

正脂血家兎血清は，普通食（オリエンタル酵母）飼育の雄の日本白色家兎から，高脂血家兎血清は，1％コレステロール含有食（オリエンタル酵母）にて1ケ月以上飼育した雄の日本白色家兎から採取した。

Lipoprotein deficient serum（LPDS）は，d>1.21g／mlの分画を正脂血家兎血清よりHavel等の方法により超遠心分離し，透析して用いた。

血管平滑筋細胞の培養は，雄の日本白色家兎の胸部大動脈を用い，Ross等の方法に準じて行なった。培地には，10％新生児牛血清を添加したDulbecco's modified Eagle's medium を用い，継代2代目の細胞を，直径35mmのペトリ皿に2×10^5／皿の濃度でまき，5％CO_2，20％O_2，75％N_2，37℃の条件下で3日間培養を行なった。2日後，培地をLPDS添加培地に変換，24時間培養した後，20％正脂血家兎血清加培地（20％NRS），又は20％高脂血家兎血清加培地（20％HRS）に変換し，それぞれコントロール培養器（20％O_2，75％N_2，5％CO_2）又は低酸素培養器（2％O_2，93％N_2，5％CO_2）に入れ一定時間培養した。

細胞の回収は，EDTA加0.05％トリプシンにて行ない，細胞の生存率はトリパンブルーを使用して求めた。細胞コレステロールの測定は，回収した細胞をPhosphate buffered saline にて十分に洗浄した後，イソプロピルアルコールにて脂質を抽出し，Heider と Boyett の酵素蛍光法にて，遊離コレステロールおよび総コレステロール量を測定した。細胞蛋白は，イソプロピルアルコールで沈殿した蛋白を，0.1N NaOHで溶解しLowry 等の方法にて測定した。細胞コレステロール含量は，細胞蛋白あたりの遊離コレステロール，エステル型コレステロールの量で示した。

Ⅲ．結　果

HRSの総コレステロールは1034mg／dl，トリグリセライドは254mg／dl，リン脂質は402mg／dl，NRSではそれぞれ37mg／dl，52mg／dl，64mg／dlであった。

低酸素群は細胞の増殖が抑制され，48時間後にはコントロール群に比べ細胞数は約70％であった。細胞の生存率は両群ともに95％以上であり，両群間に差を認めなかった。又，両群の単位細胞数当たりの蛋白量にも差はなかった。

20％NRS含有培地で24時間培養した際，低酸素群はコントロール群に比し，遊離コレステロール含量は16％多かった（P<0.02）が，エステル型コレステロールには差を認めなかった。一方，20％HRS含有培地で24時間培養した際には，低酸素群はコントロール群に比し，遊離コレステロール含量は26％多く（P<0.001），さらにエステル型コレステロールは2.6倍（P<0.001）の蓄積をみた。

次に，20％HRS含有培地下にて細胞内コレステロール蓄積を48時間までのタイムコースをとって調べた。低酸素群の遊離コレステロール含量は，12時間でピークとなり全経過を通じてコントロール群に比し，軽度の増加を認めた。エステル型コレステロール含量は，両群とも4時間目から増加しはじめ，低酸素群ではコントロール群に比し，24時間以降で著明な蓄積を示した（24時間：16.8μg／mg vs.7.2μg／mg，48時間：23.9μg／mg vs. 8.3μg／mg，p<0.001）。

Ⅳ．考　案

本研究は，培養家兎大動脈平滑筋細胞において，高脂血家兎血清の存在下では，低酸素が細胞内コレステロール（とくにエステル型）の蓄積を促進させることを示している。従来，種々の培養細胞において，高コレステロール食餌性高脂血血清が細胞内コレステロールエステルの蓄積をもたらすことが報告されている。培養細胞を用いた低酸素の負荷実験では，一般に正脂血血清加培地が用いられており，遊離脂肪酸と，トリグリセライドが増加するとの報告はあるが，コレステロールが蓄積するとの報告は認められない。

正常の動脈では，内膜および中膜内側は，内腔からの拡散によって酸素供給を受けている。しかしながら，拡散により動脈壁へ酸素の供給される範囲には限界があり，内膜の肥厚をきたした場合には，血管壁への酸素供給は不充分となる。

食餌性高脂血家兎に低酸素吸入負荷を行なうと動脈硬化が促進されることが報告されている。しかし，これら in vivo の実験では，全身的な低酸素に関連したその他の要素，すなわち，カテコラミンや血清脂質レベルの変化等の影響の加わることは否定しきれない。今回の実験は培養系を用い，血管平滑筋へのコレステロール蓄積に対する，低酸素の直接の作用を評価する目的で行なわれた。詳細な機序は不明であるが，低酸素は高脂血血清存在下において，培養平滑筋細胞へのコレステロール（とくにエステル型）の蓄積を促進することが認められた。そこで，これら in vitro の実験より，動脈壁における組織低酸素が，高脂血症の存在下で，血管平滑筋細胞におけるコレステロール蓄積の促進を通じて，動脈硬化の発現に重要な役割りを果たす可能性があると考えられる。

Ⅴ．結　語

家兎培養血管平滑細胞を用い，低酸素の細胞内コレステロール蓄積に及ぼす影響を，正脂血家兎血清および食餌性高脂血家兎血清含有培地にて観察した。低酸素が高脂血血清存在下において，培養平滑筋細胞へのコレステロール（とくにエステル型）の蓄積を著明に促進することが判明し，動脈壁における組織低酸素が高脂血症の存在下で血管平滑筋におけるコレステロール蓄積を増強することにより，動脈硬化を促進する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

低酸素吸入による systemic hypoxia が家族性高脂血症のモデル動物であるWHHL家兎の粥状硬化病変の進展を促すことは，既に本申請者と共同研究者が報告したところである。しかし，かゝる in vivo experiment では systemic hypoxia が血中のカテコールアミンや脂質のレベルを上昇させるなどの要因を介して動脈硬化病変の促進に与る可能性を否定し得ない。そこで，本申請者は，低酸素そのものが動脈平滑筋細胞のコレステロール蓄積に直接影響を及ぼすか否かを明確にするべく組織培養法を用いて検討することを目的として本研究を実施した。

［方　法］日本白色家兎の胸部大動脈を用い，Ross らの方法に準じ，10％新生児牛血清添加Dulbe-

cco's modified Eagle's medium を用い継代2代目の細胞をペトリー皿にまき（2×10^5／皿），コントロール条件下で3日間培養した。そこで，培地をlipoprotein deficient serum 添加培地に変え24時間培養して後，正脂血家兎血清添加培地又は高コレステロール含有食餌で飼育して得た高脂血家兎血清添加培地に変換し，それぞれを20％O_2，75％N_2，5％CO_2 含有のコントロール培養器又は2％O_2，93％N_2，5％CO_2含有の低酸素培養器にて一定時間培養した。そして，0.05％トリプシンにて細胞を回収し，十分に洗浄後イソプロピールアルコールで脂質を抽出し，Heider と Boyett の酵素蛍光法で遊離コレステロール量及び総コレステロール量を測定し，細胞コレステロール含量は，細胞蛋白当りの量で示した。

［結　　果］正脂血血清添加培地で培養した場合，低酸素群ではコントロール群と比べ遊離コレステロールは16％増加（$p<0.02$）を示したが，エステル型コレステロールには有意差を認めなかった。一方，高脂血血清添加培地で培養した場合は，低酸素群ではコントロール群に比し，細胞内の遊離コレステロールは26％増加（$p<0.001$）を示し，更にエステル型コレステロールは2.6倍（$p<0.001$）と著明な増加を示した。次いで，高脂血血清添加培地で細胞内コレステロール蓄積を48時間までのタイムコースで検討したところ，低酸素群の遊離コレステロール含量は12時間でピークに達し，全経過を通じコントロール群に比し軽度増加を示した。エステル型コレステロール含量は両群共4時間目から増加しはじめ，低酸素群ではコントロール群に比し24時間以降で著明な増量を示した（$p<0.001$）。

以上の結果より，培養家兎大動脈平滑筋細胞において，高脂血家兎血清存在下では，低酸素条件により細胞内コレステロール，殊にエステル型コレステロールの蓄積が著明に増加することが認められた。このような動脈平滑筋細胞への脂質特にコレステロールエステルの蓄積は，動脈硬化の初期像として重視される。正常の動脈では，内膜及び中膜の内層は内腔からの拡散によって酸素供給をうけているため，内膜の肥厚などを来すと，血管壁への内腔からの酸素供給は障害されると考えられる。本研究は，このようにしてもたらされた動脈壁組織低酸素が，直接動脈壁脂質代謝障害に与るか否かを培養系を用いて検討し，平滑筋細胞へのコレステロール特にエステル型コレステロールの蓄積を促進することを実証し，その動脈硬化の成因に与る可能性を提示したもので，価値ある集積であるとみなされる。よって，本申請者は医学博士の学位を得る資格を有するものと認める。