

# 血管内皮細胞のプログラム細胞死

名古屋大学理学部分子生物学科

荒木聡彦

名古屋大学図書	
和	1144571

## 目次

謝辞	3
略語	4
概要	5
1. 背景	7
1-1. プログラム細胞死	7
1-2. 生存機構研究の展開	8
1-3. 致死因子	9
1-4. 細胞内機構	11
1-5. ヘビ毒	13
2. 材料と方法	14
2-1. 材料	14
2-2. 方法	15
1) 細胞培養	
2) 細胞数計測	
3) 細胞形態	
4) DNA電気泳動	

次ページへ続く

3. 結果	17
3-1. 栄養因子除去によるプログラム細胞死の誘導	17
3-1-1. 細胞剥離現象	
3-1-2. タンパク質合成の要求	
3-1-3. アポトーシス	
3-2. 細胞内機構の解析	18
3-2-1. 生存因子の決定	
3-2-3. 細胞内伝達経路	
3-3. プログラム細胞死誘導因子としてのヘビ毒	21
3-3-1. 出血性ヘビ毒	
3-3-2. 解毒物質	
3-3-3. 各種ヘビ毒による誘導	
3-3-4. 細胞特異性	
3-3-5. ヘビ毒中の活性物質の属性	
4. 考察	24
4-1. 血管栄養因子除去によるプログラム細胞死の誘導	
4-2. 血管内皮細胞内機構の解析	
4-3. 血管プログラム細胞死誘導因子	
4-4. おわりに	
引用文献	28
図説明文	34
図	38
副論文	

## 謝辞

まず始めに本研究の全般にわたり助言，監修をしていただき，物心両面から励ましていただいた指導教官の林博司教授，臨海実験所所長に深く感謝の気持ちを述べたいと思います。

また，細胞培養法の指導や各種培養細胞を提供していただき，東京都老人研究所研究生の期間に直接にご指導をいただいた東京都老人総合研究所主任研究員の加治和彦博士に深く感謝いたします。

そして同期間に研究の便を凶っていただき，多方面で相談にのっていただいた老人研究所の松尾光芳博士，浦野四郎博士，松本茂信博士，金子孝夫博士，中野俊一朗研究員，五味不二也研究員，内田洋子博士に感謝いたします。

次に多方面で研究の補助をしていただき，関連する研究分野で多くの示唆を与えていただいた臨海実験所の細胞死研究グループの石田孝行氏，山本達典氏，林達也氏に厚く感謝いたします。また同グループの松村貴晴君，奥宏海君，綱育男君，苗俊英氏に感謝いたします。

さらに共に生活し多くの場面で相談にのっていただいた臨海実験所の黒田現富山大学助教授，加藤豊樹助手，村田嘉治技官，野坂みさえ技官，村田明技官，砂川昌彦技官，中島徹夫現放射線医学研究所研究員，田村徹也現ファイザー製薬研究員，嶽本和久氏，伊藤光二氏，大沢正輝氏，長谷真氏，金宗けん氏，武田壮一氏，佐藤真則氏に感謝いたします。

そして多額の研究費を補助していただいた日本学術振興会に感謝いたします。

最後に博士課程の期間にたいへん苦勞と心配をかけました私の両親と妹に感謝の気持ちを述べたいと思います。

## 略語

A D P	アデノシン二磷酸
A T P	アデノシン三磷酸
D N A	デオキシリボ核酸
F G F	繊維芽細胞増殖因子
H U V E C	ヒトさい帯静脈内皮細胞
I L - 1	インターロイキン - 1
I L - 2	インターロイキン - 2
I L - 3	インターロイキン - 3
I L - 6	インターロイキン - 6
N G F	神経成長因子
P D G F	血小板由来増殖因子
R N A	リボ核酸
R N アーゼ	リボ核酸分解酵素
T G F - $\beta$	トランスフォーミング増殖因子 - $\beta$
T N F	腫瘍壊死因子
T P A	テトラデカノイル - ホルボール - アセテート

## 概要

血管系の構築や恒常性の維持において、血管の退縮、または血管内皮細胞の脱離の現象は、生物学的に血管新生と並んで大きな役割を持つと考えられる。他方、そのような退行現象は、医学的には、動脈硬化の引金となる血管内皮の脱離や、腫瘍壊死因子による腫瘍の出血性壊死における血管の崩壊など、医学的に重要な研究課題でもある。神経系や免疫系では種々の場面での退縮現象としてプログラム細胞死（アポトーシス）の機構が関与していることが明らかになっているが、血管系でも臓器萎縮においてアポトーシス様の電子顕微鏡像が観察されているので、プログラム細胞死が種々の血管退縮に関与している可能性がある。しかし、血管系でプログラム細胞死が本当に起こるのか、そして起こるとすればどのように制御されるのか分かっていないため、生物学的な進展と医学的な応用の道を阻んでいる。

本論文では血管内皮細胞がプログラム細胞死を起こす事を初めて示し、培養系での実験系を樹立した。そしてこれを用いて、血管内皮細胞のプログラム細胞死をつかさどる生存因子を同定し、新しい特異的な致死因子を見いだした。

まず、血管内皮細胞の培養系から増殖因子（FGF）を除去したときに剥離してくる細胞が、プログラム細胞死を起こしているのではないかと考え、死に際してのタンパク質合成の要求や死細胞のDNAの様子を調べた。その結果、FGF除去による血管内皮細胞の死が、蛋白合成の必要なプログラム細胞死である事、さらに特徴的なDNAの断片化を伴うアポトーシスといわれる死にかたであることを示した。

次に、FGFと同様のプログラム死抑制効果を持つ生存因子がどのようなものであるかを調べた。各種増殖因子等について検索したところ、FGFのほかに、血清、発ガンプロモーター（ホルボールエステル）、グルココルチコイド等の限られた物質に限られ、通常増殖促進因子グループとは異なった生存因子グループが識別された。そして細胞内信号伝達についても追求し、プロテインキナーゼCが関与する事を示した。

最後に、血管網が弾力的な消長を繰り返す器官である事から、特異的な致死因子が存在するはずだと考え、血管系に影響を与えそうな物質を探索した。そ

の結果、出血性ヘビ毒に強力なプログラム細胞死誘導活性がある事を見いだした。この死は上記の増殖因子除去による場合と同様、タンパク質合成阻害剤やFGFなどによって抑制され、DNAの断片化を起こすが、さらに強力な活性の表れとして、細胞本体の断片化や短時間での死の誘導などの性質を持っていた。そして、この誘導効果はハブ、マムシ、ガラガラヘビなどの多くの出血性ヘビ毒に共通の性質であり、コブラなどの神経毒性ヘビ毒やハチ毒にはこの活性がなかった。さらに血管内皮以外の繊維芽細胞や平滑筋細胞に対しては誘導活性はなく、血管内皮細胞に特異的であることが分かった。この発見は、未だに機構の知られていないヘビ毒による出血機構を解明するのに役立つと同時に、その特異性から血管網の構築をつかさどるプログラム細胞死誘導の受容体やその本来のリガンド、そしてその信号伝達機構の解明に役立つと考えられる。

本論文によって、血管系におけるプログラム細胞死の概念が定着し、このような致死物質などから、血管退縮の機構を解明する新しい手がかりが提供できれば幸いである。

## 1. 背景

### 1-1. プログラム細胞死

人間は、知恵を持つに至った太古の昔から、死に恐れを抱きつつ生を楽しんできた。”生あるものは必ず死す”と理解しつつも、死とは何であるかと考え、不老不死を望んだりもしてきた。生を知ることと死を知ることとは裏腹の関係にある。死についての我々の知識はどうなっているのであろう。生物は分子、細胞、器官、個体という階層構造で成り立っているため、各々のレベルで死が問題に出来る。生体内の機能高分子が死に、細胞が死に、器官が死に、個体が死ぬ。従って、下の層での死のメカニズムの研究が上の層での生を支えるために有用であったり、生のメカニズムを理解するために有用であることが理解できる。膨大な体系となった生化学は、タンパク質や核酸等の生体高分子が”死ぬ”ことを説明してきた。分子のレベルの死である。個体レベルの死は自然科学よりも、むしろ社会科学、人文科学の主題として扱われることが多くなっている。さらには、最近の環境問題にみられるように、個体の集合としての生態系という、更に上の階層での死をも問題にするようになり、死に対する理解は一つの階層から、その上下の階層を含む形で展開され始めている。器官のレベルでの死は医学の中心的な追求課題であった。ここでも臓器移植などとの関わりから、個体レベルでの死とつながり、化学療法等との関わりから細胞レベル或は分子のレベルでの死と連結する。細胞レベルでの死に対する理解への努力も、上下のレベルを包含する形で、同様に大きな広がりを見せ始めている。

最近、免疫系、神経系などの分野でプログラム細胞死またはアポトーシスに関する話題が急が増えてきている。それらは、神経系では脳変性症、脳虚血などで、免疫系では造血、免疫記憶、免疫寛容などで巧妙に生体に利用され、これらの器官の機能に多方面で影響を与えることが分かり始めている。個体は細胞の集合が作り上げたシステムであるが、その個体の生存のために必要とされる細胞の死もあれば、システム全体を危機に陥れる細胞の死もある。

アポトーシスとはネクローシスと対比されるもので、死んだ細胞の形態を表す用語である<sup>8, 9)</sup>。後者は細胞や核、ミトコンドリアなどの膨潤や膜の破壊を

伴い、おもに外的な攻撃による死の場合が多い。前者は核や染色体の凝縮，アポトーティックボディの出現を伴う死に方を指し，DNAの特徴的な切断を起こす。この死に方は発生過程などでの生理的な細胞死で見られる。

血管網の構築も，血管新生と血管退縮によって制御されると考えられる。血管退縮が関連すると考えられる現象は，癌血管，創傷治癒，臓器萎縮，血管病など多岐にわたる。また血管の新生を考える上でも退縮しない機構，すなわち生存機構の考えは有用かも知れない。血管退縮にはどのようなしくみが存在するのかを追求することは，そのような面で興味深く，しかも意義深いものを持っている。血管内皮細胞，神経細胞，血球細胞のプログラム細胞死は，器官の機能の違いを反映してそれぞれに特徴を有しており，その形態，生存因子，致死因子，細胞内シグナル伝達機構などもさまざまである。

## 1 - 2. 生存機構研究の展開

神経網は，他の組織の需要に合わせて必要十分なだけ配分されているように見える。神経網の配分の不思議さは，古くからの興味の対象となっていた。生存因子の考え方はこれに答えるかたちで神経系から生まれた。神経細胞は刺激の伝達先の組織がなくなってしまうと，自然に死ぬようにできており，その機構にNGFなどの神経成長因子が関与していることから，生存因子の考え方が生まれた。

最近，それらの神経生存因子の欠乏によって神経細胞が死ぬためには，その細胞自体のエネルギー代謝やタンパク質の合成が必要なことが分かってきた<sup>1)</sup>。これは細胞内にプログラムされた機構を積極的に駆動して自らを死に到らしめることを表しているので，プログラム細胞死であるという見方ができる。

プログラム細胞死は従来，胎児の水かき部分の退化や，オタマジャクシの尾の退化のような発生，分化の限られた領域でのことのように思われがちであったが，NGFのような増殖因子とのからみによってにわかに広く意識されるようになった。

同様な生存因子除去によるプログラム細胞死は，神経細胞の他に血球細胞，

血管内皮細胞などでも見られることがわかった。血球細胞では、感作Tリンパ球、造血幹細胞、赤血球芽細胞に対応してそれぞれIL-2<sup>2)</sup>、IL-3<sup>3)</sup>、エリスロポエチン<sup>4)</sup>の除去でプログラム細胞死が起こることが報告され、それらが免疫応答、造血機構で果たす重要な役割が分かりはじめた。また血管内皮細胞ではFGFなどの除去で起こることが報告され<sup>5)</sup>、後述するような展開をみせている。

血管内皮、神経、血球などのように、生存因子除去によってプログラム細胞死を起こす細胞群は、逆に様々な致死因子によってもプログラム細胞死を起こす。神経ではグルタミン酸によって、そのレセプターを介したプログラム細胞死が起こり<sup>14)</sup>、これが脳虚血や脳変性症による脳細胞の死に重要な影響を持つ。またTリンパ球の免疫寛容現象では自己抗原によってプログラム細胞死が起こることが、この現象の成立原因として示されている<sup>10)</sup>。更に付け加えれば、生存因子の持つもうひとつの重要な側面として、このような積極的な致死因子に対してもそれらの効果を抑制する働きのあることである。

### 1-3. 致死因子

血管内皮細胞以外の細胞に対する誘導因子の研究状況は、リンパ球に対する自己抗原やFas抗体、神経細胞に対するグルタミン酸などが見つかри、それぞれ自己免疫病や脳虚血疾患等に対する医学的解明などに寄与している。したがって、内皮細胞でも、誘導物質が単離されれば医学的利用が期待される。

血管系の致死因子として下記のものと考えられている。

#### 1) 腫瘍壊死因子 (TNF)

TNFはガン細胞を選択的に直接殺傷することが知られている。しかし他方で癌組織を支持する血管のみを選択的に殺傷することで癌組織を壊死に至らしめる作用もありたいへん興味深い。TNFによる癌細胞の直接殺傷の経過については、ネクローシスによる死にかたの他にアポトーシスで死ぬこともあるとされている<sup>11)</sup>。さて本題のTNFによる癌血管の殺傷については、TNFが癌組織に作用して出させる毒性物質を介して血管を殺傷するとの説がある一方

<sup>23)</sup> , 直接に内皮細胞を傷害することも示されている<sup>24)</sup> . ここでいう内皮細胞の直接傷害については, アポトーシスを起こすことが報告された<sup>39)</sup> . ただし, TNFによる細胞の傷害については, タンパク質合成の阻害によって抑制されないので, プログラム細胞死とは異なった機構でアポトーシスに至るのかも知れない. 細胞傷害性T細胞やナチュラルキラー細胞などによる癌細胞の死の誘導でも多くの細胞はアポトーシスで死ぬが, 蛋白合成は必要とされない.

TNFやリンホトキシンと同様に癌細胞にアポトーシスを起こさせる抗体として, 抗Fas抗体<sup>29)</sup> や抗APO-1抗体が見つまっている. これらが血管内皮細胞にも作用するのかが興味深い.

## 2) TGF- $\beta$

TNFとは別系統の血管内皮細胞致死因子としては, ラット心内皮細胞においてTGF- $\beta$ が報告されている<sup>17)</sup> . この場合もプログラム細胞死あるいはアポトーシスが関与しているのかも知れない. TGF- $\beta$ ファミリーではミューラー管退縮因子のように発生現象で生殖組織の退縮に関与している例がある. ホルモンによる前立腺のアポトーシスや白血球について見られるもので, 死の誘導にともなってTGF- $\beta$ <sup>32)</sup> やTGF- $\gamma$ <sup>31)</sup> の発現が増大することも報告されている.

## 3) 臓器萎縮における血管

頻繁に成長, 萎縮を繰り返す臓器としてたとえば黄体がある. 黄体の実質細胞自体は, 性ホルモンであるプロゲステロンによって, アポトーシスを起こす. このとき, 同時に黄体内に走る血管内皮細胞もアポトーシスを起こして死んでゆくことが報告された<sup>25)</sup> . 興味深いことに, このアポトーシスはプロゲステロンに依存していないらしく, 黄体実質細胞のアポトーシスとは別の引きがねで誘導されるらしい<sup>16)</sup> . そこでは血流による制御が示唆されている.

## 1 - 4. 細胞内機構

### 1) 核内のシグナル

核内においては，造血幹細胞において生存因子の存在と並行して *c-myc* 遺伝子の継続的な発現がみられている．*c-myc* を強制的に発現させると，もはや生存因子に依存することなく生存が可能になる<sup>22)</sup>．このような遺伝子導入によって *bcl-2* 遺伝子にもプログラム細胞死抑制活性のあることが見つかった<sup>19)</sup>．癌抑制遺伝子である *bcl-2* にはこの活性の他には細胞増殖抑制などの活性は見つかっていないので，癌化とプログラム細胞死との関係に新しい話題を提供している．*bcl-2* のトランスジェニックマウスで，記憶リンパ球が細胞死から免れることで免疫記憶が成立するのに関与していることがわかった<sup>18)</sup>．*bcl-2* はプログラム細胞死を起こしうる細胞群において，リンパ球ほどの量はないが広く発現していることが報告された<sup>40)</sup>．

### 2) 致死因子によるシグナル

*Fas* は *TNF* によるいくつかの作用のうちアポトーシスの誘導を特異的に介しているらしく興味を持たれている<sup>29)</sup>．*Fas* のシーケンスから，*TNF* レセプターと類似のレセプター型の表面抗原をコードしている事が報告された．

放射線などによる白血球のプログラム細胞死において，DNA切断に先立ち核タンパク質のポリADPリボシル化が起こることが知られていた．最近，細胞障害性T細胞が癌細胞に注入する顆粒の中に，癌細胞にアポトーシスを誘導する本体の候補となるタンパク質が発見された．このタンパク質はADPリボースに結合する部位を持っており，興味を持たれている<sup>15)</sup>．ADPリボシル化阻害剤によるプログラム細胞死抑制もいくつか報告されている．

### 3) 自殺タンパク質の合成

生存因子の除去においても，致死因子による誘導においても，多くの場合蛋白合成や遺伝子発現の阻害によって細胞死が抑制される．したがって，細胞死の機構を起動するために必要な，その細胞自身がつくるタンパク質が存在すると思われるが，いまのところ特定されていない．しかし，いくつかその候

補が報告されている。

まずDNAの断片化の現象を直接的に引き起こすエンドヌクレアーゼが合成されるのではないかと考えられた。すでにヌクレオソーム単位のDNAの断片化をおこす $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 依存性エンドヌクレアーゼが抽出されているが<sup>33)</sup>、この酵素も含めてプログラム細胞死にともなったエンドヌクレアーゼの発現はみられない<sup>34)</sup>。したがって定常的に存在するエンドヌクレアーゼが、なんらかのしくみで活性化を受けるものと思われる。

致死因子の項で紹介した $TGF-\beta$ は、血管内皮細胞自身も分泌することができる。したがって、生存因子の除去によって $TGF-\beta$ を合成、分泌し、自分自身の分泌した $TGF-\beta$ に応答してアポトーシスが誘導される可能性が考えられる。いわゆるオートクライン機構である。実際、 $TGF-\beta$ は生殖器のプログラム細胞死誘導に際して合成促進されることが報告されている<sup>32)</sup>。しかし、まだ直接その因果関係を示した報告はない。

他の致死因子に対しても同様の考え方ができるであろうか。マクロファージから分泌されるTNFを上と同じように考えるには難があるが、Fasなどに対するリガンドは内皮細胞でも分泌できるのかもしれない。Fasの刺激によるアポトーシスには蛋白合成が不要であるため、この意味では自殺タンパク質の条件にかなう。

またオートクラインの可能性を示唆するものとして、NGF除去で誘導される神経細胞の細胞死において、神経細胞の培養上清に神経細胞の致死活性をもつ物質が存在することが報告されている<sup>37)</sup>。

アポトーシスを起こしている前立腺細胞で硫酸化糖タンパク質(SGP-2)をコードする遺伝子が強く発現することがみいだされたが、これが指芽形成や白血球のプログラム細胞死などのいくつかの他の細胞死の場合でも同様に発現することが報告された<sup>30)</sup>。致死活性は不明だが、細胞種の範囲の広さから興味深い。

血管以外のプログラム細胞死に関する総説を参考として紹介する<sup>26-28, 35)</sup>。

#### 1-5. ヘビ毒

ヘビ毒に対する研究状況について、出血性ヘビ毒中には多くの酵素類が同定されている反面、神経毒性のヘビ毒に比べその毒性発現機構の解明は遅れており、十分に分かっていない<sup>46)</sup>。しかし、いくつかの出血に関与する因子の単離は行われており、それぞれ血小板、細胞外マトリクス、血漿に作用して、出血を助長させると考えられているが、血管内皮層をどの様にして破るのかについては分かっていず、それに必要な因子もわかっていない<sup>47)</sup>。

さらに、ヘビ咬症の治療方法については、従来よりヘビ血清に依っており、十分に機能的とは言えず、死に至る被害者が多いので、出血機構が解明されれば、治療法に対しても新しいものを生み出す可能性を提供するかも知れない。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 材料

F G F は、ウシ脳から Lobb の方法<sup>50)</sup>により抽出した。ウシリコンビナント塩基性 F G F、ブタトランスフォーミング増殖因子 $\beta-1$  (T G F -  $\beta$ ) は R & D システムズ (ミネアポリス) より購入した。上皮成長因子 (E G F)、インスリン、トランスフェリン、デキサメタゾン は コラボレイティブリサーチ (ベドフォード) より購入した。シクロヘキシミド、ヘパリン、T P A (12-0-tetradecanoic 13-phorbol acetate) はシグマ (セントルイス) より購入した。インターロイキン 1 は大日本製薬 (東京) から購入した。腫瘍壊死因子 (T N F) は旭化学工業 (東京) より購入した。H-7 は生化学工業 (東京) より購入した。

M C D B - 1 0 4 は極東製薬 (東京) から購入した。M E M は日水製薬から購入した。ウシ胎児血清は G I B C O (ニューヨーク) から購入した。ヒトさい帯静脈内皮細胞は J a f f e<sup>51)</sup>の方法によりさい帯から得て培養し、第八抗原関連因子抗体により、血管内皮細胞であることを確認した。ウシ平滑筋細胞 (B F A S - 6 3 C)、ヒト肺動脈内皮細胞 (H P A E C)、ラット平滑筋 (R S M C - 3)、ヒト胎児肺繊維芽細胞 (H F) は東京都老人研究所加治和彦博士から提供を受けた。

プロテイナーゼ K, R N アーゼ A, エチジウムブロマイド は和光純薬 (大阪) より購入した。

ヘビ毒 は和光純薬 (大阪) よりハブ (*Trimeresurus flavoviridis*)、タイコブラ (*Naja naja kaouthia*)、またシグマよりクサリヘビ (*Viper ammodytes*)、マムシ (*Agkistrodon halys blomhoffii*)、パフアダー (*Bitis arietans*)、ガラガラヘビ (*Crotalus atrox*)、アマガサヘビ (*Bungarus fasciatus*)、ウミヘビ (*Enhydrina schistosa*) を購入した。

## 2-2. 方法

### 2-2-1. 細胞培養

ヒトさい帯静脈内皮細胞はゼラチンコートした培養皿中で、FBS 10%，FGF 70 ng/ml，ヘパリン 100 μg/ml 添加したMCDB-104 培養液により 37℃，5%二酸化炭素下で培養した。牛平滑筋細胞（BFAS-63C）とヒト肺動脈内皮細胞（HPAEC）はFBS 10% 添加したMCDB-104で培養した。ラット平滑筋（RSMC-3）とヒト胎児肺繊維芽細胞（HF）はFBS 10% 添加したMEM培養液で培養した。

### 2-2-2. 細胞の計数

#### 1) 栄養因子除去の場合

実験では細胞が皿にコンフルエントになるまで増殖させ、数日たった後、FGFまたは血清，あるいは両方を欠いた培地に替えて，細胞死の過程を始めさせた。剥離した細胞はそのまま，皿に接着している細胞はトリプシンで剥してから細胞数を計数器で計数した。

#### 2) ヘビ毒の場合

サブコンフルエントの状態の細胞をFGFや血清の入っていない培地に替えて，ヘビ毒素を添加して細胞死の過程を開始させた。死細胞を培地で1回洗った後，トリプシンで付着している生存細胞を剥して，コールターカウンターにより細胞数を計数した。

### 2-2-3. 細胞の形態

細胞の形態は位相差顕微鏡によって観察し，写真を撮った。

### 2-2-4. DNA電気泳動

DNAの断片化の分析は以下の方法で行った。細胞をドデシル硫酸ナトリウムと0.2 mg/mlプロテアーゼKの入ったバッファーで溶解した後，50℃，5時間インキュベートした。細胞のDNAを1:1のフェノール/クロロ

ホルムで2回，クロロホルムで1回処理して抽出した．その後70%エタノールでDNAを沈澱させ，1時間水中で冷却した後，1時間室温で風乾した．RNアーゼ処理を37℃1時間，プロテアーゼK処理を37℃，1時間行った後，再びフェノール／クロロホルムで1回，クロロホルムで2回処理して抽出した．水層よりエタノール沈澱によってDNAを得た．1.5%または2%のアガロース電気泳動によってDNAを分け，エチジウムブロマイドによってDNAを染め，UVトランスイルミネーターで蛍光の写真をとった．

### 3. 結果

#### 3-1. 栄養因子の除去によるプログラム細胞死の誘導

血管内皮細胞において、以前よりその成長、生存には特定の増殖因子が必要なことが知られていた<sup>7)</sup>。血管内皮細胞に対して生存因子の除去による死が調べられた結果、やはり、タンパク質合成阻害によって死が抑制され、プログラム細胞死であることが示された<sup>5)</sup>。この死に際しては、自己DNAの切断をともない、いわゆるアポトーシス<sup>8) 9)</sup>によって死ぬことが明らかとなった。

##### 3-1-1. 細胞剥離現象

FGF存在下で培養されているヒトさい帯静脈内皮細胞からFGFを除去すると、2-3時間後から細胞の基質からの剥離が起こり始め、その細胞は死に至る(図1)。FGFを再び添加すると1-2時間後から剥離は止まる(図3)。

しかしいったん剥離した細胞は、すぐにFGFを戻してやっても再び皿に接着することはない、その結果増殖することもない。細胞はしばらくして膜のやぶれを起こし(2次的ネクローシス)、やがて分解する。膜がやぶれるまでの途中、たとえDNAがこまぎれに切断されていようとも膜系は保存されているので、何らかの細胞活動が営まれているかと思われる。したがって膜がやぶれるまでは正確な死とは言えないかもしれないが、個体レベルでの死に例えれば脳死のようなものと考えられる。

神経細胞・血球細胞に対する血管内皮細胞の違いの一つは、プログラム細胞死にともなって細胞が剥離することである。上皮系細胞のアポトーシスにもよくみられることであるが、細胞死にともなって死細胞は基質や隣接細胞から離れ、マクロファージに貪食されやすいようになったとも見える。生体内では2次的ネクローシスは起こさずに、なぜかいくつかの小さな膜系(アポトーティックボディと呼ばれる)に分裂した後、マクロファージに貪食される。血管内皮細胞の培養系のプログラム細胞死では残念ながらそのようなアポトーティックボディの形成はみられない。

### 3-1-2. 蛋白質合成の要求

F G F を除去しても，タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを添加すると死が抑制される（図4）．これがプログラム細胞死のひとつの指標である．同様の現象はヒト肺動脈内皮細胞でも観察され，ラット平滑筋細胞，ヒト胎児肺由来繊維芽細胞などではみられなかった．

いったいどのようなタンパク質の合成を要求しているのかについては，後節で触れるようにわかっていない．

### 3-1-3. アポトーシス

剥離した内皮細胞のDNAを抽出し，電気泳動にかけると，DNAが180塩基対単位の切断を起こしてこまぎれになっていることが分かった（図2）．このようなDNAの切断はアポトーシスに特徴的なもので，自然分解やネクローシスでは見られない．

血球系における生存因子の除去によってもやはりアポトーシスが起こる<sup>2-4)</sup>．しかし神経系ではむしろアポトーシスによるという報告は少ない．神経ではアポトーシスでもネクローシスでもない第3の死に方がかなりのウェートを占めているらしい<sup>1)</sup>．しかし神経系の株細胞であるPC12細胞ではアポトーシスが起こることが報告されているので<sup>13)</sup>，細胞増殖能力と関係があるのかもしれない．

## 3-2. 細胞内機構の解析

### 3-2-1. 生存因子の決定

近年の血管系の細胞の増殖や血管新生の研究の展開によって，血管を造ってゆく機構が随分明らかになってきた．このような血管新生の機構と，余分な血管を除去する機構は対称的なものと思いがちであるが，後述するように，血管退縮は，血管新生の抑制，血管増殖の抑制の延長線上には考えられない異なった調節を受けている．言いかえれば，血管生存機構が血管増殖機構や血管新生

機構（せまい意味での）と独立して存在するようである。例えば，血管生存因子は血管増殖因子であるとは限らず，後者が前者であるとも限らない。

### 1) FGF

ヒトせい帯静脈内皮細胞において種々の成長因子のプログラム細胞死の阻止能力を見ることにより生存因子活性を見たところ<sup>6)</sup>，aFGF，bFGFにはともに強い生存活性が見られた（図5）。ともに血管内皮細胞の増殖，遊走，管腔形成の強力な誘導因子であることを考え合わせると，やはりこれらは血管形成過程のすべてをバイパスできる特別な因子らしい。

創傷治癒の過程では，組織の修復の開始と共に急激な血管新生が起こるが，修復が一旦完了すると今度は過剰にできていた血管が自然に退縮をする。FGFは，組織の修復に呼応して組織中に検出される<sup>38)</sup>。創傷治癒後の血管退縮の誘導では，このときの修復完了にともなうFGFの分泌停止が引きがねになることが考えられる。

### 2) EGF

EGFはこの細胞において増殖促進効果があるにもかかわらず，生存効果を示さなかった。PDGF，インスリン，TGF- $\beta$ ，トランスフェリンなども同様にして生存効果を示さなかった（図5）。しかしラット心血管内皮細胞ではEGFに依存して生存しており，EGF除去により，やはり急激な細胞死が起こることが報告されている<sup>17)</sup>。

### 3) グルココルチコイド

デキサメタゾン<sup>39)</sup>は血管内皮細胞に対して弱い生存効果を示す（図5）。しかし，それとは対照的にデキサメタゾンには増殖促進活性がなく，血管新生においてはむしろ抑制的に働く。一方リンパ球ではデキサメタゾンによってプログラム細胞死を引き起こすと言う事実があり，グルココルチコイドの作用機構を考える上でも興味深い。

#### 4) T P A

発ガンプロモーターである T P A は顕著な生存効果を示す。しかし T P A にはこの細胞の増殖促進活性はない。血管内皮細胞において T P A と同様に C - キナーゼを活性化する例が報告されている T N F, I L - 1 は生存効果を示さなかった (図 6)。白血球では内皮細胞と同様 T P A が顕著な生存効果を示すが、神経細胞ではそのような効果はないようである。

#### 3 - 2 - 2. 細胞内伝達経路

生存因子である F G F は、もともと増殖促進効果をはじめ、プロテアーゼなどの各種タンパク質の合成分泌の促進やプロスタグランジンの合成抑制など多くの作用を持つ。F G F のセカンドメッセンジャーについても、チロシンキナーゼの活性化、プロテインキナーゼ C の活性化、c A M P 合成の促進のほか、F G F 自体の核運搬等が知られている。このうちのいずれが生存効果に関与しているのかが分かれば、プログラム細胞死の機構の解明に役立つはずである。そこで、この点に関していくつか実験を行った。

F G F を始めとした多くの増殖因子はチロシンキナーゼを活性化するという共通した性質を持つ。そこでまずチロシンキナーゼ活性化が関与するかどうかを調べた。チロシン脱リン酸化酵素を阻害する活性をもつバナジン酸に生存効果があるかどうかを見た結果、有意な生存効果が見られた。またチロシンキナーゼ阻害効果があるといわれる抗生物質のゲニステインを F G F とともに添加したところ F G F の生存効果を有意に阻害した。以上のことから、チロシンリン酸化がプログラム細胞死の信号伝達に関与している事が示唆される。

つぎに、T P A に強力な生存効果があったことから、プロテインキナーゼ C の関与について調べた。プロテインキナーゼ C の阻害剤である H - 7 を F G F あるなしで細胞死に対する効果を調べた (図 7)。H - 7 は F G F を生存効果を遮断し、さらに F G F 非存在下の細胞に対しても細胞死の促進効果を示した。これは構成的に活性を発現しているプロテインキナーゼ C を阻害する事によるのかも知れない。また、T P A 以外にプロテインキナーゼ C を活性化する物質として、ジブチルグリセロール、ジオクタノイルグリセロールを調べたところ、有意な生存効果を示した。

cAMPを上昇させる刺激物質として、ホスホジエステラーゼ阻害剤のイソブチルメチルキサンチン、ジブチルcAMP、8ブromo cAMP、イソプロテレンール、プロプラノロールなどを調べたが、共通して一過的な死遅延効果はあるものの、長期的な生存効果は見られなかった。

### 3-3. 血管内皮細胞プログラム細胞死誘導因子としての蛇毒

#### 3-3-1. 出血性ヘビ毒

血管内皮細胞に積極的にプログラム細胞死を誘導させる致死物質としては、腫瘍壊死因子(TNF)しか報告されていないが、これは血管内皮細胞に特異的ではなく、正常内皮細胞に対する効果はむしろ弱いことが知られている。われわれは、血管が弾力的な消長を繰り返す高機能の臓器であるからには、内皮細胞に対してもっと特異的かつ大規模にプログラム細胞死を誘導する致死物質が生体内に存在し、血管それ自体の消長のために機能しているはずであると考え、血管系に影響を与えそうなものについて探索した結果、出血性ヘビ毒の粗毒に、内皮細胞に特異的にアポトーシス(プログラム細胞死)を誘導する強力な活性があることがわかった。

ヒトさい帯静脈内皮細胞に $2\mu\text{g}/\text{ml}$ のガラガラヘビ粗毒を添加すると6時間後に細胞の断片化が始まる。24時間後にはほとんどの細胞が断片化して細胞死にいたる(図10)。

細胞の断片化はアポトーシスに典型的な徴候であるため、もう一つの徴候であるDNAの断片化が起こっているかどうかを調べた。死細胞のDNAを抽出しアガロース電気泳動により分子量の分布を調べた結果、図11のようにDNAは180塩基対の整数倍の大きさに断片化されており、確かにアポトーシスである事が確認された。

ヘビ毒素は短時間の間に100%の内皮細胞にアポトーシスを誘導し、細胞の断片化にいたるアポトーシスの全過程を完了させる。他の多くのアポトーシスの*in vitro*の系が、細胞の断片化には至らないことを考えると、内皮細胞に対する蛇毒の誘導効果は極めて強力であるといえる。

### 3-3-2. 解毒物質

もし蛇毒による細胞死がプログラム細胞死だとしたら蛋白合成阻害剤や生存因子によって死が抑制される可能性がある。そこで、ガラガラヘビ毒による細胞死のFGFとシクロヘキシミドによる抑制効果を調べた(図8)。FGFもシクロヘキシミドも非常に強力な抑制活性を示した。したがって、出血性蛇毒による血管内皮細胞の細胞死は、プログラム細胞死である事が示された。また生存因子FGFが強力な抑制物質である事が示された。

### 3-3-3. 各種ヘビ毒による誘導

蛇毒による血管内皮細胞へのプログラム細胞死の誘導が、蛇毒による出血性と関係があるかどうかは興味深い。そこで各種の出血性蛇毒と神経性蛇毒による誘導効果を調べた(図9)。

クサリヘビ、マムシ、パファダー、ハブ、ガラガラヘビの出血性ヘビ毒には共通して蛋白合成阻害剤による細胞死の抑制が見られ、プログラム細胞死の誘導を示した。逆にアマガサヘビ、ウミヘビ、タイコブラの神経毒性ヘビ毒には、タンパク質合成阻害剤による抑制は見られなかった。この中でタイコブラには高濃度で、ネクローシス活性が見られた(図10, 11)。

またハチ毒として、スズメバチ毒(含メリチン)、マストパランを調べたがプログラム細胞死誘導活性は無かった。

### 3-3-4. 細胞特異性

内皮細胞以外の細胞として、ウシ血管平滑筋、ラット血管平滑筋、ヒト胎児胚繊維芽細胞にたいして、出血性ヘビ毒にプログラム細胞死誘導が出来るかどうか調べた(図12)。しかし、ネクローシスを起こす濃度に至ってもプログラム細胞死は誘導しなかった。逆にさい帯静脈内皮細胞以外の内皮細胞として、ヒト肺動脈内皮細胞に誘導するかどうか調べたところ、同様の細胞の断片化現象を伴った細胞死が見られ、タンパク質合成阻害剤による抑制が見られた。したがって血管内皮細胞に特異的にアポトーシスを誘導する事が示唆された。

### 3-3-5. ヘビ毒中の活性物質の属性

ヘビ毒中の毒素は、種々の生物の毒素に比べて特異性の面で非常に進化の進んだ毒素と考えられており、多くの標的酵素や受容体それぞれに対して、極めて特異的な作用を発揮することが知られている。したがって、蛇毒中の誘導因子が単離、同定されれば、その特異性から標的受容体や細胞死誘導の伝達機構を明かにすることが可能になる。そこでそのような誘導物質本体の性質を調べるためいくつかの実験を行ったところ、蛇毒中のプログラム細胞死誘導活性は、以下の属性を持っている事が分かった。

誘導活性はカルシウム、マグネシウム欠如の磷酸緩衝液中では速やかに活性を失う。MCD B-104培養液中では、長期間の活性の保持が可能である。

さらに、蛇毒をガラス試験管中に保存しておくとう活性が無くなる事が分かった。ポリプロピレン試験管中では活性が無くならない。

また熱処理によって失活するのでタンパク質である可能性が高い。

そこで誘導活性が、プロテアーゼ活性に依存するかどうか調べた結果、セリンプロテアーゼインヒビターのフェニルメチルスルフォニルフルオリドによって抑制されず、またメタロプロテアーゼインヒビターのオルトフェナンスロリンでも抑制を受けなかった。

誘導効果が蛇毒中のホスホリパーゼA2に起因するかどうかを調べるため、ガラガラヘビ毒由来ホスホリパーゼA2を購入して実験した結果、ホスホリパーゼA2には誘導効果がなかった。

## 4. 考察

### 4-1. 血管内皮細胞のプログラム細胞死

本研究では、血管内皮細胞が、増殖因子（繊維芽細胞増殖因子，FGF）の除去によって、プログラム細胞死（アポトーシス）を誘導して死ぬことを示し、血管内皮のプログラム細胞死の *in vitro*系を初めて確立した。この細胞死は蛋白合成の阻害によって抑制され、またDNAが180塩基対で切断されるアポトーシスであった。この系は死細胞が培養器質から剥がれてくるため細胞数を計測しやすく、また生死細胞が分離できるために生化学的な研究がしやすい。その特徴によって、この系で生存因子や、致死因子の出血性蛇毒が見いだされることになった。そして将来誘導因子精製のバイオアッセイの系としても用いられるはずである。

この研究の特色は、血管系の構築や、恒常性の維持の機構を知るために、血管の退縮、なかでもプログラム細胞死の機構の側面から研究することにある。

血管系の退縮の現象は、生体内の多くの場合、それが緩やかに起こるものであり、しかも除去された細胞は速やかに貪食、代謝されてしまうので、痕跡が観察しにくく、血管系を取り巻く要素が非常に複雑、精緻であることともあいまって、研究の進展を阻害していた。今回の培養細胞を用いた血管内皮細胞のプログラム細胞死の研究は、この分かりにくい退縮の現象の研究の新しい取り係りを提供すると考えられる。

### 4-2. 血管死の細胞内シグナル

増殖因子と同様に細胞死を抑制するものとして、血清、発ガンプロモーター、グルココルチコイドなどがあることを示し、細胞内のシグナル伝達機構などについて調べた。そして血管内皮細胞の増殖、透過性、形態変化などに影響を与える種々の物質が、プログラム細胞死の誘導、抑制に影響を与えないことなどが分かった。

一般的にプログラム細胞死は、細胞内でどのようなしくみで起こっているの

かについてあまりよく分かっていない。しかし血管内皮細胞やいくつかの細胞種では、つぎのような細胞内シグナルによるコントロールがみられるようである。

血管内皮細胞において生存因子の FGF によって、細胞内でタンパク質中のチロシン残基のリン酸化が引き起こされる。NGF も FGF と同様レセプターにチロシンキナーゼを持っており、IL-3、IL-2 などではレセプター結合のチロシンキナーゼこそ見つかっていないものの、これらの因子による刺激に呼応してチロシンリン酸化が起こる。このようなことから、生存因子の効果の発現に際して必要とされるシグナル伝達系には、チロシンリン酸化反応によるタンパク質機能の修飾を介するものが主要な経路となることが考えられる。実際、いくつかの系でチロシン脱リン酸化の阻害剤であるバナジン酸が生存効果を持つことが報告され、造血幹細胞では IL-3 レセプターの代わりに EGF レセプターを導入して生存を維持させることに成功している<sup>21)</sup>。

血管内皮では、TPA に生存効果のあることと、リン酸化酵素阻害剤の H-7 による抑制効果から、C キナーゼのようなリン酸化酵素の関与が示唆された。

血管内皮細胞では、FGF はプロテインキナーゼ C を活性化する事が示唆されている<sup>59)</sup>。しかし、TPA による C キナーゼの活性化は、必ずしも内皮細胞の FGF 応答をまねる事はできない。例えば、増殖応答<sup>53, 54)</sup>やプロスタグランジン合成<sup>55, 56)</sup>等は誘導できない。アポトーシスの抑制効果は、プロテアーゼの合成や他のタンパク質の合成のようにより単純なケースに属しているようである。IL-1 と TNF は血管内皮細胞のアポトーシスを抑制する事はできなかった。しかしそれらはプロテインキナーゼ C を活性化する事が報告されている<sup>52, 60)</sup>。IL-1 と TNF に我々の系で効果がないという事は別のサブタイプのプロテインキナーゼ C が関与しているのかも知れない。

多くの血球系のプログラム細胞死でも TPA に生存効果がある。最近 IL-2 依存性のリンパ球の実験系で、IL-2 によるアポトーシスの抑制がプロテインキナーゼ C の活性化に関与している事が報告された<sup>62)</sup>。IL-6 による生存効果では TPA の効果と H-7 による阻害が報告されており、未知のリン酸化酵素の関与が示唆されている<sup>36)</sup>。しかし、神経系では TPA による生存効果はなく、多くの細胞に一般的なものとは言えないようである。

血管系，血球系では $Ca^{2+}$ の上昇に生存効果はない。しかし，神経系では逆に $Ca^{2+}$ による生存効果が多く示されているのが特徴的である。細胞外高 $K^+$ による生存効果も $Ca^{2+}$ の上昇を介しており，NGF依存性も $Ca^{2+}$ 濃度に依って規定されるとの報告もある<sup>12)</sup>。

#### 4-3. 血管内皮細胞プログラム細胞死誘導因子

増殖因子の除去によるプログラム細胞死は，神経，血球のほかに上記のように血管内皮細胞にも起こることがわかった（図13）。これらの現象はそれぞれ神経の配分，免疫記憶などで生体の重要な機能に積極的に寄与している。他方，神経，血球ではやはりそれぞれ特異的な致死物質が存在している。自己抗原は免疫寛容での致死物質としてはたつき，グルタミン酸は脳虚血，記憶に関与するかも知れない。したがってもし血管内皮細胞に特異的な致死物質が存在すれば，出血性疾患や血管構築などで重要な機能をにうことが類推できる。

本研究では血管内皮細胞のプログラム細胞死の引金となる致死物質が，生体内に存在すると考え検索した結果，ハブ，ガラガラヘビなどの出血性蛇毒中に内皮細胞のプログラム細胞死を強力に誘導する活性が存在することを発見した。この活性は種々の出血性蛇毒に共通して見られ，また血管内皮細胞以外の細胞にはプログラム細胞死を誘導しない等，非常に特異的な効果を発揮した。蛇毒液中に存在する多くの毒素は，生体の伝達物質や酵素などを巧妙に模倣して毒性を発現することが知られているので，蛇毒中の内皮細胞にプログラム細胞死を誘導する因子は，生体内で血管退縮を制御する受容体や酵素などに特異的に結合し，特異的な細胞内外の機構を誘導させると考えられる。したがって，もし蛇毒中の血管退縮因子が単離，同定されれば，その特異性から生体内の退縮機構をつかさどる受容体や致死因子，細胞内外の機構の解明の直接の手がかりとなり，数々の血管退縮に関与する疾患の治療応用に役立つことが予想される。

また同時に蛇毒による出血機構についても現在解明されていないので，その解明，蛇咬症の治療応用にも役立つと考えられる。ヘビ毒は大まかに神経毒性のヘビ毒と出血性ヘビ毒に分かれ，コブラ等は前者，ハブ，マムシ，ガラガラヘビ等は後者に含まれる<sup>48)</sup>。神経毒においては，ブンガロトキシンなどによるアセチルコリン受容体の阻害などの研究で，その毒性発現の機序は良く分かっ

ている。しかし出血毒の方はそれによる被害者が多いのにもかかわらず研究は進んでおらず、機序がはっきりしない。現在のところ、基底膜の溶解をになうと考えられているメタロプロテイナーゼ、血小板凝集を阻害すると考えられるディスインテグリン、血漿凝固を阻害するフィブリノゲナーゼ等が分離されており、出血機構への関与が考えられている。しかしこれらによっては出血の第一段階と考えられる血管内皮細胞層を破る説明はつかない。そこで、本研究によって見いだされた内皮細胞のアポトーシス誘導活性がその役割を担うという仮説が立つ(図14)。ヘビ毒による内皮層の破れ方としては、血管透過性が一様に上昇するというよりは、赤血球が通るほどの大きなピンボールがぼつりぼつりと開いてゆくという観察の報告<sup>47)</sup>は、内皮細胞のプログラム細胞死の誘導であるという仮説と良く一致している。

#### 4-4. おわりに

血管内皮細胞のプログラム細胞死に関して、生存因子や致死因子などの血管系をとりまく因子の関与などについて研究した。血管生存、退縮のしくみの全貌解明にはまだまだだが、その系口のひとつがひらけてきたのかもしれない。これらの研究の展開によって、複雑で精緻な血管系のしくみが、またさらに明らかになることを期待したい。

## 引用文献

- 1) Martin, D. P. et al.: J. Cell Biol, 106, 829 (1988)
- 2) Duke, R. C., Cohen, J. J.: Lymphokine Res., 5, 289-299 (1986)
- 3) Smith, C. A., Williams, G. T., Kingston, R., Jenkinson, E. J., and Owen, J. J. T.: Nature, 337, 181-184 (1989)
- 4) Williams, G. T., Smith, C. A., Spooner, E., Dexter, T. M., and Taylor, D. R.: Nature, 343, 76-79 (1990)
- 5) Araki, S., Shimada, Y., Kaji, K., Hayashi, H.: Biochem. Biophys. Res. Com., 168, 1194-1200 (1990)
- 6) Araki, S., Shimada, Y., Kaji, K., Hayashi, H.: Biochem. Biophys. Res. Com., 172, 1081-1085 (1990)
- 7) Gospodarowicz, D., Brown, K. D., Bridwell, C. R., & Zetter, B. R.: J. Cell Biol., 77, 774-778 (1978)
- 8) Willie, A. H., Morris, R. G., Smith, A. L., and Dunlop, D.: J. Pathol., 142, 67-77 (1984)
- 9) Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R.: Br. J. Cancer, 26, 239-257 (1972)
- 10) Robson, H. et al.: Nature, 343, 642 (1990)

- 11) Laster, S. M. et al.: J. Immunol., 141, 2629 (1988)
- 12) Koike, T., Tanaka, S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88, 3892 (1991)
- 13) Rawson, C .L. et al.: J. Cell Biol., 113, 671 (1991)
- 14) Kure, S. et al: Biochem. Biophys. Res. Com., 179, 39 (1991)
- 15) Tian, Q. et al: Cell, 67, 629 (1991)
- 16) Azmi, T. I., O'Shea, J. D.: Lab. Inv., 51, 206 (1984)
- 17) Etoh, T. et al.: Biochem. Biophys. Res. Com., 162, 1010 (1989)
- 18) Nuaez, G. et al.: Nature, 353, 71 (1991)
- 19) Vaux, D. L., Corry, S., Adams, J. M.: Nature, 335, 440 (1988)
- 21) Wang, H. M. et al.: EMBO J., 8, 3677 (1989)
- 22) Rapp, U. R. et al.: Nature, 317, 434 (1985)
- 23) Nawroth, P. P., et al.: J. Exp. Med., 168, 637 (1988)
- 24) Sato, N. et al.: J. Nat. Cancer Inst.: 76, 1113 (1986)
- 25) O'Shea, J. D., Nightingale, M. G., & Chamley, W. A.: Biol. Reprod., 17, 162-177 (1977)
- 26) Kerr, J. F. R. et al.: "Perspectives on mamalian Cell Death", 93,

Oxford Univ. Press, Oxford. (1987)

- 27) 山田武ら：細胞, 21, No.4 (1989)
- 28) 畠中寛ら：代謝, 28, No.11(1991)
- 29) Yonehara, S. et al.: J. Exp. Med. 169, 1747 (1989)
- 30) Ralph, B. et al: Mol. Cell. Biol., 9, 3473 (1989)
- 31) Goldstone, S. D., Lavin, F.: Biochem. Biophys. Res. Com., 178, 746 (1991)
- 32) Kyprianou, N., Isaacs, J. T.: Mol. Endocrinol., 3, 1515 (1989)
- 33) Nakamura, M. et al.: Biochem. J., 89, 143 (1981)
- 34) Alnemer, E. S., Litwack, G.: J. Biol. Chem., 264 (1989)
- 35) Williams, G. T.: Cell, 65, 1097 (1991)
- 36) 中島弘一ら：蛋白質核酸酵素, 36,687 (1991)
- 37) Miwa, N. et al.: J. Cancer Res. Clin. Oncol., 110, 196 (1985)
- 38) Hanneken, A. et al.: J. Cell. Physiol., 138, 115 (1989)
- 39) Robeye, B. et al.: Am. J. Pathol., 138, 447 (1991)
- 40) Hockenbery, D. M. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 6961 (1991)

- 41) S. Araki, Takayuki Ishieda, Tatsunaori Yamamoto, Kazuhiko Kaji, & Hiroshi Hayashi. Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venoms in vascular endothelial cells.; (1992) Biochem. Biophys. Res. Comm., in press.
- 42) 荒木 聡彦, 林博司. 血管系のプログラム細胞死 (1992, 血管, 15 (37-42))
- 43) Murphy, K. M., Heimberger, A. B. & Loh, D. Y. (1990) Science, 250, 1720-1723.
- 44) Meyaard, L., Otto, S. A., Jonker, R. R., Mijinster, M. J., Keet, R. P. M. & Miedema, F. (1992) Science, 257, 217-219.
- 45) Kure, S., Tominaga, T., Yoshimoto, T., Tada, K. & Narisawa, K. (1991) Biochem. Biophys. Res. Comm., 179, 39-45.
- 46) Shigeno, T., Mima, T., Takakura, K., Graham, D. I., Kato, G., Hashimoto, T, & Furukawa, S. (1991) J. Neurosci., 11, 2914-2919
- 47) Ohsaka, A., Ohashi, M., Tsuchiya, M., Kamisaka, Y. & Fujishiro, Y. (1971) Japan J. Med. Sci. Biol., 24, 34-40.
- 48) Russel, F. E., in Casarett and Doull's Toxicology, eds. Klaassen, C. D., Amdur, M. O. & Doull, J. (1986) Macmillan Publishing Co., N.Y. pp706-756.
- 49) Jaffe, E. A. (1984) Biology of Endothelial Cells, pp.1-456, Martinus Nijhoff Publishers, Boston.

- 50) Lobb, R. R., and Fett, J. W. (1984) *Biochemistry* 23, 6295-6296
- 51) Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., & Minick, R. C. (1973) *J. Clin. Invest.* 52, 2475-2756
- 52) Goldgaber, D., Harris, H. W., Hla, T., Maciag, T., Donnelly, R. J., Jaconsen, J. S., Vitek, M. P., and Gajdusek, D. C. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 7626-7610
- 53) Hoshi, H., Kan, M., Miok, H., Chen, J., and McKeehan, W. L. (1988) *FASEB J.* 2, 2797-2800
- 54) Doctrow, S. R., and Folkman, J. (1987) *J. Cell Biol.* 104, 679-687.
- 55) Hasegawa, N., Yamamoto, M., and Yamamoto, K. (1988) *J. Cell. Phys.* 137, 603-607.
- 56) Wu, K. K., Hatzakis, H., Lo, S. S., Seong, D. C., Sanduja, S. K., and Tai, H. H. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 19043-19047.
- 57) Gross, J. L., Moscatelli, D., and Rifkin, B. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 2623-2627.
- 58) Raines, E. W., and Ross, R. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 5154-5159.
- 59) Presta, M., Maier, J. A. M., Rusnati, M., and Ragnotti, G. (1989) *J. Cell. Phys.* 141, 517-526.
- 60) Magnuson, D. K., Maier, R. V., and Pohlman, T. H. (1989) *Surgery*

106, 216-223.

61) Coussens, L., Parker, P. J., Rhee, L., Yang-Feng, T. L., Chen, E., Wagerfield, M. D., Franke, U., and Ullrich, A. (1986) *Science* 233, 859-866.

62) Tarduchy, G. R., and Rivas, A. L. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 164, 1069-1075.

## 図説明

図1 FGF除去による血管内皮細胞の死. a) コンフルエントのヒトせい帯静脈血管内皮細胞. b) FGF除去後3時間の内皮細胞. いくつかの細胞が丸くなり始めています. c) FGF除去後6時間の内皮細胞. 多くの細胞が丸くなり基質から剥がれている. しかし膜の破損は伴っていない. これらの細胞はプログラム細胞死を起こしている.

図2 血管内皮細胞死におけるDNAの断片化. 生きている細胞, 膜を破壊して死んだ細胞, FGF除去で死んだ細胞のDNAを抽出し, アガロースゲル電気泳動でDNAのサイズを見ている. レーン1) 生きている細胞のDNA. レーン2) 凍結融解で膜を破壊し, 37°Cに6時間放置した後の細胞のDNA. レーン3) FGF除去6時間後の死細胞のDNA. レーン4) 分子量マーカー ( $\lambda$ /HindIII digest). 単位はkbp. FGF除去による死細胞は180bp単位のDNAの断片化を伴っている.

## 図3 細胞死のタイムコース

FGF除去後, 単位時間当たりに培養皿から剥離した細胞数を計測した. 時間0においてFGFのない新鮮培地に替えた. 1時間ごとに培地を回収し, 新しい培地に置き換えた. 回収した培地中の剥離した細胞の数を, 時間に対してプロットした. 数値は毎時間ごとに死んだ細胞数を表す. 矢印の時点で1組の細胞はFGFの入った培地に戻し(●), もうひと組はそのままである(○).

## 図4 シクロヘキシミドによる細胞死の抑制.

培養皿に残った細胞の数を計測した. 印は(●), コントロール; (○), -FGF; (△), -FGF+シクロヘキシミド. シクロヘキシミドの濃度は1 $\mu$ g/mlである.

#### 図5 各種増殖因子によるアポトーシスの抑制

血清, FGF除去後3日のインキュベーションで皿に残った細胞の数. インキュベーション開始時,  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ シクロヘキシミド(CHX),  $70\mu\text{g}/\text{ml}$ FGF,  $5\text{ng}/\text{ml}$ bFGF,  $25\text{ng}/\text{ml}$ EGF,  $5\mu\text{g}/\text{ml}$ トランスフェリン(trans.),  $5\mu\text{g}/\text{ml}$ インスリン(ins.),  $5\text{ng}/\text{ml}$ TGF- $\beta$ ,  $10\text{ng}/\text{ml}$ PDGF,  $50\text{ng}/\text{ml}$ デキサメタゾン(DEX)をそれぞれ添加した. 斜線の棒グラフはFGF, 血清除去前の細胞数を表す. noは何も加えていない. それぞれ2回の計測の平均である.

#### 図6 アポトーシス抑制の濃度依存性

血清, FGF除去後3日のインキュベーション後の生存細胞数. (○)は血清, FGF除去前の細胞数.

#### 図7 アポトーシス抑制におけるH-7の効果

培養皿から剥離した細胞数を数えることによる, FGF, 血清除去による単位時間当たりの死細胞数. 時間0で血清, FGFを除去し, すぐに $70\text{ng}/\text{ml}$ FGFまたはH-7, あるいは両方を添加. 2時間ごとに回収された浮遊細胞を計数した. 記号は( $\Delta$ ), コントロール; (○), +FGF; ( $\blacktriangle$ ), +H-7; ( $\bullet$ ), +FGF+H-7.

#### 図8 出血性ヘビ毒存在下での内皮細胞の生存率

サブコンフルエント(約 $10^5\text{cells}/\text{cm}^2$ )のヒトさい帯静脈内皮細胞(10-20PDL)を,  $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ガラガラヘビ毒(Crotalus atrox)を添加. また同量のヘビ毒と $70\text{ng}/\text{ml}$ FGF, さらに同量のヘビ毒と $1\mu\text{g}/\text{ml}$ シクロヘキシミドを添加. 生存細胞数は添加後24時間で, コールターカウンターにより計測した.

### 図9 各種ヘビ毒存在下での血管内皮細胞の生存率

実験条件は図1と同じ。生存細胞の数は刺激後30時間で計測した。斜線の棒グラフは毒存在下の生存率、白棒グラフは毒と $1\mu\text{g}/\text{ml}$ シクロヘキシミド存在下の生存率。viper, *Viper ammodytes*; mamushi, *Agkistrodon halys blomhoffii*; puff adder, *Bitis arietans*; habu, *Trimeresurus flavoviridis*; rattlesnake, ; bungarus, *Bungarus fasciatus*; sea snake, *Enhydrina schistosa*; cobra, *Naja naja kaouthia*.

### 図10 ヘビ毒によるアポトーシスとネクローシスの誘導

出血性ヘビ毒と神経毒性ヘビ毒によって刺激された血管内皮細胞の形態的な違い。上の写真は $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のコブラ毒を添加。下の写真は $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のガラガラヘビ毒を添加。

### 図11 ヘビ毒処理後12時間の死細胞のDNA分子量分布。

DNAは処理細胞から抽出し、電気泳動により分析した。レーン1, コブラ毒; レーン2, ガラガラヘビ毒; レーン3, ハブ毒。

### 図12 出血性ヘビ毒による各種動物細胞の生存率。

実験条件は図1と同じ。試験した細胞はBSMC, BFAS-63c (牛平滑筋細胞, 28PDL); RSMC, RSMC-3 (ラット平滑筋, 12PDL); HF, TIG-7 (ヒト胎児胚繊維芽細胞); HPAEC, P4-EC (ヒト肺動脈血管内皮細胞, 5PDL)。斜線の棒グラフはヘビ毒のみ、白棒グラフはヘビ毒と $1\mu\text{g}/\text{ml}$ シクロヘキシミド。アスタリスクは3%以下の値を示す。データは3つの独立した実験の平均。

### 図13 生存因子と致死因子

神経, 血球, 血管内皮について, プログラム細胞死誘導に関する生存因子と致死因子を比較した。それぞれ生体において重要な役割を担っている。

#### 図 1 4 ヘビ毒による出血機構

血管内の様子を模式的に描いた。出血を起こすためには、血管内皮層と基底膜層を破り、止血機構である血小板と血漿による凝固を止める必要がある。ヘビ毒中の毒素は分業してそれぞれ特異的な標的に作用すると考えられる。

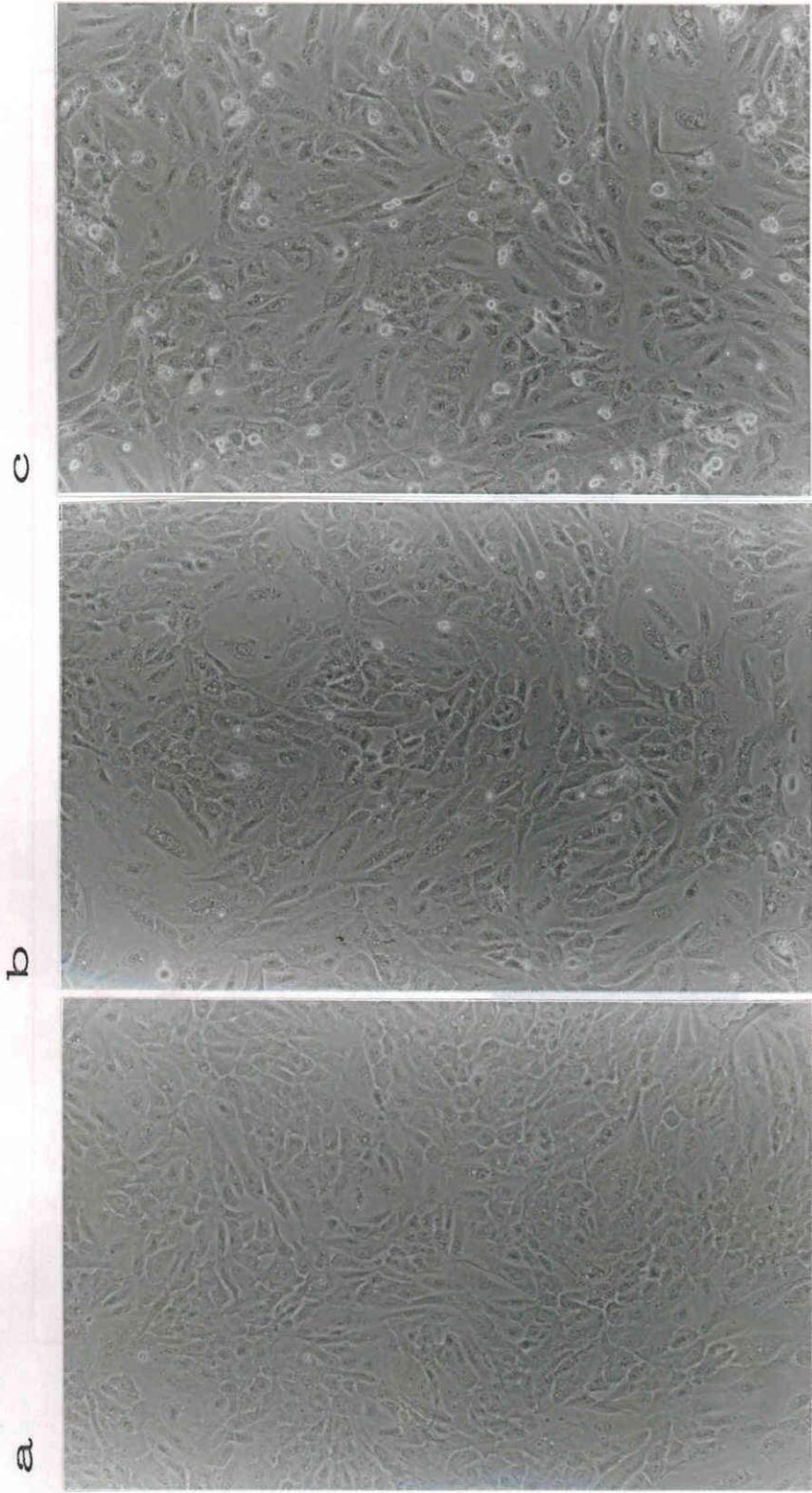
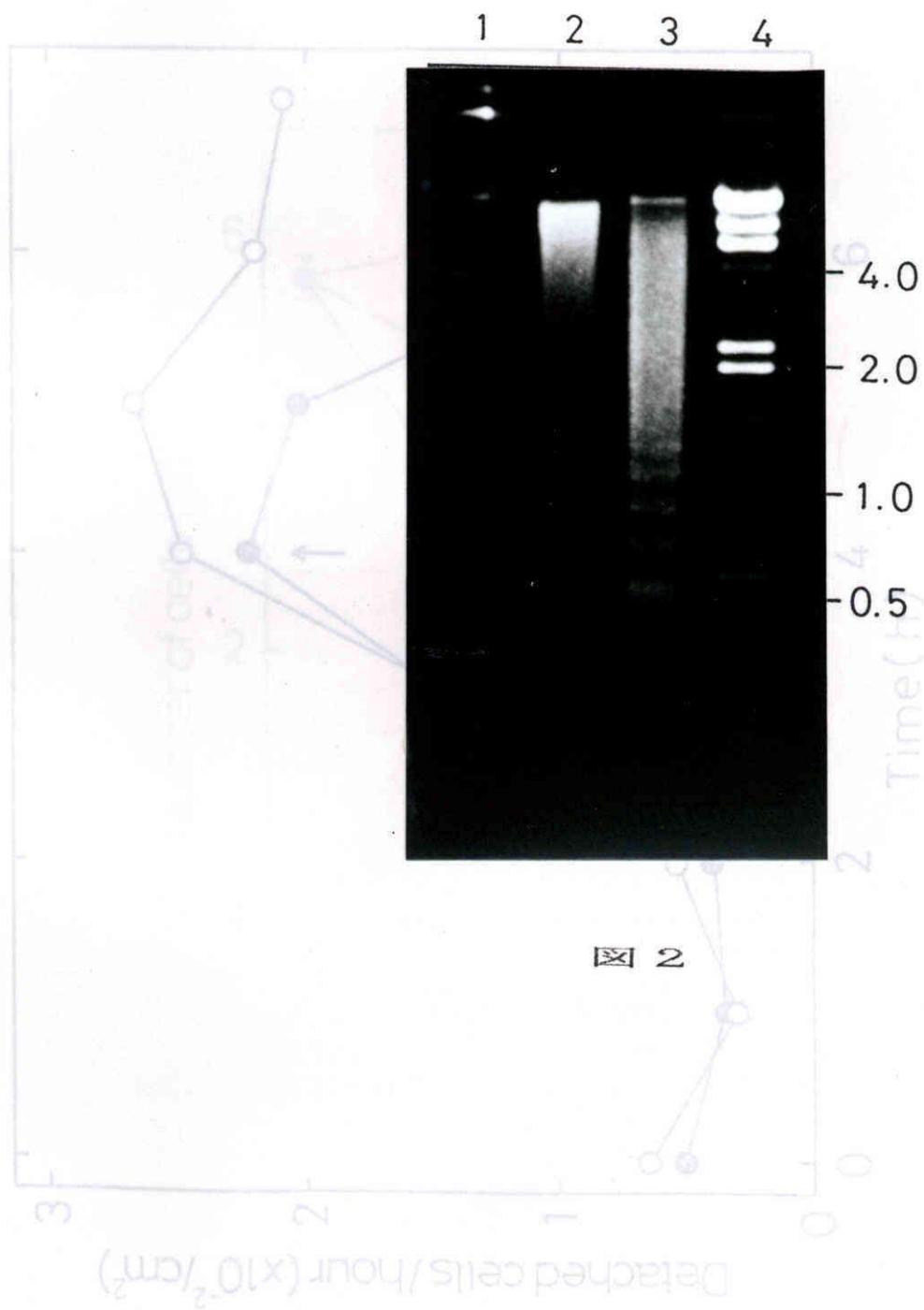


图 1



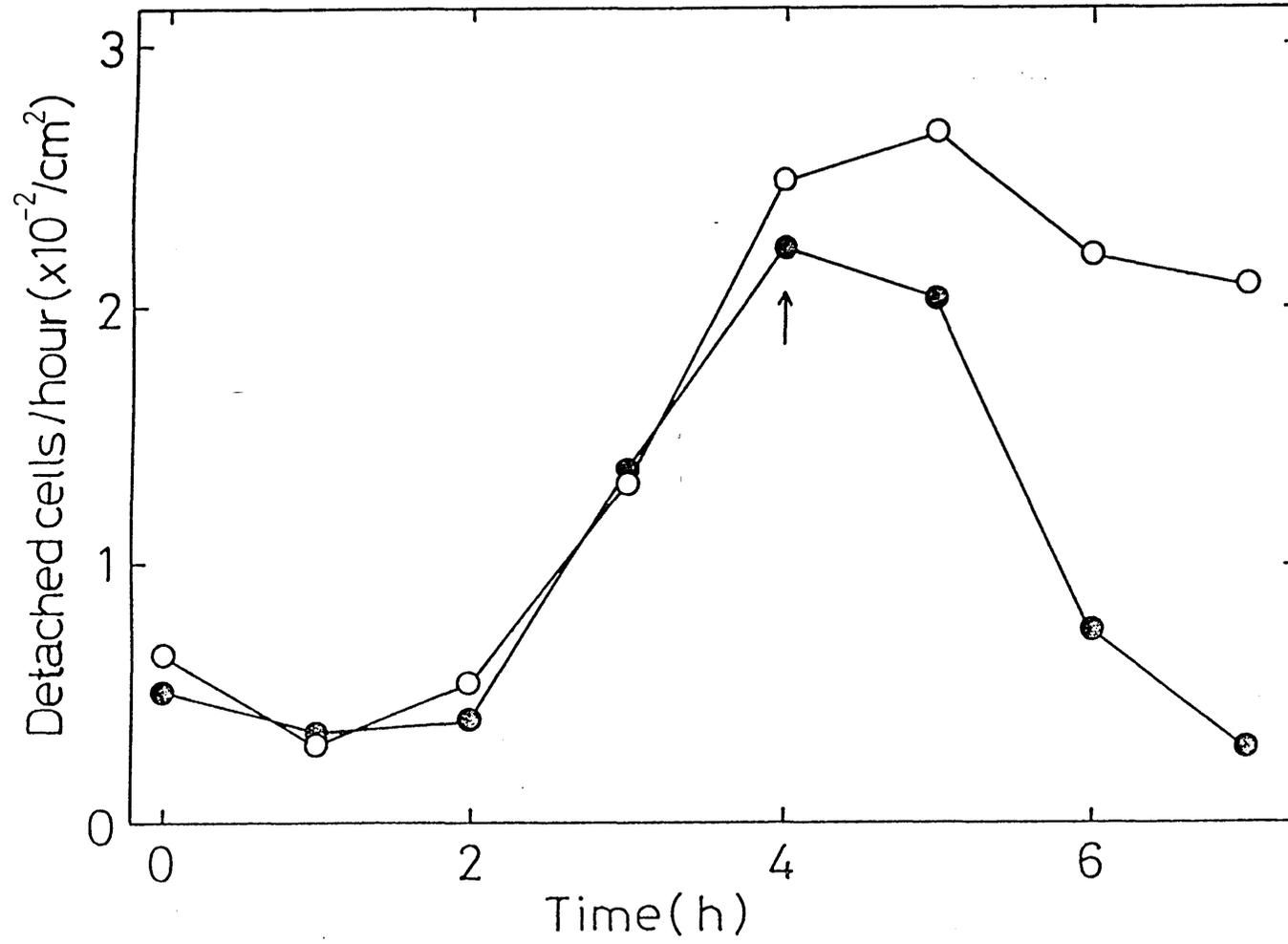


图 3

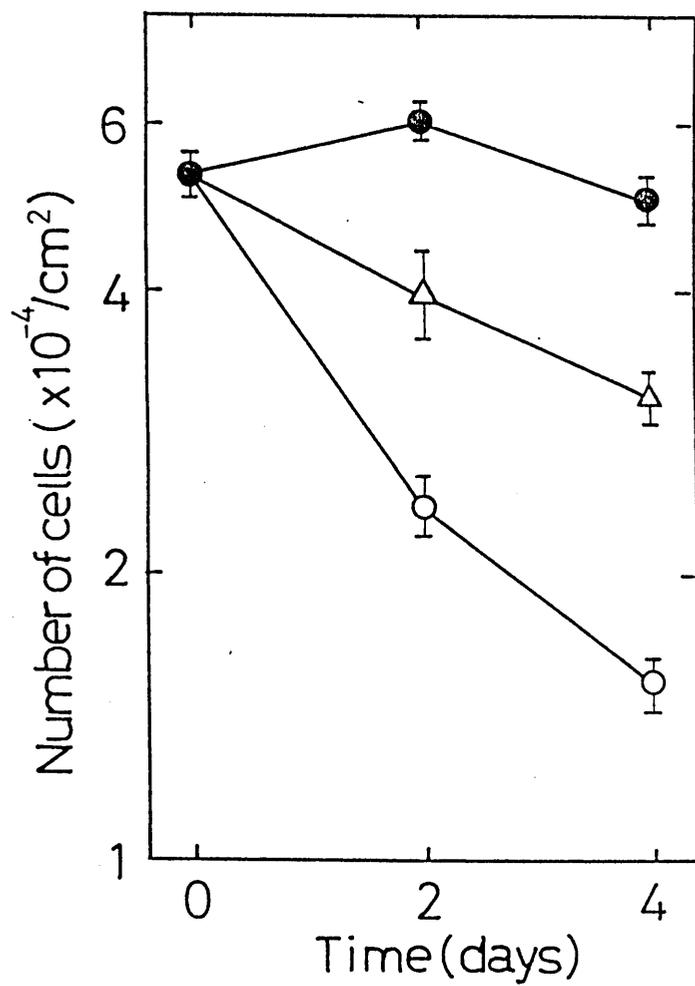
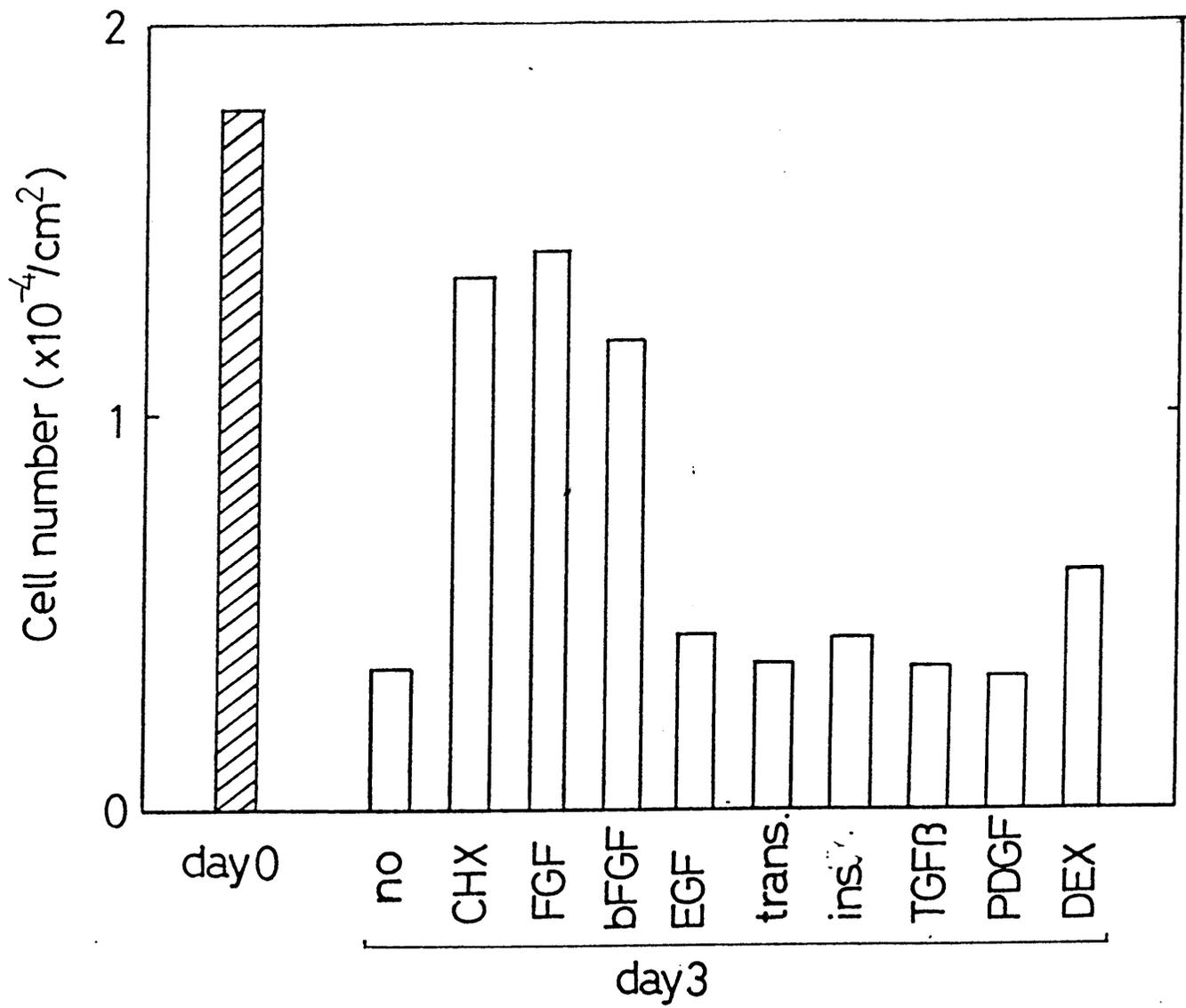
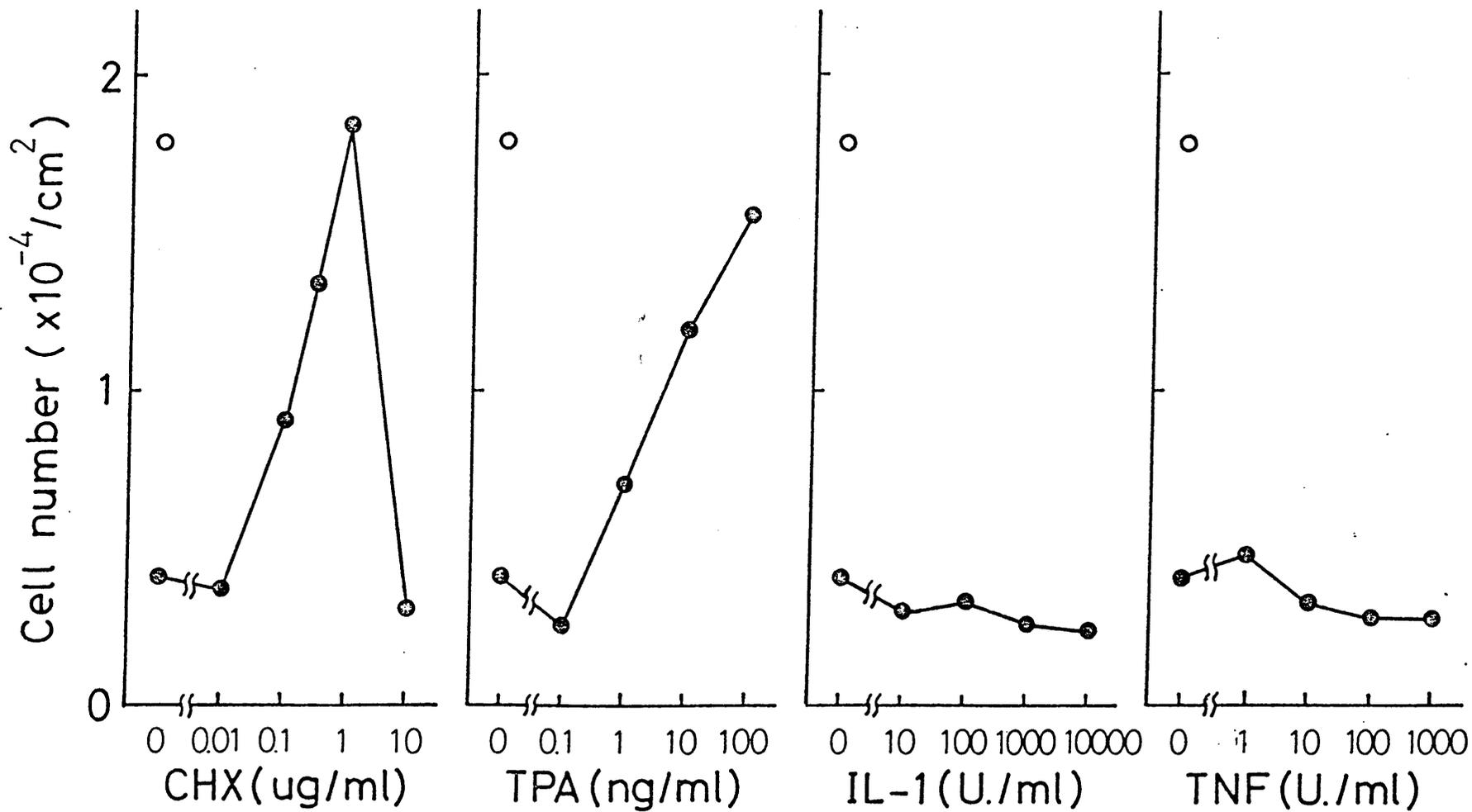


图 4



□ 01



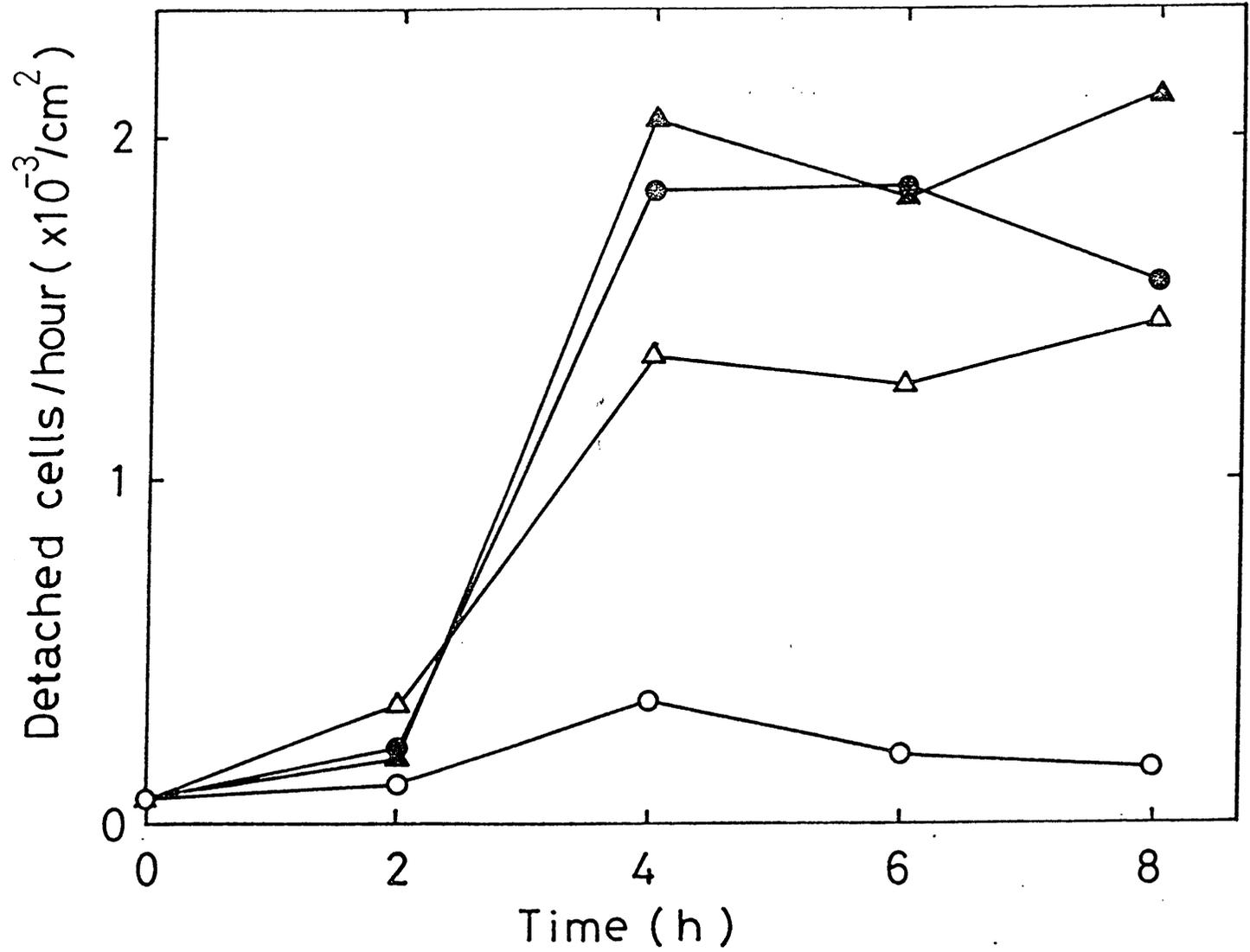
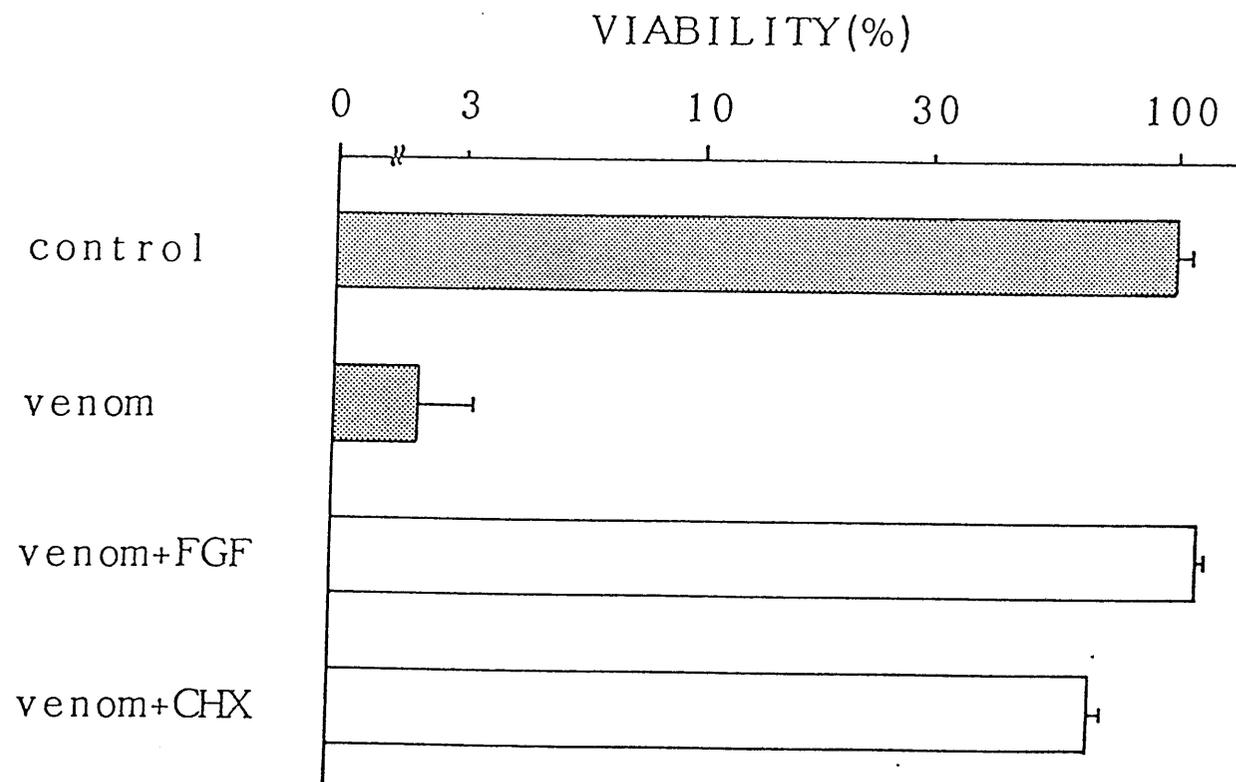
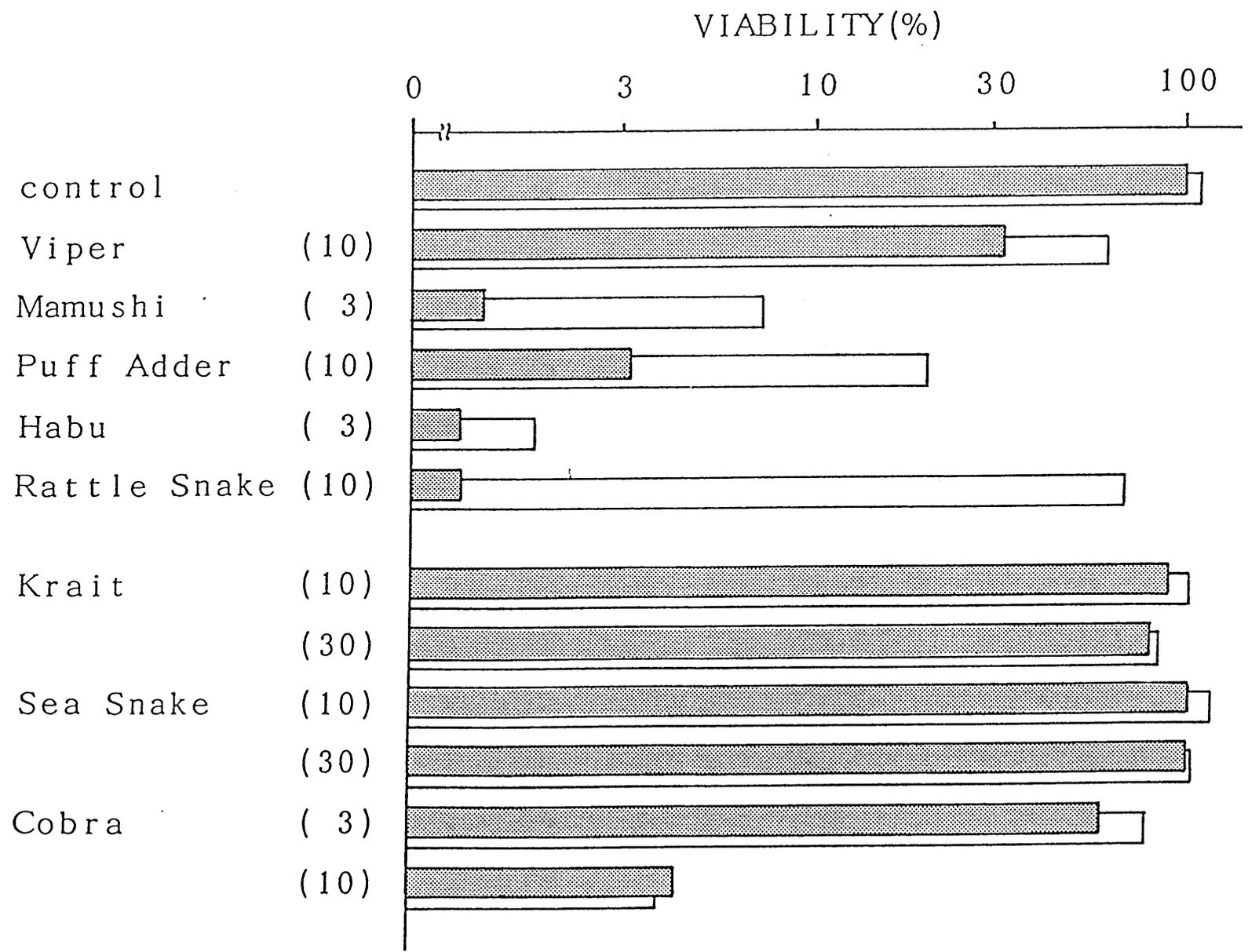


图 7





1 2 3

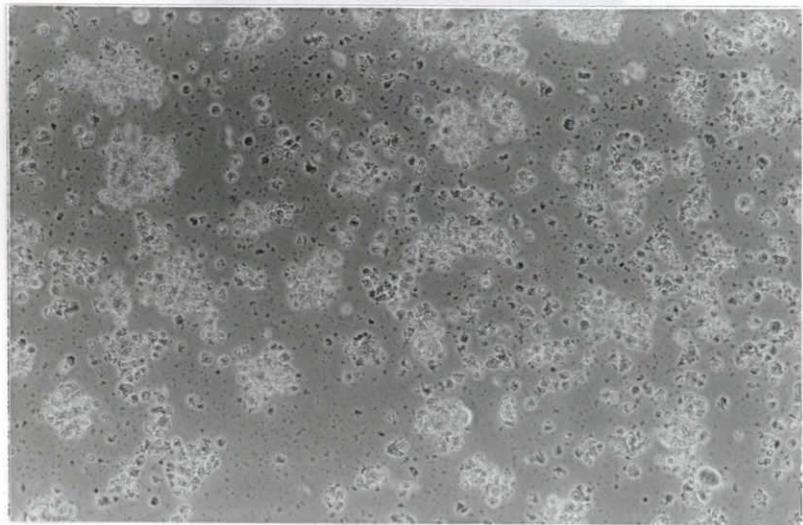
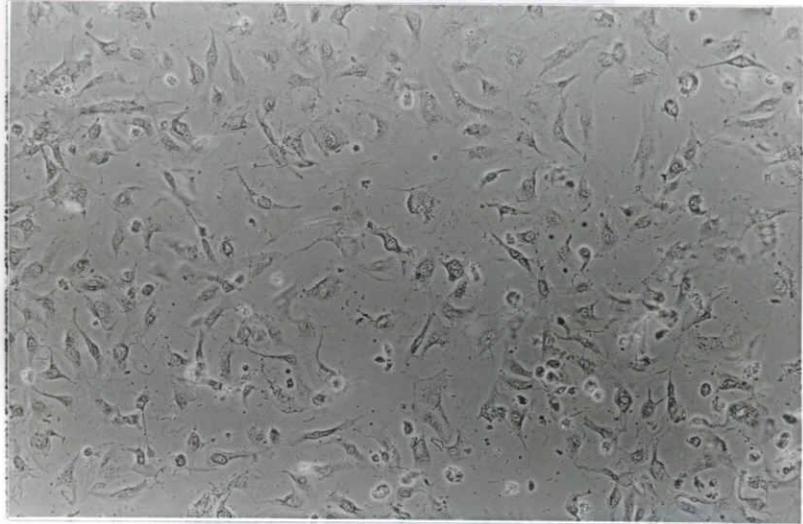


图 10

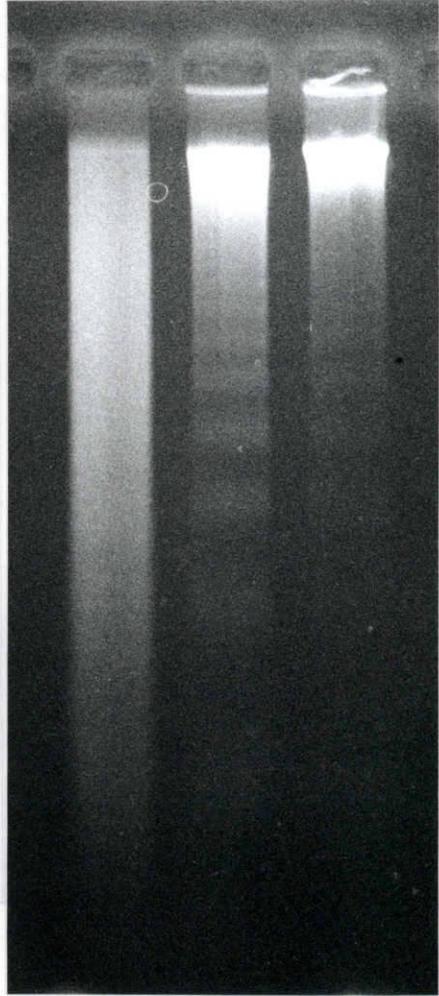


图 1 HF

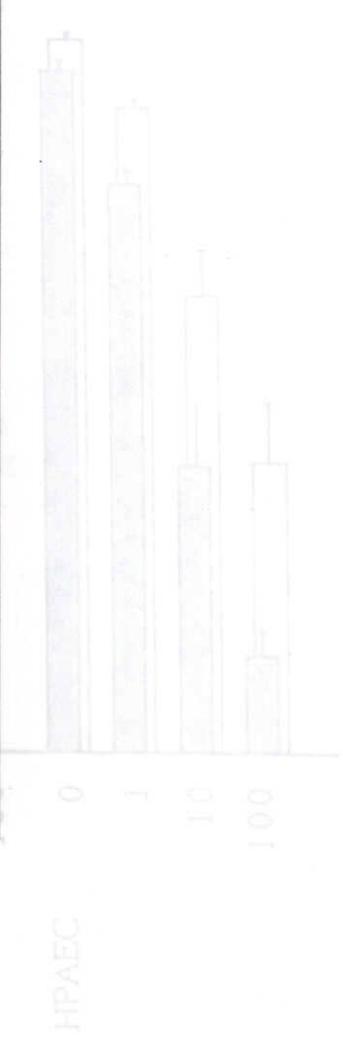


图 1.2

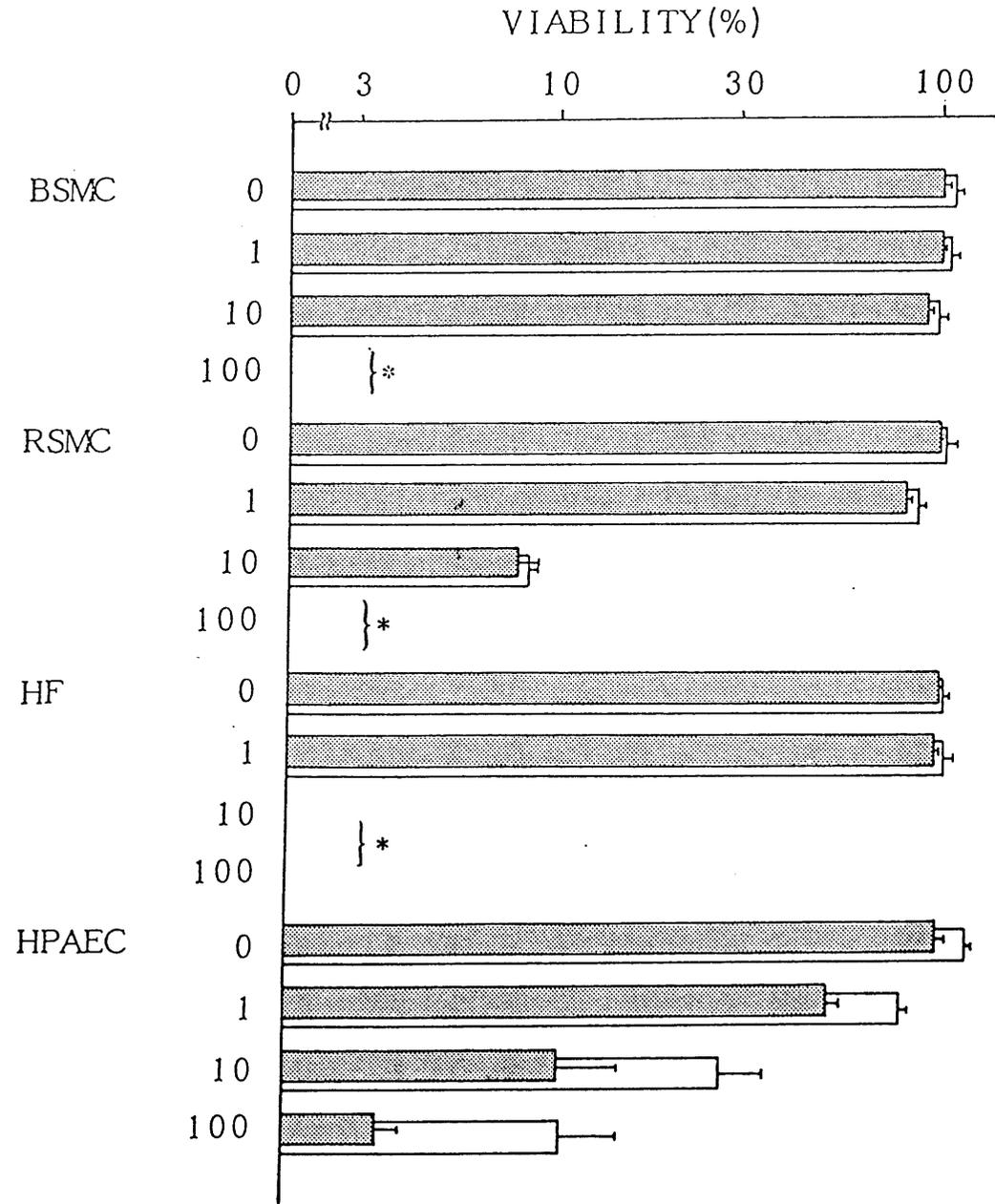


图 1 2

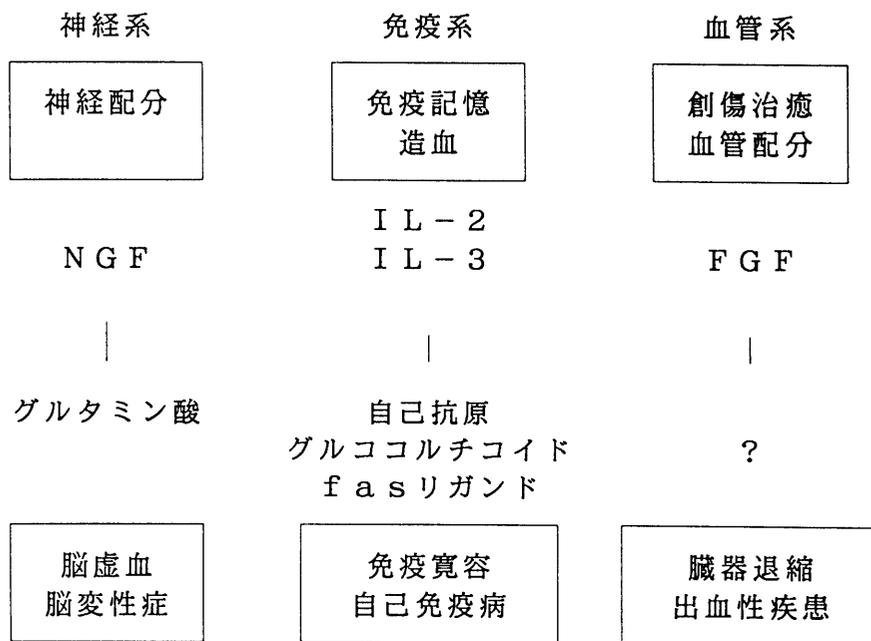


図 1 3

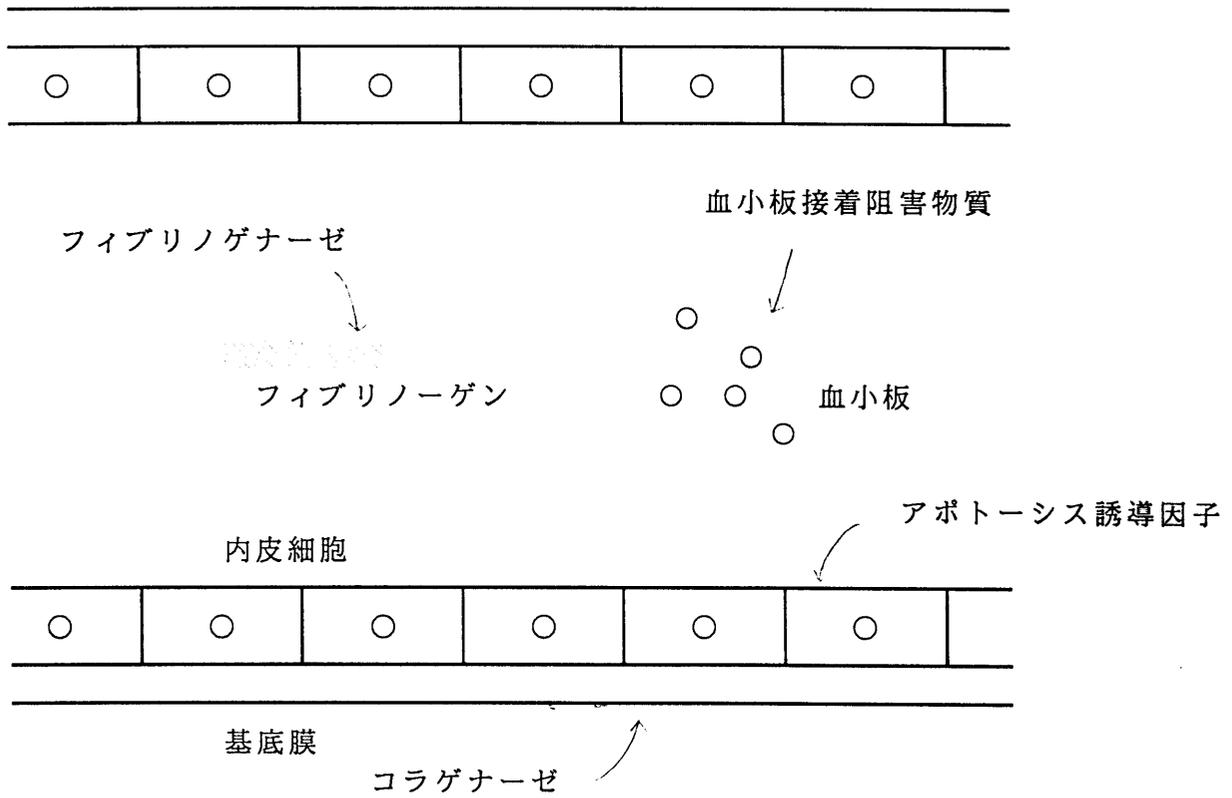


図 1 4