

Studies on the Collagen Production and Cell Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8096

動脈平滑筋細胞の増殖とコラーゲン産生に関する研究

金沢大学医学部病理学第一講座 (主任: 中西功夫教授)

松 井 裕

(平成1年2月3日受付)

本研究において著者はまずヒト大動脈硬化症の進展に伴う内膜肥厚性病変の型別コラーゲン (I, III, IV, V 及びVI型) 分布の変化を免疫組織学的に観察した。続いて、家兎大動脈より採取・培養した継代第2代の平滑筋細胞を用いて、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor), インターロイキン1 (interleukin-1) 及びトランスフォーミング成長因子 β (transforming growth factor-beta) のもとで細胞が増殖する際のコラーゲン合成能について検討した。初期病変の脂肪斑及びびまん性線維性肥厚 (8症例) では、I, III, IV, VI型コラーゲンがいずれもびまん性に分布していた。このうちIV型コラーゲンは紡錘形の内膜平滑筋細胞に沿って陽性であった。V型コラーゲンは内膜平滑筋細胞に認められることがあった。進行性病変のうち粥腫形成を伴わない線維性硬化巣 (2症例) では、びまん性線維性肥厚における型別コラーゲン分布と同様であったが、複合型病変と粥腫形成を伴う線維性キャップ (4症例) では、I, III, IV, VI型コラーゲンの分布が不均等で、V型コラーゲンが不規則に線維束間や平滑筋細胞周囲に認められる特徴があった。培養2日目 (対数増殖期) 及び4日目 (サブコンフルエント期) に PDGF 0.5単位/ml, 5単位/ml; IL-1 0.1単位/ml, 1単位/ml; TGF β 10pM, 100pM をそれぞれ添加して、ウシ胎児血清 (fetal bovine serum) のみの対照群と比較すると、細胞増殖は PDGF 及び IL-1 によって促進され、TGF β によって抑制された。³H-プロリンを投与してコラーゲン性蛋白合成能ならびに合成されたコラーゲン性蛋白の型分析を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (フルオログラフィー) で行なったところ、各群とも培養細胞が合成するコラーゲンの約90%はI型とIII型コラーゲンで占められていた。実験群のうち PDGF 群では、細胞あたりの総コラーゲン合成量は低下し、V型コラーゲンが相対的に増加傾向を示した。しかし、全蛋白合成量に対するコラーゲン合成量の比率はむしろ軽度増加した。TGF β 刺激の対数増殖期の細胞群では著しい総コラーゲン合成量増加とIV型コラーゲンの相対的増加を示した。しかし、コラーゲン合成量増加の比率には対照群と差異はなく、また、サブコンフルエント期の細胞は TGF β の影響をうけることが少なかった。IL-1 はコラーゲン合成に有意な影響を与えなかった。以上の結果から、動脈平滑筋細胞はその増殖期と密接に関連してI型、III型コラーゲンのみならず、IV型、V型コラーゲンを産生し、沈着して内膜の線維性肥厚をもたらすものと推測された。

Key words smooth muscle cells, collagen, arteriosclerosis, culture, cell proliferation

動脈硬化症では初期の脂肪斑から線維性硬化巣への進行に伴い、内膜肥厚斑内に多量の細胞外マトリックスが沈着することはよく知られている^{1,2)}。この肥厚性

病巣内に沈着する細胞外マトリックスはコラーゲン、エラスチン、グリコサミノグリカンおよびフィブロネクチンやラミニン^{3,4)}等の糖タンパクから構成されてお

Abbreviations: ABC, avidin-biotin peroxidase complex; CP, collagenous protein; CPM, count per minute; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; DTT, dithiothreitol; ECGF, endothelial cell growth factor; EDTA, ethylene diamine tetraacetate; EGF, epidermal growth factor; EVG, elastica van Gieson; FBS, fetal bovine serum; FGF,

り、これらの大部分は中膜より遊走してきた平滑筋細胞が産生し、一部は内皮細胞が産生すると考えられている⁹⁾。硬化病巣におけるこれらの細胞外マトリックスのうち、量的にも質的にも最も主要な構成成分は、コラーゲンであることはいうまでもない。現在までにコラーゲンには少なくともI型からXII型までの異なる12種の分子種が存在することが知られており⁹⁾、動脈にはI型、III型、IV型、V型、VI型、VIII型が存在する⁹⁾。動脈硬化巣では総コラーゲン量が増加するだけでなく、含まれる型別コラーゲンの比率も変化することが指摘されている²⁷⁾。それらによると、動脈硬化巣では中膜に比しI型コラーゲンが増加する、また、IV型⁹⁾、V型⁹⁻¹⁰⁾、VI型⁹⁾コラーゲンが増加することも報告されている。従って内膜硬化巣の型別コラーゲンの分布は、病変の進展に伴って特徴的な変化を示すものと思われる。

一方、動脈硬化症の病理発生を理解するうえで現在最も重要視されているのが細胞成長因子である。Rossの「傷害反応説」¹¹⁾¹²⁾によると動脈硬化症の発症、進展は、内皮細胞傷害に引き続いて起こる中膜平滑筋細胞の内膜への遊走と内膜内増殖によるものであり、この平滑筋細胞の遊走と増殖という現象に深くかかわっているが、局所で分泌される成長因子である。成長因子は血小板由来のものとして、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor)、上皮成長因子 (epidermal growth factor)、トランスフォーミング成長因子 β (transforming growth factor-beta)、血管内皮成長因子 (endothelial cell growth factor)、マクロファージ由来のものとしてマクロファージ由来成長因子 (macrophage-derived growth factor)、線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor)、インターロイキン-1 (interleukin-1)、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis

Table 1. Examined autopsy cases with various intimal lesions of abdominal aorta

Case No.	Autopsy No.	Age/Sex	Intimal lesions	Major autopsy findings
1	10233	1Mo/F	Mild intimal thickening	Heart anomaly
2	10217	5Mo/M	Mild intimal thickening	Omenn's disease
3	9306	3Y/F	Mild intimal thickening	Malignant lymphoma
4	9812	7Y/M	Diffuse intimal thickening	Rhabdomyosarcoma
5	10211	55Y/M	Diffuse intimal thickening	Malignant lymphoma
6	10212	57Y/F	Fibrous plaque Diffuse intimal thickening	Glioblastoma
7	9362	18Y/F	Fatty streak	Ewing's tumor
8	10215	56Y/F	Atheromatous plaque	AML
9	8208	60Y/M	Atheromatous plaque Fatty streak	Rupture of aneurysm
10	9788	84Y/M	Atheromatous plaque	Bladder carcinoma
11	10216	76Y/M	Atheromatous plaque Complicated lesions with calcification and ulcer Fibrous plaque	Pulmonary fibrosis

Abbreviations; Mo, months; Y, years; F, female; M, male; AML, acute myelogenous leukemia

fibroblast growth factor; HE, hematoxylin-eosin; IL-1, interleukin-1; MDGF, macrophage-derived growth factor; NCP, non-collagenous protein; PAS, periodic acid Schiff; PBS, phosphate buffered saline; PDGF, platelet-derived growth factor; SDS,

factor), PDGF, TGF β , 血管内皮細胞由来のものでは PDGF, FGF, IL-1, 平滑筋細胞由来のものとして PDGF が知られている¹⁹⁻²⁰。これらの成長因子は細胞の増殖を制御するだけでなく、細胞外マトリックスの代謝にも大きく貢献することが知られている。たとえば PDGF は動脈平滑筋細胞のコラーゲン合成活性を上昇させ¹⁹, IL-1 は滑膜細胞のコラゲナーゼ産性を高め²⁰, TGF β はプロテアーゼインヒビター産性亢進²⁰を通じ、細胞外マトリックスを制御している。従って、動脈硬化症における内膜肥厚性病変は、動脈平滑筋細胞がさまざまな成長因子の影響のもとで増殖し、コラーゲンを産性、沈着することによって形成されたものと言えよう。今回、著者は動脈平滑筋細胞の増殖とコラーゲン産性の相互関係を明らかにする目的で、まず、ヒト大動脈硬化症の進展に伴う内膜肥厚性病変の型別コラーゲン (I, III, IV, V, VI型) 分布の変化を観察した。続いて、培養平滑筋細胞を用いて、PDGF, IL-1, 及び TGF β という代表的な成長因子が、どのように平滑筋細胞コラーゲン合成活性に影響を与えているのかについて検討したのでここに報告する。

材料および方法

I. ヒト動脈内膜肥厚性病変における型別コラーゲン (I, III, IV, V 及び VI型) の分布

1. 対象

金沢大学第一病理学教室の病理解剖症例のうち表 1 に示すような 11 症例の腹部大動脈を研究対象とした。得られた腹部大動脈から動脈硬化症の初期病変として内膜びまん性線維性肥厚病変 (小児, 成人) 及び脂肪斑, 進行性病変として線維性硬化巣 (粥腫を伴うもの, 伴わないもの) 及び複合型病変 (石灰沈着, 潰瘍, 粥腫を伴う) をそれぞれ含む組織片を採取, 使用した。

2. 光顕的及び免疫組織化学的検索

組織片を 10% 中性緩衝ホルマリンにて固定後, 型通りパラフィンに包埋し薄切切片を作製した。通常の光顕的観察にはヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin-eosin), アルシアン青 (pH2.5), 過ヨウ素酸シッフ (periodic acid Schiff), 鍍銀, アザン, エラスチカ・ワンギーソン (elastica van Gieson) 染色を行なった。

コラーゲンの免疫組織化学的検索はパラフィン切片を 0.05% プロテアーゼ type XXIV (Sigma, U.S.A.) で 30 分処理後, avidin-biotin peroxidase complex

(ABC) 法²¹にて行なった。抗体は教室で作製した型特異的抗ヒトコラーゲン抗体^{22,23} (I 型, III 型, IV 型, V 型, VI 型) を用いた。抗 I 型, III 型, IV 型コラーゲン抗体は 10 倍に, 抗 V 型コラーゲン抗体は 5 倍に, 抗 VI 型コラーゲン抗体は 100 倍に, それぞれ希釈して使用した。切片はメチル緑またはヘマトキシリンで核染色した。なお, 対照として, 抗コラーゲン抗体のかわりに, 正常ラット IgG または正常ウサギ IgG を反応させた。

II. 培養動脈平滑筋細胞のコラーゲン合成能に対する成長因子の影響

1. 実験動物

日本白色種ウサギ (2.5kg, 雄) を用いた。ウサギは全期間を通じて普通固形飼料と水を自由に摂取させた。

2. 細胞培養

動脈平滑筋細胞は Ross の方法²⁴に従って得た。ウサギの胸部大動脈の内膜および外膜と中膜外層を注意深く除去した後, 大動脈内膜内層を採取し, 1mm 立方以下の大きさに細切し, これらをエクスプラント (explant) とした。このエクスプラントを 25cm² 培養フラスコ (Corning, U.S.A.) に散布し, 37°C, 5% CO₂, 95% 空気の下で培養した。培地として 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum) (Gibco, U.S.A.), カナマイシン (100 μ g/ml), ファンギゾン (5 μ g/ml) を加えたダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium) を用い 4 日毎に培地を新鮮なものに交換した。エクスプラントより細胞が遊出増殖し, 細胞密度がコンフルエント (confluent) に達した時に, 2% エチレンジアミン四酢酸 (ethylene diamine tetraacetate) - 0.25% トリプシンを用いて細胞を継代しさらに培養した。実験には, 2 代継代細胞を用いた。

3. 細胞増殖能の解析

細胞を 10% FBS 添加培地 (Dulbecco's modified Eagle medium) 2ml 加えた 35mm 径プラスチックシャーレに 1 \times 10⁵ 個接種した。成長因子暴露 24 時間後に, それぞれ細胞数の計測と ³H-チミジン (Amersham, U.S.A.) の取り込みを測定し, 成長因子の細胞増殖に及ぼす影響を検討した。細胞数は各々 2 枚のシャーレの細胞を EDTA-トリプシン処理後, 血球計算板を用いて測定した。なお, 細胞数は各シャーレに

sodium dodecyl sulfate; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TCA, trichloroacetate; TGF β , transforming growth factor-beta; TNF, tumor necrosis factor

ついて4回ずつ数え平均した。³H-チミジンの取り込みは10 μ Ci/mlの³H-チミジンで37°C 1時間、細胞を標識する短時間標識を用いた。標識後、直ちに³H-チミジンを含む培養液を除き、冷リン酸緩衝生食液(phosphate-buffered saline)で細胞を洗浄し、1%ドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulfate)で室温、15分細胞を処理した。細胞をSDS溶液と共に回収し、10%トリクロロ酢酸(trichloroacetate)でDNAを含む蛋白画分をメンブラン・フィルターG-25(Whatman, U.S.A.)に吸着させた後、フィルターに液体シンチレーター ACS-II (Amersham)を重層、ベックマン LS-9000 カウンター (Beckman, West Germany)で放射活性を測定した。測定は各々2枚のシャーレの細胞について行ない平均値と標準偏差を算出した。

培養2日目と4日目に10% FBS 添加培地 1ml にそれぞれ成長因子を加えた新鮮培地と交換し、さらに24時間培養した。成長因子は以下の3種類を用い、いずれも2種の異なる濃度について検討した。すなわち PDGF (Collaborative Reserarch, U.S.A.) については5単位/mlと0.5単位/ml、ヒト IL-1 (Genzyme, U.S.A.) については1単位/mlと0.1単位/ml、TGF β (R & D System, U.S.A.) については、100pMと10pMの濃度で培地に添加した。

4. コラーゲン合成能の解析

成長因子(PDGF, IL-1, TGF β)投与と同時に、50 μ Ci/mlのL-[2, 3-³H]プロリン(Amersham), 0.1mMのアスコルビン酸ナトリウム及び0.5mMのベータ・アミノプロピオニトリルフマル酸を培養液に加えた。24時間標識後、培地と共に細胞を回収し超音波処理し、一部は定量分析、残りを型別分析用の試料とした。

1) コラーゲンの定量分析

試料を5分間煮沸し、種々の酵素を不活性化した。分析はPeterkofskyら²⁰⁾のコラゲナーゼ消化法を用いた。試料は、0.05M酢酸に対して十分な透析を行なった後、凍結乾燥した。凍結乾燥した試料を0.04N水酸化ナトリウム水溶液に再溶解させ、次いでトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で中和した後、コラゲナーゼ(*Clostridium histolyticum* collagenase, Form III) (Advance Biofacture, U.S.A.)で37°C、2時間消化を行なった。消化後試料に10% TCAと0.5%タンニン酸を加え、1000xgで5分間の遠心により沈殿した高分子量画分(非コラーゲン性蛋白)(non-collagenous protein)を上清中の低分子量画分(コラーゲン性蛋白)(collagenous protein)と分離した。各々の画分を液体

シンチレーター ACS-II (Amersham)に溶解し、ベックマン LS-9000 カウンター (Beckman)で放射活性を測定した。

次いで、細胞1個あたりのNCPとCPの放射活性を算出した後、総蛋白合成活性の比をPeterkofskyら²⁰⁾の式

$$\frac{CP}{CP+5.4 \times NCP} \times 100(\%)$$

にて算出した。測定は各々2枚ずつのシャーレに対して行ない平均値と標準偏差を算出した。

2) コラーゲンの定性分析

試料に中性プロテアーゼインヒビター(0.25M EDTA2Na, 10mM フェニルメタンスルフォニルフルオリド, 0.1M N エチルマイレイミド)を加えた後、コラーゲンの型別分析を行なった。

分析はHataら²¹⁾が行なった方法を用いた。分析用試料に硫酸アンモニウム(176mg/ml)を加えて硫酸沈殿画分を得た。この画分を0.5M酢酸に再び溶解させ最終濃度100 μ g/mlのペプシン(Behringer Mannheim GmbH, West Germany)で4°C 6時間消化した。試料全容量の1/10量の2Mトリス塩酸緩衝液を加えたのち、5N水酸化ナトリウム溶液でペプシンを不活性化し、凍結乾燥して電気泳動用試料とした。

電気泳動はWeber, Osborn²²⁾のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)を用いた。アクリルアミドの濃度は濃縮用ゲルは3%(pH6.8)、分離用ゲルは5%(pH8.8)に調節した。

泳動終了後、スラブ・ゲルを1.1Mサリチル酸ナトリウムに1時間浸した後乾燥し、フルオログラフィー²³⁾を行なった。X線フィルム XAR-5 (Eastman Kodak, U.S.A.)を-80°C、5日ないし10日、乾燥ゲルに露光した後、現像した。感光したフィルム上の各コラーゲンに相当するバンドの濃度をデンシトメーター PDS15 (サクラ, 東京)を用いて、500nmの波長の吸光度を測定し、記録紙に記録した。I型コラーゲンは $\alpha_1(I)$ 及び $\alpha_2(I)$ のバンドを、III型コラーゲンは還元前の γ 位置の $\alpha(III)$ を、IV型コラーゲンは還元前のバンドを、また、V型コラーゲンについては $\alpha(V)$ のバンドを代表してV型コラーゲンバンドとして計測した。各バンドに相当する吸光波形を記録紙から切り抜き、各型別の重量を測定することにより、各型別コラーゲンの割合を算出した。

III. 統計学的検定法

得られた成績はすべて平均値土標準偏差で示した。

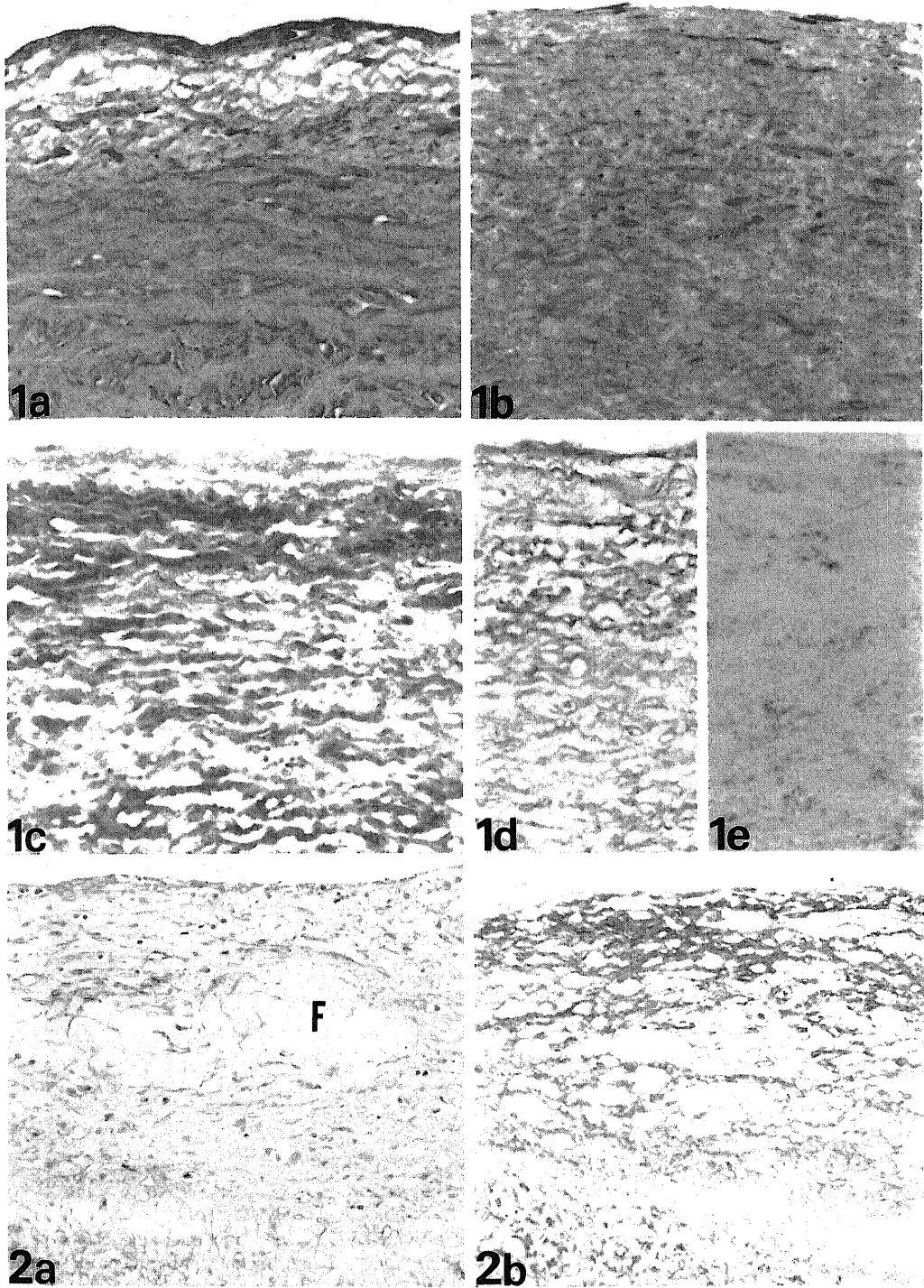


Fig. 1a. Mild intimal thickening of the aorta in Case 3. Alcian blue stain. $\times 150$.
 Figs. 1b-e. Diffuse intimal thickening of the aorta in Case 5, demonstrated with azan stain (b),
 immunostained for type I collagen (c), type IV collagen (d) and type VI collagen (e). $\times 150$.
 Fig. 2. Fatty streak of the aorta in Case 7, presented with PAS stain (a), and reacted with anti-type
 IV collagen antibody (b). Accumulation of foam cells (F) is found in the fibrosing intima. $\times 75$.

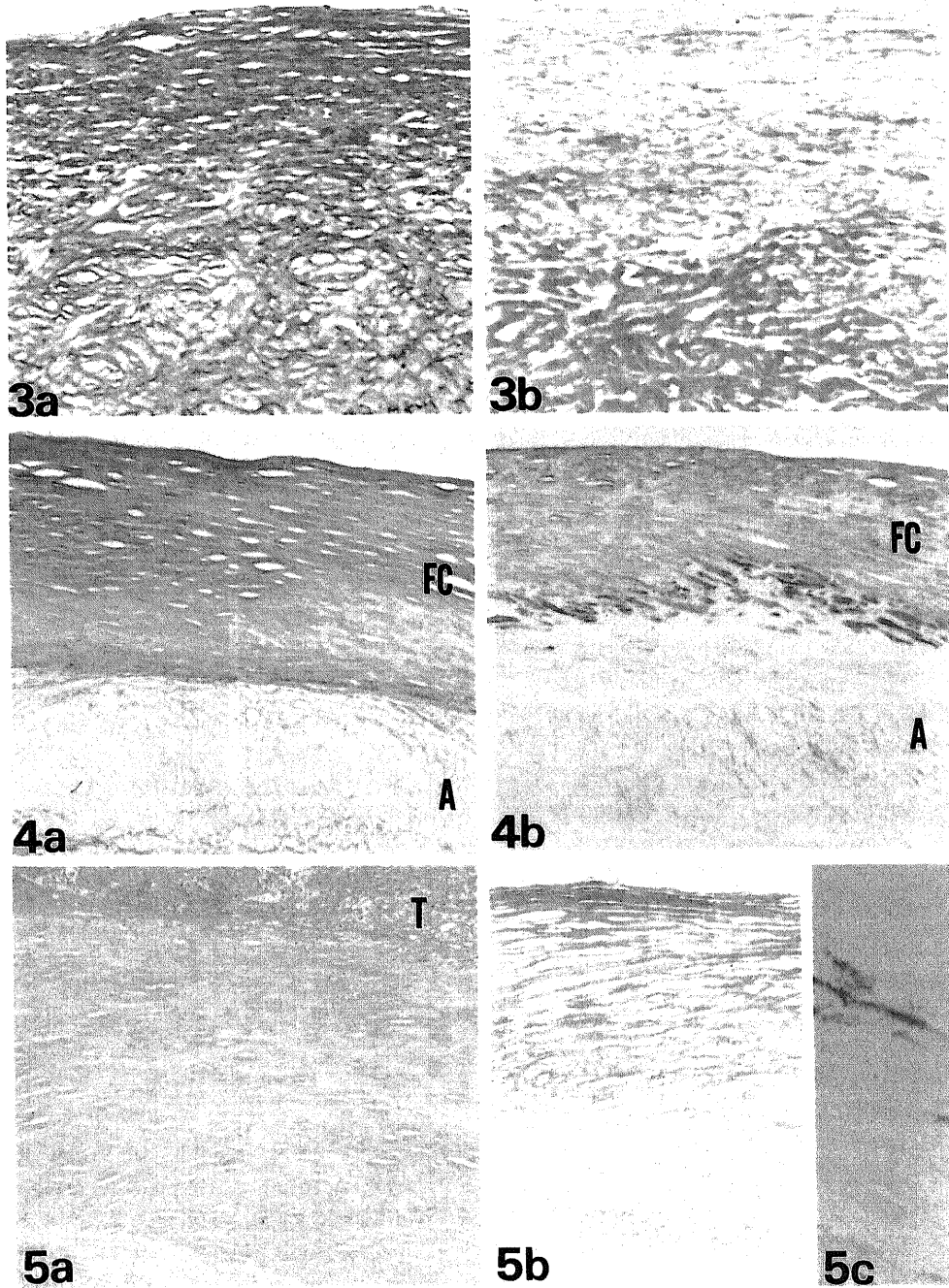


Fig. 3. Fibrous plaque of the aorta in Case 11, stained with EVG (a) and immunostained for type III collagen (b). The intima is replaced by fibroelastic tissue. Note irregular alignment of elastic fibers in the deep layer which reacts strongly with anti-type III collagen antibody. $\times 75$.

Fig. 4. Fibrous cap (FC) overlying atheroma (A) of the aorta in Case 11 with EVG stain (a) and immunostain for type IV collagen (b). $\times 30$.

Fig. 5. Fibrous component of the complicated intimal lesion in Case 10, demonstrated with HE stain (a), immunostain for type III collagen (b) and type V collagen (c). T indicates luminal thrombus. a and b, $\times 30$. c, $\times 150$.

多群間の平均値の差の確定には、1元配置分散分析後 Scheffé の多重比較を用いた。p<0.05を有意とした。

成 績

I. ヒト動脈内膜肥厚性病変における型別コラーゲン (I, III, IV, V及びVI型) の分布

1. 軽度の内膜肥厚性病変

小児の大動脈内膜にみられるきわめて軽度の肥厚部位には、疎に配列する小数の紡錘形あるいは類円形の細胞とアルシアン青陽性物質がみられた (図1a)。細胞間にはエラスチカ・ワンギーソン染色で同定できる弾性線維及びアザン染色で陽性を示すコラーゲン線維が少量混在していた。

抗コラーゲン抗体を用いた型別コラーゲンの局在及びその分布については、I型コラーゲンは網状の分布を示したがIII型コラーゲンはI型コラーゲンに比べて繊細に染色された。IV型コラーゲンは主に内皮細胞の基底膜領域に染色された。VI型コラーゲンはI型及びIII型コラーゲンとほぼ同様の分布を示したが、I型及びIII型コラーゲンに比べて弱い染色性を示した。V型コラーゲンはこの時期の内膜には陽性ではなかった。

2. びまん性線維性肥厚

成人のびまん性に肥厚した内膜には紡錘形の細胞が横走り、その数も多く、また細胞間にはアルシアン青

陽性物質は少なく、むしろ弾性線維とコラーゲン線維が豊富であった (図1b)。PAS 陽性物質は比較的多く、特に内膜に増殖した細胞の周囲に認められた。

型別コラーゲンの局在をみると、肥厚した内膜の間質にはI型及びIII型コラーゲンがびまん性に分布し、小児の病変部に比べてより強い染色性を示した (図1c)。IV型コラーゲンは細胞周囲に局在していた (図1d)。V型コラーゲンは内膜内の紡錘形細胞内にみられることがあった。VI型コラーゲンは内膜の間質にびまん性の分布を示していたが、部位によって染色性に強弱がみられた (図1e)。

3. 脂肪斑

内膜には胞体内に空胞を有する大小の泡沫細胞が集積する脂肪斑の病巣がみられた。周辺部内膜には泡沫細胞に混在して胞体内空胞の乏しい紡錘形あるいは類円形の細胞が認められた。脂肪斑内部あるいは細胞が密に集積しているところでは少量の線維成分がみられるにすぎなかったが細胞が疎な部分には線維成分が多く沈着していた。アルシアン青陽性物質は少なかった。PAS 陽性物質は細胞周囲または泡沫細胞の集積巣の周辺部に認められた (図2a)。

I型コラーゲンとIII型コラーゲンは脂肪斑をとりまく線維性間質に軽度、びまん性に認められたが泡沫細胞が密在しているところでは繊細な網状分布を示した。IV型コラーゲンは細胞周囲に局在していたが泡沫

Table 2. Summary of tissue localization of collagen types I, III, IV, V and VI in various intimal lesions of aorta

	Immunoreactivity with type-specific anti-collagen antibody				
	I	III	IV	V	VI
Mild intimal thickening	±	±	+	-	±
Diffuse intimal thickening	++	++	++	±	+
Fatty streak	+	+	++	-	+
Fibrous plaque (free of atheroma)	++	++	++	+	+
Atheromatous plaque					
Fibrous cap	++	++	++	+	++
Atheroma	-~±	-~±	-~±	-	-~±
Complicated lesion					
Fibrous component	+++	+++	+++	+	+++
Atheroma	-~±	-~±	-~±	-	-~±

Symbols: -, negative, ±; variably and faintly positive, +; constantly but weakly positive, ++; constantly positive, +++; constantly and strongly positive

細胞には周囲にIV型コラーゲンが陰性のものも多数みられた(図2b). VI型コラーゲンもI型, III型コラーゲンと同様に間質に軽度びまん性に分布していた. V型コラーゲンは陰性であった.

4. 粥腫形成を伴わない線維性硬化巣

内膜の丘状の隆起性病変は主に線維性結合組織から構成されていた. 増殖している細胞は主に紡錘形細胞であるが類円形あるいは不整形の細胞も混在していた. また, 胞体内に空胞を有する細胞も散在性に認められた. 弾性繊維及びコラーゲン繊維は内膜に多量に沈着しており内膜深層では弾性繊維の断裂, 消失がみられた(図3a). PAS染色では大部分の細胞周囲にPAS陽性であった.

型別コラーゲンの局在をみるとI型及びIII型コラーゲンは肥厚した内膜にびまん性に認められた(図3b). IV型コラーゲンは細胞に沿って分布していた. この病

変ではV型コラーゲンは内膜深層の線維束に沿って線状に染め出された. VI型コラーゲンは内膜にほぼびまん性に分布していた.

5. 粥腫形成を伴う線維性硬化巣

粥腫のため丘状の隆起として内腔に向かって膨隆している病変で, 丘状隆起の表層は線維性結合組織(線維性キャップ)によって覆われていた. この線維性キャップは扁平化した紡錘形細胞, 泡沫細胞及びリンパ球様細胞と太い線維を主とする間質で, 弾性線維は乏しかった(図4a). 内膜深層に存在する粥腫巣は無構造物質と白く抜けた稜状, 針状のコレステリン結晶を示した. 暗紫色に染まる顆粒状物質(石灰沈着)も散見され, また, 粥腫の辺縁部には泡沫細胞が集んでいる傾向があった. PAS陽性物質は紡錘形細胞の周囲によく認められた.

線維性キャップにはI型, III型及びVI型コラーゲン

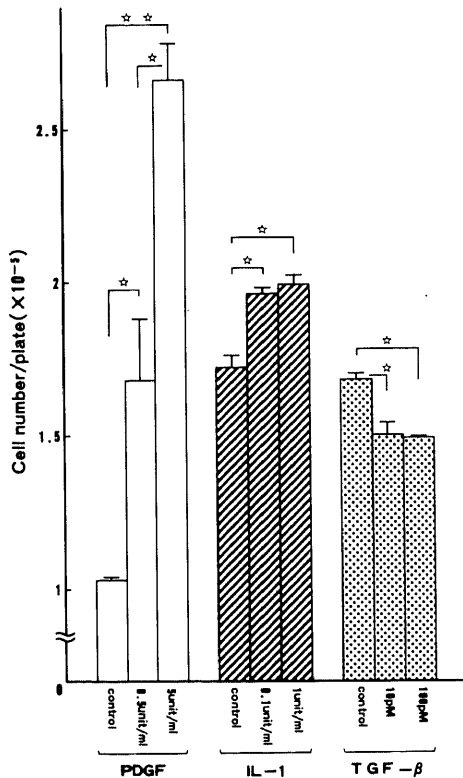


Fig. 6. Effect of growth factors (PDGF, IL-1, and TGF β) on cell growth of cultured smooth muscle cells at logarithmic proliferative phase for 24h (2nd to 3rd day). Bar shows standard deviation of duplicate determinations. $\star p < 0.05$, $\star\star p < 0.01$ by one-way ANOVA followed by Scheffé's multiple comparisons.

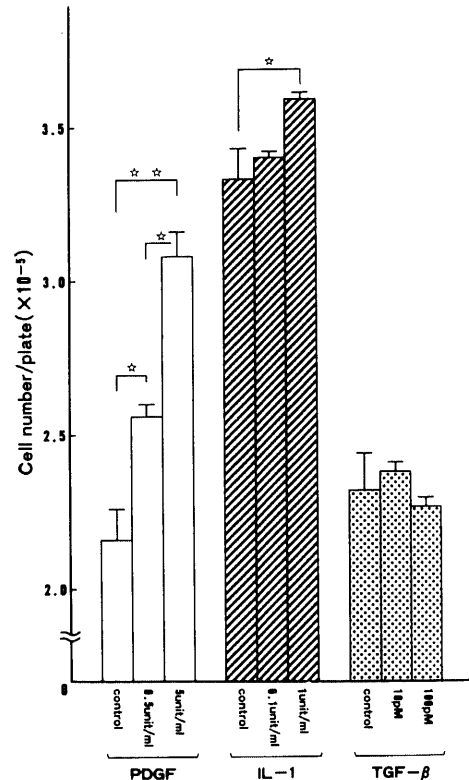


Fig. 7. Effect of growth factors (PDGF, IL-1, and TGF β) on cell growth of cultured smooth muscle cells at subconfluent phase for 24h (4th to 5th day). Bar shows standard deviation of duplicate determinations. $\star p < 0.05$, $\star\star p < 0.01$ by one-way ANOVA followed by Scheffé's multiple comparisons.

がびまん性に分布していたがその染色性は時には不均等、不規則な分布を示すことがあった。IV型コラーゲンは紡錘形細胞に沿って比較的明瞭に染色された(図4b)。V型コラーゲンは細胞周囲や細胞間に不規則に凝集していた。

粥腫における各型別コラーゲンの分布はI型、III型、V型、VI型コラーゲンが僅かに粥腫辺縁部に分布しているにすぎなかった。粥腫の中心部では反応陰性であった。

6. 複合型病変

粥腫内出血、潰瘍形成、石灰沈着、血栓形成等を伴った本病変では線維性結合組織内の細胞の減少、線維成分の増加がめだった。間質の硝子化も伴っていた(図5a)。I型、III型、V型、VI型コラーゲンは先にのべた粥腫を伴う線維性硬化巣の線維性キャップとほぼ同様の分布を示したが硝子化した部分ではI型、III型、V型コラーゲンが特に強く染色された(図5b,c)。また、IV型コラーゲンは線維束間の細胞周囲に認められた。コレステロールやカルシウムの沈着部位にはコラーゲン染色陰性であった。

表2は、以上の各種動脈硬化性内膜病変における型別コラーゲンの局在及びその分布をまとめたものである。

II. 培養動脈平滑筋細胞の増殖とコラーゲン合成能

に対する成長因子の影響

1. 細胞増殖動態(図6, 7)

1) PDGF

最も顕著な細胞増殖を示したのはPDGF投与群であった。PDGF投与実験のうち、特にPDGFが細胞対数増殖期に投与された場合には著しい増殖を示した。すなわち、細胞数は投与後24時間、培養3日目には、対照群が1シャーレ当たり(1.03±0.01)×10⁶個であったのに比べて0.5単位投与群では1シャーレ当たり(1.68±0.20)×10⁶個、5単位投与群で1シャーレ当たり(2.66±0.12)×10⁶個に達し、濃度依存性の増殖を示した(p<0.05)。また、³H-チミジンの取り込み実験では表3に示す通りである。培養3日目の1シャーレ当たり³H-チミジンの取り込みでは、PDGF投与群(0.5単位投与群24246±9337cpm、5単位投与群18425±2380cpm)と対照群(10707±4717cpm)の間に有意差を認めなかった。サブコンフルエントの培養4日目にPDGFで細胞を刺激すると2日目と同様、細胞は良好な反応を示し、細胞数は対照群が1シャーレ当たり(2.16±0.10)×10⁶個であったのに比べて0.5単位投与群では1シャーレ当たり(2.56±0.04)×10⁶個、5単位投与群では(3.08±0.08)×10⁶個に達しており、濃度依存性の増殖を認めた(p<0.05)。1シャーレ当たりの³H-チミジンの取り込みは、PDGF投与群(0.5単位

Table 3. Effect of various growth factors on thymidine uptake per dish of cultured smooth muscle cells at logarithmic proliferative and subconfluent phases

Growth factor	logarithmic proliferative phase 3rd day (CPM)*	Subconfluent phase 5th day (CPM)*
PDGF (U)		
0	10,707±4,714	3,002±1,428
0.5	24,246±9,337	5,908± 352
5	18,425±2,380	5,081±1,488
IL-1 (U)		
0	23,824± 510	8,863± 781
0.1	26,235±2,254	8,870± 702
1	27,599±1,583	6,837±1,343
TGF β (pM)		
0	33,641±2,089	4,519± 184
10	27,527±2,943	5,142± 651
100	15,904±5,065	5,485± 390

* The mean ± standard deviation of duplicate determinations.

Abbreviations: PDGF, platelete-derived growth factor; IL-1, interleukin-1; TGF β, transforming growth factor-beta; U, unit/ml; pM, picomol; CPM, count per minute.

投与群5908±352cpm, 5単位投与群5081±1488cpm)で対照群(3002±1428cpm)に比べて有意差はなかった。

2) IL-1

IL-1投与では対照群に比べて, 0.1単位, 1単位投与群, の対数増殖期及び, 1単位投与群のサブコンフルエント期においては, 有意の細胞増殖を認めたものの ($p < 0.05$), 明瞭な濃度依存性は見出せなかった。培養3日目の細胞数は, 対照群1シャーレ当たり (1.72 ± 0.04) $\times 10^5$ 個であるのに対して, IL-1投与群では0.1単位, 1単位投与群でそれぞれ1シャーレ当たり (1.96 ± 0.02) $\times 10^5$ 個, (1.99 ± 0.03) $\times 10^5$ 個であった。また1シャーレ当たりの³H-チミジンの取り込みは対照群(23824±510cpm)に対してIL-1投与群では0.1単位, 1単位投与群でそれぞれ(26235±2254cpm, 27599±1583cpm)と有意差はなかった。サブコンフルエント期における培養5日目の細胞数は, 1シャーレ当たり対照群(3.33 ± 0.10) $\times 10^5$ 個に対してIL-1投与群では0.1単位投与群, 1単位投与群でそれぞれ(3.40 ± 0.02) $\times 10^5$ 個, (3.59 ± 0.02) $\times 10^5$ 個であり, 対照群に対して1単位投与群のみが有意に増殖していた ($p < 0.05$)。1シャーレ当たりの³H-チミジンの取り込みは, 対照群(8863±781cpm)に対してIL-1投与群でそれぞれ(8870±702cpm, 6837±1343cpm)であり, 有意差はなかった。

3) TGF β

TGF β 刺激では, PDGF, IL-1とは異なり, 培養2日目の対数増殖期に投与した場合には有意な細胞増殖抑制効果が認められた。すなわち, 細胞数は, 培養3日目には, 対照群が1シャーレ当たり (1.68 ± 0.02) $\times 10^5$ 個であったのに比べて10pM投与群では1シャーレ当たり (1.50 ± 0.04) $\times 10^5$ 個, 100pM投与群では1シャーレ当たり, (1.49 ± 0.00) $\times 10^5$ 個となり, 有意な減少を示したが, 濃度依存性はなかった ($p < 0.05$)。またこの時期の1シャーレ当たり³H-チミジンの取り込みは, 対照群が(33641±2089cpm)であったのに対して10pM投与群が(27527±2943cpm), 100pM投与群が(15904±5065cpm)であり対照群に対して100pM投与群のみが有意に減少していた ($p < 0.05$)。一方, サブコンフルエント期にTGF β を投与した場合には培養5日目の細胞数は, 対照群が1シャーレ当たり, (2.32 ± 0.12) $\times 10^5$ 個, 10pM投与群で1シャーレ当たり (2.38 ± 0.03) $\times 10^5$ 個で, 100pM投与群で1シャーレ当たり (2.26 ± 0.03) $\times 10^5$ 個で, 有意差はなかった。また1シャーレ当たりの³H-チミジンの取り込みにおいても, 対照群(4519±185cpm), 10pMで

(5142±651cpm), 100pM投与群で(5485±390cpm)で明らかな抑制効果はなかった。

2. コラーゲン合成能

1) 総コラーゲン合成量の変化

各実験群における培養細胞1個当たりの総コラーゲン合成活性(量), 非コラーゲン性蛋白合成活性(量)及び全蛋白合成活性に対するコラーゲン性蛋白合成比は表4及び表5に示す通りである。

i) PDGF

PDGF投与群では対照群〔3日目(735.1 ± 0.7) $\times 10^{-4}$ cpm, 5日目(176.6 ± 0.5) $\times 10^{-4}$ cpm〕に比べて, 培養3日目では, 0.5単位投与で48% [(381.1±21.6) $\times 10^{-4}$ cpm] 5単位投与で68% [(231.7±78.0) $\times 10^{-4}$ cpm] 合成量が減少した(表4)。培養5日目では, 0.5単位投与で18% [(145.5±2.4) $\times 10^{-4}$ cpm] 5単位投与で27% [(128.4±25.1) $\times 10^{-4}$ cpm]の減少を示した(表5)。このようにPDGFによる細胞数と総コラーゲン合成活性は前者が増加すると後者が減少した。しかし, 総蛋白合成活性に対するコラーゲン性蛋白合成活性の比率は表4, 5に示すように対数増殖期においても, サブコンフルエント期においても, 対照に比べて1.4%から12%高かった。

ii) IL-1

PDGFとは異なりあまり強い増殖を示さなかったIL-1投与群では, 総コラーゲン合成促進作用と抑制作用の両方が示された(表4, 5)。培養3日目では細胞1個当たりの総コラーゲン合成は抑制された。すなわち0.1単位投与で対照 [(153.7±0.1) $\times 10^{-4}$ cpm]の13% [(133.8±11.6) $\times 10^{-4}$ cpm], 1単位投与で19% [(125.0±6.4) $\times 10^{-4}$ cpm] 合成量が減少した。培養5日目では細胞1個当たりの総コラーゲン合成は促進された(表5)。すなわち対照 [(86.7±0.1) $\times 10^{-4}$ cpm]に比べて, 0.1単位投与で100% [(173.3±24.3) $\times 10^{-4}$ cpm], 1単位投与で63% [(141.1±5.6) $\times 10^{-4}$ cpm] 合成量は増加した。このようにIL-1による細胞増殖と総コラーゲン合成量は一定の傾向を示さなかった。また濃度にも比例しなかった。コラーゲン合成比率についても対照とIL-1投与群との間には差異はなかった。

iii) TGF β

TGF β 投与で増殖が抑制された培養3日目測定の群では細胞1個当たりの総コラーゲン合成量は, 対照群 [(110.0±0.2) $\times 10^{-4}$ cpm]に比べて10pM投与で22% [(134.5±5.7) $\times 10^{-4}$ cpm], 100pM投与で31% [(144.6±32.0) $\times 10^{-4}$ cpm]の増加を認めた(表4)。一方細胞数において対照群とTGF β 投与群の差がな

かった培養5日目では細胞1個当たりの総コラーゲン合成量は、対照群 $[(247.4 \pm 0.4) \times 10^{-4} \text{cpm}]$ に比べて10pM投与でやや減少したものの有意差はなく $[(227.2 \pm 31.8) \times 10^{-4} \text{cpm}]$ 、100pM投与で15% $[(209.4 \pm 19.6) \times 10^{-4} \text{cpm}]$ を示して一定の傾向は見出せなかった。このようにTGF β 投与群では、細胞増殖が抑制された場合のみに総コラーゲン合成量が増加した。しかし、総コラーゲン量の減少にも拘らず、コラーゲン合成比でみると、いずれの時期においても対照群と変わらなかった。

2) 型別コラーゲンの変化

培養動脈平滑筋細胞の合成するコラーゲンはすべての群においてI型コラーゲンが優位で、測定し得たコ

ラーゲン中の47%から88%を占めた(表4, 5)。次いでIII型コラーゲンが多く、10%から39%を占め、I型とIII型の2種のコラーゲンで総コラーゲンのほぼ90%に達した。残りはIV型コラーゲンとV型コラーゲンであったが、使用した細胞によっては、IV型コラーゲンはごく微量のために測定可能とは限らなかった。

i) PDGF

PDGF投与群は、培養3日目ではV型コラーゲンの割合が対照群で3.0%であったのに対して、5単位投与群で6.3%と増加した(表4)が、0.5単位投与群で3.1%と対照との差は見出せなかった。培養5日目ではV型コラーゲンの割合が対照群で2.3%であったのに対して、0.5単位投与群で3.6%、5単位投与群で

Table 4. Effect of various growth factors on collagen synthesis of cultured smooth muscle cells at logarithmic proliferative phase

Growth factor	Clagenous protein* CPM $\times 10^{-4}$ /Cell	Non-collagenous protein* CPM $\times 10^{-4}$ /Cell	Rate of collagen synthesis* (%)	Relative proportions of collagen types I, III, IV and V						
				I (%)	III (%)	IV (%)	V (%)	III/I	IV/I	V/I
PDGF (U)										
0	735.1 \pm 0.7	1,844.3 \pm 10.1	6.9 \pm 0.1	80.4	16.6	+	3.0	0.207	+	0.0376
0.5	381.1 \pm 21.6	848.6 \pm 79.6	7.7 \pm 0.3	80.8	16.2	+	3.1	0.200	+	0.0378
5	231.7 \pm 78.0	579.6 \pm 210.4	7.0 \pm 0.2	79.2	14.5	+	6.3	0.184	+	0.0791
IL-1 (U)										
0	153.7 \pm 0.1	354.2 \pm 9.9	7.2 \pm 0.1	73.4	22.7	2.2	1.7	0.309	0.0300	0.0232
0.1	133.8 \pm 11.6	295.0 \pm 3.0	7.5 \pm 0.4	78.4	16.5	1.7	3.3	0.210	0.0211	0.0432
1.0	125.0 \pm 6.4	272.9 \pm 12.0	7.3 \pm 0.1	70.7	18.4	2.2	8.7	0.260	0.0314	0.1234
TGF β (pM)										
0	110.0 \pm 0.2	390.5 \pm 3.7	5.0 \pm 0.1	75.9	21.8	1.4	0.9	0.287	0.0189	0.0113
10	134.5 \pm 5.7	482.5 \pm 38.8	5.0 \pm 0.5	61.5	30.0	7.4	1.0	0.488	0.120	0.0167
100	144.6 \pm 32.0	518.1 \pm 2.4	4.9 \pm 0.8	47.1	39.0	13.2	0.7	0.826	0.279	0.0158

* The mean \pm standard deviation of duplicate determinations. Abbreviations: PDGF, platelet-derived growth factor; IL-1, interleukin-1; TGF β , transforming growth factor-beta; U, unit/ml; pM, picomol; CPM, count per minute. Symbols: +, faintly detectable but not measurable.

Table 5. Effect of various growth factors on collagen synthesis of cultured smooth muscle cells at subconfluent phase

Growth factor	Collagenous protein* CPM $\times 10^{-4}$ /Cell	Non-collagenous protein* CPM $\times 10^{-4}$ /Cell	Rate of collagen synthesis* (%)	Relative proportions of collagen types I, III, IV and V						
				I (%)	III (%)	IV (%)	V (%)	III/I	IV/I	V/I
PDGF (U)										
0	176.6 \pm 0.5	309.8 \pm 11.6	9.6 \pm 0.3	82.0	15.7	+	2.3	0.192	+	0.0280
0.5	145.5 \pm 2.4	237.2 \pm 4.5	10.1 \pm 0.2	85.5	10.0	+	3.6	0.116	+	0.0419
5	128.4 \pm 25.1	207.7 \pm 33.6	10.4 \pm 0.2	78.3	17.7	+	4.0	0.226	+	0.0516
IL-1 (U)										
0	86.7 \pm 0.1	334.9 \pm 154.6	5.7 \pm 2.5	84.9	13.3	+	1.8	0.157	+	0.0214
0.1	173.3 \pm 24.3	451.3 \pm 147.7	7.1 \pm 1.3	87.6	10.8	+	2.1	0.123	+	0.0237
1	141.1 \pm 5.6	349.1 \pm 44.2	7.1 \pm 0.6	81.1	16.7	+	2.2	0.206	+	0.0275
TGF β (pM)										
0	247.4 \pm 0.4	443.4 \pm 28.7	9.4 \pm 0.6	80.6	16.3	1.3	1.9	0.202	0.0155	0.0232
10	227.2 \pm 31.8	395.4 \pm 92.7	9.8 \pm 0.9	85.8	11.2	1.4	1.7	0.130	0.0163	0.0195
100	209.4 \pm 19.6	403.8 \pm 66.9	9.3 \pm 0.7	79.5	16.4	1.9	2.2	0.206	0.0240	0.0275

* The mean \pm standard deviation of duplicate determinations. Abbreviations: PDGF, platelet-derived growth factor; IL-1, interleukin-1; TGF β , transforming growth factor-beta; U, unit/ml; pM, picomol; CPM, count per minute. Symbol: +, faintly detectable but not measurable.

4.0%と増加した(表4)。III型コラーゲンは、培養3日目では対照群16.6%に対し、0.5単位投与群で16.2%、5単位投与群で14.5%と減少した。しかし培養5日目では対照群15.7%、0.5単位投与群で10.0%、5単位投与群で17.7%とPDGF投与量とIII型コラーゲン量との間に一定の傾向は見出せなかった。IV型コラーゲンは微量で測定はできなかった。

ii) IL-1

IL-1投与群は、培養3日目ではV型コラーゲンの割合が対照群で1.7%であったのに対して、0.1単位投与

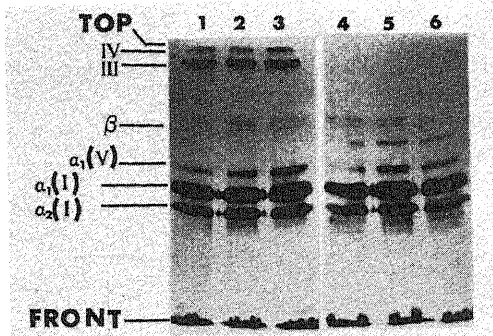


Fig. 8. SDS-PAGE (fluorogram) of ^3H -proline labeled collagenous protein synthesized by cultured smooth muscle cells stimulated with IL-1 at logarithmic proliferative phase for 24h (2nd to 3rd day). Lanes 1-3, non-reduction; lanes 4-6, reduction by DTT; lanes 1 and 4, controls; lanes 2 and 5, 0.1unit/ml of IL-1; lanes 3 and 6, 1unit/ml of IL-1.

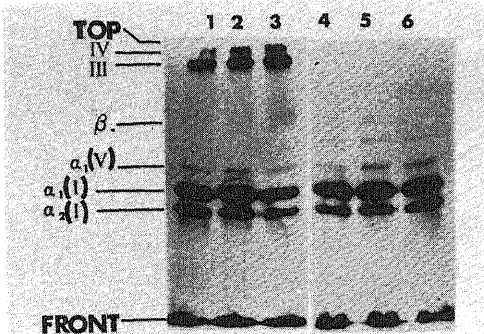


Fig. 9. SDS-PAGE (fluorogram) of ^3H -proline labeled collagenous protein synthesized by cultured smooth muscle cells stimulated with TGF β at logarithmic proliferative phase for 24h (2nd to 3rd day). Lanes 1-3, non-reduction; lanes 4-6, reduction; lanes 1 and 4, controls; lanes 2 and 5, 10 pM of TGF β ; lanes 3 and 6, 100 pM of TGF β .

群で3.3%、1単位投与群で、8.7%と増加した(表4、図8)。培養5日目ではV型コラーゲンの割合が対照群で1.8%であるのに対して、0.1単位投与群で2.1%、1単位投与群で、2.2%と増加傾向を示した(表5)が、あまり明瞭な差としてはとらえられなかった。III型コラーゲンに増減はなかった。

iii) TGF β

TGF β 投与群は、培養3日目ではIII型コラーゲンの割合が、対照群で21.8%であったのに対して、10pM投与群で30.0%と増加した(表4、図9)。IV型コラーゲンの割合も対照群では1.4%であるのに対して、10pM投与群で7.4%、100pM投与群で13.2%と増加した(表4、図9)。同時にI型コラーゲンの相対的減少がみられた。このIII型とIV型のコラーゲンの相対的増加は100pM投与で、総コラーゲンの52.2%(III型39%、IV型13.2%)を占め、I型コラーゲンは全体の47.1に低下した(表4、図9)。培養5日目では、TGF β 投与群のIV型コラーゲン合成促進作用は対照群で1.3%に対して、10pM投与群で1.4%、100pM投与群で1.9%となお維持されていたが、培養3日目程強い作用は認められなくなっていた(表5)。III型コラーゲンに対しては合成促進作用は対照群16.3%、10pM投与群で11.2%、100pM投与群で16.4%と消失した(表5)。V型コラーゲンには一定の傾向はなかった(表5)。

考 察

まずヒト大動脈内膜病変における型別コラーゲン分布の特徴について考察する。

今回、抗型別コラーゲン抗体を用いて各種の内膜肥厚性病変の型別コラーゲンの局在を観察してみると、硬化性病変の骨格を形成するのは主にI型とIII型の線維形成性コラーゲンであり、病変の進行とともにIV型、V型、VI型コラーゲンが増加することが示唆された。

線維性硬化巣内でI型、III型コラーゲンがびまん性に強い染色性を示すようになることはShekhoninら⁴³⁾や、Vossら³⁾もすでに報告しているところである。Shekhoninら³¹⁾は線維性硬化巣にI型、III型コラーゲンの染色性が強いことから、血小板粘着能の高いこれらのコラーゲンが動脈硬化巣の形成、進展に主要な役割を果たしているものと推定している。内膜における線維性肥厚病巣においては、動脈内膜でのI型及びIII型コラーゲンの比率に比べて、I型コラーゲンの占める割合が高くなり、とくに病変の進行とともに、I型コラーゲンが優位を示すといわれている²⁸⁾。

しかし、今回の免疫組織学的観察結果では、病変の進展に伴ってI型コラーゲンとIII型コラーゲンの陽性度が変わることはなかった。初期病変と思われる脂肪斑ではI型、III型コラーゲンともほぼ同様に分布、局在しており、両者とも病変の進行性病変では強く染め出されるようになった。免疫組織学的所見でコラーゲンの量比を決めることはできないが、少なくともI型及びIII型コラーゲンは同時に合成、沈着してゆくものと思われた。

基底膜コラーゲンであるIV型コラーゲン⁶⁾は病変の進行に従い、染色性が増強した。まず、初期病変の脂肪斑において、紡錘形細胞周囲にかなり陽性であることは注目される点である。おそらく、内膜に中膜から遊走してきた平滑筋細胞が内膜で増殖し、コラーゲンなど蛋白を分泌すると共に平滑筋細胞が本来備えている細胞基底膜をもつようになるからであろう。複合型病変の線維性組織内では紡錘形細胞周囲にとくにIV型コラーゲンが強く染色された。

Rossら³²⁾は電顕的に線維性組織内の平滑筋細胞周囲に多層性の基底膜が形成されていることを示している。従って、IV型コラーゲンに関する今回の所見は、平滑筋細胞のこのような形態変化と基底膜の形成との関係を支持しているように思われる。また、このことは生化学的に進行性病変においてIV型コラーゲン量が増加する⁹⁾ことを説明していると思われる。平滑筋細胞のこのような多層性の基底膜は細胞を血行学的な力から細胞を保護する一種の防御反応であり、このような平滑筋細胞は老化し、増殖能力を低下していることが指摘されている³²⁾。平滑筋細胞は増殖能の低下とともに表現型を合成型から収縮型へ転換する³³⁾といわれているので、IV型コラーゲンの陽性度は平滑筋細胞の表現型の変換、転換の程度をある程度推定できる指標となるかも知れない。V型コラーゲンは内膜平滑筋細胞内や、進行性病変の線維束間、平滑筋細胞周囲に弱陽性を示すにすぎなかった。このことは、生化学的にV型コラーゲンが増加するとする報告^{8)~10)}とは矛盾するようにみえる。しかし、Vossら⁹⁾が指摘するように、V型コラーゲンは細胞外では抗原決定基が他のコラーゲンによって遮蔽されてしまう可能性がある。事実、平滑筋細胞内にしばしば陽性を示すにも拘らず、細胞外ではびまん性内膜肥厚において、ほとんど陰性であった。V型コラーゲンはI型コラーゲンと結合してI型-V型雑種コラーゲンを形成する³⁴⁾³⁵⁾ことが知られているので、V型コラーゲンの抗原決定基がI型コラーゲンとの結合部位にあたるため大部分のV型コラーゲンが染め出されなかったものと思われる。V型

コラーゲンは動脈硬化巣のみならず、瘢痕組織³⁶⁾や胃癌³⁷⁾のような間質の増加する部位でも増加することが知られているので、線維化の一般的な性質を反映しているものと考えられる。

VI型コラーゲンは間質型コラーゲンとして広く組織に分布し、分子内に非ヘリックス部分の占める割合が高いコラーゲンである³⁶⁾³⁷⁾。生体内ではマイクロフィブリルまたは長周期性線維 (fibrous long-spacing fiber) 様線維を形成し細胞や線維間の接着に働いているものと推定されている³⁶⁾³⁹⁾。今回の免疫組織学的検査では、VI型コラーゲンは線維性硬化巣でびまん性にとめられ、とくに、びまん性線維性肥厚においてもほぼI型とIII型コラーゲンと同様に分布していた。更に、複合型病変の硝子化せる線維性組織に最も強く陽性であった。VI型コラーゲンは動脈硬化症の進展とともに増加するという生化学的データも⁸⁾も示されているので、おそらく線維間の結合に何らかの形で参画しているものと思われる。

次に培養動脈平滑筋細胞の増殖とコラーゲン合成におよぼす成長因子の影響について考察する。

今回検討に用いた成長因子の中では、PDGFが安定した増殖刺激作用を示した。血小板由来PDGFは分子量30000の塩基性糖蛋白であり、レセプターのチロジン残基をリン酸化して細胞増殖を促進させるものである¹³⁾⁴⁰⁾。このPDGFで培養細胞を刺激すると、細胞数と、細胞1個当たりの総コラーゲン合成量とは前者が増加すると後者は減少した。このことはPDGFによって増殖促進された動脈平滑筋細胞はFBS単独刺激による対照群に比べてコラーゲン合成活性を減少させたことを意味する。このことはPDGFは線維芽細胞のコラーゲン合成を増加させるという従来の報告¹⁹⁾⁴¹⁾に矛盾するようにみえる。しかし、これは主に実験条件の差異に基づくように思われる。Stavenowら¹⁹⁾は粗血小板上清と完全に静止期に誘導した細胞を用い、Owenら⁴¹⁾は無血清培地を用いている。これに対し、本実験では精製PDGFを短期間投与し、FBS添加の上、増殖期の細胞を用いて、細胞増殖能を保持している細胞におけるコラーゲン合成について検討したのである。PDGFは細胞周囲期をG₀からG₁へ移行するのを促進するコンピーテンス因子で、細胞分裂を速めるように誘導すると考えられている⁴²⁾。また、PDGFはフォスホリパーゼCを活性化してプロスタグランジンの産生促進をするなど、多彩な生物学的作用を保有している¹³⁾。従って、今回の条件下では、血清に加えてPDGFで増殖を刺激された培養平滑筋細胞は分裂増殖を促進して多くの細胞がG₀からG₁期

へ更にM期(分裂期)に移行し、その結果、M期の細胞が相対的に増加してしまい、みかけ上細胞あたりのコラーゲン合成活性が低下したのかも知れない。一般に、タンパク質のメッセンジャーRNA量は分裂間期に増加する⁴⁹⁾ので増殖に伴う総コラーゲン合成能の低下はむしろ蛋白合成に関与している細胞が相対的に減少していることが主要因と考えられる。

一方、Peterkofskyは⁴⁴⁾樹立された線維芽細胞では対数増殖期でコラーゲン合成が高いと報告している。線維芽細胞と平滑筋細胞とは細胞回転も異なり必ずしも断定はできないが、今回の成績をみると、細胞1個当たりの全蛋白合成に対するコラーゲン性蛋白合成活性の比はPDGF投与群で対照群に比べて1.4%から12%高かった。このことは蛋白合成に参画している細胞はコラーゲン性蛋白をPDGF刺激のもとで増加していると解釈される。PDGF刺激では同時にV型コラーゲン合成が相対的に上昇していることが注目される。PDGFがV型コラーゲン合成を刺激することは線維芽細胞において既に報告⁴⁵⁾されている。また、V型コラーゲンの増加は同時にIII型コラーゲンの相対的減少を伴うといわれている⁴⁶⁾。本実験における培養2日目から3日目に産生された型別コラーゲンの変化のうち、III型コラーゲンの相対的低下を伴っているの、V型コラーゲンの増加とIII型コラーゲンの減少は細胞増殖活性の高いPDGF刺激下では線維芽細胞と同様、平滑筋細胞においてもあてはまるものと思われる。III型コラーゲンは一般に線維芽細胞⁴⁶⁾においても、平滑筋細胞⁴⁷⁾においても培養細胞密度の増加と共にIII/I型コラーゲン比が増すといわれている。今回、PDGF刺激により細胞が増殖し、より高密度となったと思われる群でIII型コラーゲンがむしろ減少していた。おそらく、細胞密度は細胞の形態、サイズによってもかなり影響をうけているので、密度は大きく変わらずむしろPDGFの作用が加味してIII型コラーゲンの相対的減少につながったものと考えられる。

IL-1刺激では対数増殖期においてもサブコンフルエント期においても対照群と比較して細胞数は有意に増加した($p < 0.05$)。LibbyらはIL-1の細胞増殖作用に関して平滑筋細胞と線維芽細胞とは若干の差異があり⁴⁸⁾、とくにIL-1の投与条件によっては増殖抑制にも促進にも働くことを示している⁴⁹⁾。今回著者が行ったFBS存在下の実験ではIL-1は平滑筋細胞に対して軽度の細胞増殖作用を示すという結果であった。コラーゲン合成活性については、対数増殖期においては総コラーゲン合成量は減少し、サブコンフルエント期ではむしろ増加した。IL-1はコラーゲン代謝に対し

では間接的に働くサイトカインなのかも知れない。線維芽細胞においてはコラーゲン合成を抑制するという報告⁵⁰⁾とコラーゲン合成に促進的に作用するという報告^{51,52)}とがある。従って、今回の成績のばらつきもこのような理由によるものと思われる。対数増殖期の型別コラーゲン合成能のうち、V型コラーゲンが相対的に増加していた。この時期ではとくに有意の細胞増殖促進がみられたので、PDGFの場合と同様、細胞増殖亢進の細胞に共通する現象と考えられる。

今回の培養実験のうち、TGF β のみが細胞増殖を抑制すると同時にコラーゲン合成活性亢進を引き起こした。とくに対数増殖期においてはこの傾向は著しく、TGF β の作用はきわめて注目される。

TGF β は分子量25000耐熱性の塩基性蛋白⁵³⁾であり、平滑筋細胞の血清による細胞増殖を抑制することが知られている^{54,55)}。TGF β はチロジinkinaseレセプターを介して細胞を増殖促進させるPDGF、FGFやインシュリンなどの作用を抑制し、細胞増殖を調節している因子と考えられている²¹⁾。コラーゲン代謝に関しては少なくとも産生された細胞外マトリックス成分の分解を抑え、コラーゲンを沈着するように導くことや、I型、III型、V型コラーゲンのメッセンジャーRNAレベルを上昇させようといわれている²¹⁾。今回の短期間のTGF β 投与による平滑筋細胞の反応は、このようなTGF β の多彩な細胞活動調節機能から考えると十分理解できるものであろう。まず、細胞が減少するとコラーゲン合成が促進される傾向は、TGF β 作用でG₁及びG₂期の細胞、すなわち分裂間期の細胞が増え⁵⁶⁾、この結果蛋白合成能を上昇させたことと密接に関係があろう。この期間にはコラーゲン合成比についてみると対照群と変わらないこと、また、サブコンフルエント期でみても総コラーゲン合成量も細胞増殖も、コラーゲン合成比も対照群との間に差異をみなかったからである。型別コラーゲンの相対比については、対数増殖期でIII型とIV型コラーゲンが増加していた。対数増殖期においてもサブコンフルエント期においてもみとめられたIV型コラーゲンの相対的増加は極めて興味深い。TGF β は平滑筋細胞の増殖を間接的に抑制するのみではなく細胞自体を腫大させ⁵⁸⁾、表現型を変える作用⁵⁹⁾を示すことが知られている。また、平滑筋細胞の表現型を合成型から収縮型に変換すると、IV型コラーゲンが増加する^{50,57)}。従って、このTGF β 刺激時のIV型コラーゲン合成活性の上昇は平滑筋細胞のトランスフォームと密接に関連しているように思われる。

対数増殖期におけるIII型コラーゲンの相対的増加と

I型コラーゲンの相対的減少については、TGF β の直接的効果によるものか、細胞密度に関係するものか、または細胞の表現型と関連しているのかについては分からない。平滑筋細胞は線維芽細胞と異なり、培養条件によってはI型とIII型コラーゲンを同量ずつ産生する能力をもっている⁵⁰⁾⁵⁹⁾。おそらく、増殖が血清刺激以下に抑え込まれた平滑筋細胞はI型コラーゲンと同程度までIII型コラーゲンのメッセンジャーRNAレベルを上昇させることがあるものと考えられる。

結 論

ヒト大動脈内膜肥厚性病変における型別コラーゲン(I, III, IV, V, VI型)の分布、ならびに培養平滑筋細胞のコラーゲン合成能について検討し、次の結果を得た。

1. 初期病変のびまん性線維性肥厚と脂肪斑では、I型、III型、IV型、VI型コラーゲンはいずれもびまん性に分布していた。このうちIV型コラーゲンは内膜平滑筋細胞に沿って陽性であった。V型コラーゲンは内膜平滑筋細胞内にみとめられることがあった。

2. 粥腫形成を伴わない線維性硬化巣では、びまん性線維性肥厚と同様の分布を示したが、複合型病変や粥腫形成を伴う線維性キャップでは、I型、III型、IV型、VI型コラーゲン分布が不均等で、V型コラーゲンが不規則に線維束間や内膜平滑筋細胞周囲にみとめられた。

3. PDGFは培養動脈平滑筋細胞に対して明らかに細胞増殖効果を示した。増殖に伴わない細胞当たりのコラーゲン合成能はFBS刺激のみの対照に比べ低下したが、全蛋白合成活性に対するコラーゲン性蛋白の合成比は微増した。型別コラーゲンではV型コラーゲンの相対的増加とIII型コラーゲンの相対的減少傾向がみとめられた。

4. IL-1は平滑筋細胞に対して軽度の細胞増殖作用を示したがコラーゲン合成能については、一定の傾向を認めなかった。

5. TGF β は対数増殖期の培養平滑筋細胞の増殖を抑制した。同時に細胞当たりのコラーゲン合成能及び全蛋白合成能は上昇し、コラーゲン性蛋白合成比は変わらなかった。III型、IV型コラーゲンは相対的に増加した。サブコンフルエント期の平滑筋細胞はTGF β の影響をうけることは少なかったがIV型コラーゲンの微増をみることができた。

以上の結果は動脈平滑筋細胞が成長因子の影響をうけて単に増殖するのではなく、その増殖時期と密接に関連して各型コラーゲンを産生、沈着して内膜肥厚性

病変を形成するようになることを示唆している。

謝 辞

稿を終えるに臨み、研究の御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部第一病理中西功夫教授に深甚なる感謝の意を表します。また本研究の遂行にあたり当初より直接御指導いただき、終始御懇篤なる御助言や御教示を仰ぎました勝田省吾助教授ならびに岡田仁克講師に厚くお礼申し上げます。また、研究に御協力いただきました第一病理諸兄、並びに教室員の皆様に感謝致します。

文 献

- 1) Burke, J. M. & Ross, R.: Synthesis of connective tissue macromolecules by smooth muscle. *Int.Rev. Connect. Tissue Res.*, 8, 119-157 (1979).
- 2) Barnes, M. J.: Collagens in atherosclerosis. *Collage Rel. Res.*, 5, 65-97 (1985).
- 3) Voss, B. & Rauterberg, J.: Localization of collagen types I, III, IV and V, fibronectin and laminin in human arteries by the indirect immunofluorescence method. *Path. Res. Pract.*, 187, 568-575 (1986).
- 4) Shekhonin, B. V., Domogatsky, S. P., Idelson, G. L., Koteliansky, V. E. & Rukosuev, V. S.: Relative distribution of fibronectin and type I, III, IV, V collagens in normal and atherosclerotic intima of human arteries. *Atherosclerosis*, 67, 9-16 (1987).
- 5) Mayne, R.: Collagenous proteins of blood vessels. *Arteriosclerosis*, 6, 585-593 (1986).
- 6) 永井 裕: コラーゲンの構造と機能. 生体の化学, 39, 260-265 (1988).
- 7) McCullagh, K. A. & Balian, G.: Collagen characterization and cell transformation in human atherosclerosis. *Nature*, 258, 73-75 (1975).
- 8) Murata, K., Motayama, T. & Kotake, C.: Collagen types in various layers of the human aorta and their changes with the atherosclerotic process. *Atherosclerosis*, 60, 251-262 (1986).
- 9) Ooshima, A.: Collagen α B chain: Increased proportion in human atherosclerosis. *Science*, 213, 666-668 (1981).
- 10) Morton, L. F. & Barnes, M. J.: Collagen polymorphism in the normal and diseased blood vessel wall. Investigation of collagens types I, III and V. *Atherosclerosis*, 42, 41-51 (1982).

- 11) **Ross, R. & Glomset, J. A.**: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*, **180**, 1332-1339 (1973).
- 12) **Ross, R.**: The pathogenesis of atherosclerosis—An update. *N. Engl. J. Med.*, **314**, 488-500 (1986).
- 13) **Roos, R., Raines, E. W. & Bowen-Pope, D. F.**: The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*, **46**, 155-169 (1986).
- 14) **Miyazono, K., Okabe, T., Urabe, A., Takaku, F. & Heldin, C. -H.**: Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets. *J. Biol. Chem.*, **262**, 4098-4103 (1987).
- 15) **Singh, J. P. & Bonin, P. D.**: Purification and biochemical properties of a human monocyte-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 6374-6378 (1988).
- 16) **Leibovich, S. J., Polverini, P. J., Shepard, H. M., Wiseman, D. M., Shively, V. & Nuseir, N.**: Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor- α . *Nature*, **329**, 630-632 (1987).
- 17) **Assoina, R. K. & Sporn, M. B.**: Type β transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. *J. Cell Biol.*, **102**, 1217-1223 (1986).
- 18) **Assoian, R. K., Fleurdelys, B. E., Stevenson, H. C., Miller, P. J., Madtes, D. K., Raines, E. W., Ross, R. & Sporn, M. B.**: Expression and secretion of type β transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 6020-6024 (1987).
- 19) **Stavenow, L., Kjellström T. & Malmquist, J.**: Stimulation of collagen production in growth-arrested myocytes and fibroblasts in culture by growth factor (s) from platelets. *Exp. Cell Res.*, **136**, 321-325 (1981).
- 20) **Mizel, S. B., Dayer, J. -M., Krane, S. M. & Mergenhagen, S. E.**: Stimulation of rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte-activating factor (interleukin 1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 2474-2477 (1981).
- 21) **Sporn, M. B., Roberts, A. B., Wakefield, L. M. & de Crombrughe, B.**: Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J. Cell Biol.*, **105**, 1039-1045 (1987).
- 22) **Hsu, S. -M., Raine, L., & Fanger, H.**: A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin-complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.*, **75**, 734-738 (1981).
- 23) **Minamoto, T., Ooi, A., Okada, Y., Mai, M., Nagai, Y. & Nakanishi, I.**: Desmoplastic reaction of gastric carcinoma: A light- and electronmicroscopic immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Hum. Pathol.*, **19**, 815-821 (1988).
- 24) **Oda, Y., Kawahara, E., Minamoto, T., Ueda, Y., Ueda, Y., Ikeda, K., Nagai, Y. & Nakanishi, I.**: Immunohistochemical studies on the tissue localization of collagen type I, III, IV, V and VI in schwannomas. Correlation with ultrastructural features of the extracellular matrix. *Virchows Arch. B Cell Pathol.*, (in press).
- 25) **Ross, R.**: The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J. Cell Biol.*, **50**, 172-186 (1971).
- 26) **Peterkofsky, B., Chojkier, M. & Bateman, J.**: Determination of collagen synthesis in tissue and cell culture systems. In H. Furthmeyer (ed.), *Immunochemistry of the Extracellular Matrix*. Vol. II. Applications, 1st ed., p19-47, CRC Press, Florida, 1982.
- 27) **Hata, R., Ninomiya, Y., Nagai, Y. & Tsukada, Y.**: Biosynthesis of interstitial types of collagen by albumin-producing rat liver parenchymal cell (hepatocyte) clones in culture. *Biochemistry*, **19**, 169-176 (1980).
- 28) **Weber, K. & Osborn, M.**: Proteins and sodium dodecyl sulfate: Molecular weight determination on polyacrylamide gels and procedures. In H. Neurath, R. L. Hill & C. L. Boeder (eds.), *The Proteins*, Vol. I, 3rd ed. p179-223. Academic Press, New York, 1975.
- 29) **Lasky, R. A., Mills, A. D.**: Quantitative film

detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.*, **56**, 335-341 (1975).

30) Chamberlain, J. P.: Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with the water-soluble fluor, sodium salicylate. *Anal. Biochem.*, **98**, 132-135 (1979).

31) Shekhonin, B. V., Domogatsky, S. P., Muzykantov, V. R., Idelson, G. L. & Rukosuev, V. S.: Distribution of type I, III, IV, and V collagen in normal and atherosclerotic human arterial wall: immunomorphological characteristics. *Collagen Rel. Res.*, **5**, 355-368 (1985).

32) Ross, R., Wight, T. N., Strandness, E. & Thiele, B.: Human atherosclerosis. I. Cell, constitution and characteristics advanced lesions of the superficial femoral artery. *Am. J. Pathol.*, **114**, 79-93 (1984).

33) Chamley-Campbell, J., Campbell, G. R. & Ross, R.: The smooth muscle cell in culture. *Physiol., Rev.*, **59**, 1-61 (1979).

34) Adachi, E. & Hayashi, T.: In vitro formation of hybrid fibrils of type V collagen and type I collagen. Limited growth of type I collagen into thick fibrils by type V collagen. *Connect. Tissue Res.*, **14**, 257-266 (1986).

35) Birk, D. E., Fitch, J. M., Babiarz, J. P. & Linsenmayer, T. F.: Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *J. Cell Biol.*, **106**, 999-1008 (1988).

36) Ehrlich, H. P. & White, B. S.: The identification of α A and α B collagen chains in hypertrophic scar. *Exp. Mol. Pathol.*, **34**, 1-8 (1981).

37) Furuto, D. K. & Miller, E. J.: Characterization of a unique collagenous fraction from limited pepsin digests of human placental tissue: Molecular organization of the native aggregate. *Biochemistry*, **20**, 1635-1640 (1981).

38) Engel, J., Furthmayr, H., Odermatt, E., von der Mark, H., Aumailley, M., Fleischmajer, R. & Timpl, R.: Structure and macromolecular organization of type VI collagen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **460**, 25-37 (1985).

39) Bruns, R. B., Press, W., Engvall, E., Timpl, R. & Gross, J.: Type VI collagen in extracellular, 100-nm periodic filaments and

fibrils. Identification by immunoelectron microscopy. *J. Cell Biol.*, **103**, 393-404 (1986).

40) Bowen-Pope, D. F. & Ross, R.: Platelet derived growth factor. II. Specific binding to cultured cells. *J. Biol. Chem.*, **257**, 5161-5171 (1982).

41) Owen III, A. J., Geyer, R. P. & Antoniades, H. N.: Human platelet-derived growth factor stimulates amino acid transport and protein synthesis by human diploid fibroblasts in plasma-free media. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 3203-3207 (1982).

42) Deuel, T. F., Huang, J. S., Proffitt, R. T., Baenziger, J. U., Chang, D. & Kennedy, B. B.: Human platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.*, **256**, 8896-8899 (1981).

43) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D.: Molecular biology of the cell. p640, Garland Publishing, Inc., New York, 1983.

44) Peterkofsky, B.: The effect of ascorbic acid on collagen polypeptide synthesis and proline hydroxylation during the growth of cultured fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 318-328 (1972).

45) Narayanan, A. S. & Page, R. C.: Biosynthesis and regulation of type V collagen in diploid human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **258**, 11694-11699 (1983).

46) Abe, S., Steinmann, B. U., Wahl, L. M. & Martin, G. R.: High cell density alters the ratio of type III to I collagen synthesis by fibroblasts. *Nature*, **279**, 442-444 (1979).

47) Holderbaum, D. & Ehrhart, L. A.: Modulation of type I and III procollagen synthesis at various stages of arterial smooth muscle cell growth in vitro. *Exp. Cell Res.*, **153**, 16-24 (1984).

48) Libby, P., Wyler, D. J., Janicka, M. W. & Dinarello, C. A.: Differential effect of human interleukin-1 on growth of human fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis*, **5**, 186-191 (1985).

49) Libby, P., Warner, S. J. C. & Friedman G. B.: Interleukin 1: A mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanooids. *J. Clin. Invest.*, **81**,

487-498 (1988).

50) **Bhatnagar, R., Penforinis, H., Mauviel, A., Loyau, G., Saklatvala, J. & Pujol, J. -P.**: Interleukin-1 inhibits the synthesis of collagen by fibroblasts. *Biochem. Int.*, **13**, 709-720 (1986).

51) **Kähäri, V. -M., Heino, J. & Vuroio, E.**: Interleukin-1 increases collagen production and mRNA levels in cultured skin fibroblast. *Biochim. Biophys. Acta*, **929**, 142-147 (1987).

52) **Postlethwaite, A. E., Raghov, R., Stricklin, G. P., Poppleton, H., Seyer, J. M. & Kang, A. H.**: Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: Increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other of functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 α and β . *J. Cell Biol.*, **106**, 311-318 (1988).

53) **Assoian, R. K., Grotendorst, G. R., Miller, D. M. & Sporn, M. B.**: Cellular transformation by coordinated action of three peptide growth factors from human platelets. *Nature*, **309**, 804-806 (1984).

54) **Assoian, R. K., Komoriya, A., Meyers, C. A., Miller, D. M. & Sporn, M. B.**: Transforming growth factor- β in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and charac-

terization. *J. Biol. Chem.*, **258**, 7155-7160 (1983).

55) **Owens, G. K., Geisterfer, A. A. T., Yang, Y. W. -H. & Komoriya, A.**: Transforming growth factor- β -induced growth inhibition and cellular hypertrophy in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Cell Biol.*, **107**, 771-780 (1988).

56) **Katsuda, S., Okada, Y., Minamoto, T. & Nakanishi, I.**: Enhanced synthesis of type IV collagen in cultured arterial smooth muscle cells associated with phenotypic modulation by dimethyl sulfoxide. *Cell Biol. Int. Rep.*, **11**, 861-870 (1987).

57) **Chamley-Campbell, J. H. & Campbell, G. R.**: What controls smooth muscle phenotype? *Atherosclerosis*, **40**, 347-357 (1981).

58) **Mayne, R., Vail, M. S. & Miller, E. J.**: Characterization of the collagen chains synthesized by cultured smooth muscle cells derived from rhesus monkey thoracic aorta. *Biochemistry*, **17**, 446-452 (1978).

59) **Beldekas, J. C., Gerstenfeld, L., Sonenshein, G. E. & Franzblau, C.**: Cell density and estradiol modulation of procollagen type III in cultured calf smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **257**, 12252-12256 (1982).

Studies on the Collagen Production and Cell Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells Yutaka Matsui, Department of Pathology (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med. Soc., **98**, 201—219 (1989)

Key words smooth muscle cells, collagen, arteriosclerosis, culture, cell proliferation

Abstract

The distribution of collagen types I, III, IV, V and VI in intimal lesions of the aorta during development of arteriosclerosis was examined immunohistochemically, and synthetic activities of collagenous protein in cultured arterial smooth muscle cells of rabbits in their response to PDGF, IL-1 and TGF β were analysed. In fatty streak and diffuse intimal thickening, collagen types I, III, IV and VI were diffusely demonstrated, with pericellular localization of type IV collagen and intracytoplasmic positivity of type V collagen in smooth muscle cells. In contrast, the advanced lesions such as fibrous cap and fibrous component were characterized by uneven distribution of type I, III, IV and VI collagens, with extracellular appearance of type V collagen. PDGF (0.5U/ml, 5U/ml) and

IL-1(0.1U/ml, 1U/ml) supplemented at 2nd day (logarithmic proliferative phase) and at 4th day (subconfluent phase) promoted serum-induced proliferation of cultured smooth muscle cells, whereas TGF β (10pM, 100pM) inhibited the cell growth. Synthetic activity of collagenous protein was determined with ^3H -proline uptake, and subsequent analysis of collagen types by SDS-PAGE showed approximately 90% of collagen synthesized to be type III plus type I collagen. In PDGF, collagenous protein/cell decreased, type V collagen relatively increased, and the rate of collagen/total protein synthesis was slightly elevated. Stimulation by TGF β at the logarithmic proliferative phase resulted in marked increase in synthesis of collagenous protein with a relative high proportion of type IV collagen. However, the rate of collagenous protein synthesis remained unchanged and little effect of TGF β on cells at subconfluent phase was recognized. These results suggest that arterial smooth muscle cells produce collagen types I and III, as well as type IV and VI collagens in close correlation with cell proliferation, finally evolving in fibrous thickening of the aortic intima.