



Effects of lipoprotein(a) and low density lipoprotein on growth of mitogen-stimulated human umbilical vein endothelial cells

高橋, 明広

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1517

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001517>

※ 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。



氏名・（本籍）	たか はし あき ひろ 高 橋 明 広	（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第1029号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成8年3月31日	
学位論文題目	Effects of lipoprotein (a) and low density lipoprotein on growth of mitogen-stimulated human umbilical vein endothelial cells (リポプロテイン (a) (Lp (a)) と低比重リポ蛋白 (LDL) の培養血管内皮細胞の増殖に及ぼす影響)	
審査委員	主査 教授 横山 光宏 教授 前田 盛 教授 千葉 勉	

論文内容の要旨

【緒言】

血管内皮細胞の増殖は、経皮的冠動脈形成術（PTCA）後等の血管損傷時における修復機序において重要な役割を果たしている。血管内皮細胞に対する増殖因子の中では塩基性FGF（basic FGF; bFGF）が重要な役割を果たしていると考えられる。bFGFは内皮細胞自身が合成しており、主として内皮細胞周囲の細胞外マトリックスに蓄積されている。一方内皮細胞の増殖抑制因子中最も重要であると思われるのはtransforming growth factor- β （TGF- β ）の作用である。TGF- β は種々の細胞から前駆体として生成され、蛋白分解酵素の作用によって活性型に変化する。この反応に働く酵素としてプラスミンが重視されている。

リポ蛋白 (a) (Lp (a)) は血漿中に存在するリポ蛋白の一種であり、Bergが1963年に初めて報告して以来、主として疫学的根拠により冠動脈疾患との関連性が指摘されてきたが、そのメカニズムについては全く不明であった。Lp (a) の脂質組成は低比重リポ蛋白 (LDL) とほぼ同じであるが、その分子量や密度がheterogeneousな一群である。Lp (a) は特有なapo (a) とLDL様粒子 (LDL-like particle) という大きく異なった二つの部分からできている。apo (a) はLDL様粒子上のapoB-100とS-S結合しており、またプラスミノゲンと構造上の高い相同性を持っていることが特徴である。Lp (a) にはapo (a) が存在するため、プラスミノゲンの活性化を阻害し、二次的にTGF- β の活性化が抑制される。TGF- β 活性が低下することにより、中膜平滑筋細胞の増殖及び内膜への遊走が促進される。Lp (a) は直接血管内皮細胞と接しており、その増殖にも影響を与えていると考えられる。今回、我々はLp (a) の培養血管内皮細胞の増殖に及ぼす影響をLDLと比較検討した。

【実験材料及び方法】

1) 細胞

ヒト臍帯よりコラゲナーゼ処理にて採取したヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）の継代数2代～5代を実験に用いた。

2) Lp (a) およびLDLの精製

LDLは健常者の空腹時採血にて得られた血清から、超遠心法にて比重：1.019–1.050g/mlの分画を採取して用いた。Lp (a) は高Lp (a) 血症者 (50mg/dl以上) の空腹時採血にて得られた血清を超遠心法にて比重：1.050–1.120g/mlの分画を採取し、リジンセファールスカラムを用いて精製した。

3) DNA合成

24穴のプレートにHUVECを 2×10^4 /wellで播種し、2日間培養後サブコンフルエントの状態で行った。b-FGF (1ng/ml), インスリン (10 μ g/ml) 存在下に種々の濃度のLDLあるいはLp (a) と24時間培養し [3 H] -thymidineの取り込みにより評価した。

4) 細胞数

細胞数はHUVECを96 well plateに 4×10^3 cells/wellで播種し、DNA合成測定時と同様に刺激を加え3日間培養してクリスタルバイオレットで染色し、吸密度590nmで測定した。

5) 細胞内コレステロール定量

HUVECを 2×10^5 /well (6 well plate) で播種し、150 μ g cholesterol/mlのLp (a) あるいはLDLと48時間培養する。1.5mlのHexan/Isopropanol (3/2) を加えて脂質を抽出し、Heider & Boyetteの変法により総コレステロールと遊離コレステロール含量を測定し、その差をコレステロールエステル含量とした。

【結果】

b-FGFはインスリン10 μ g/mlの存在下で、濃度依存性にHUVECのDNA合成を増強し、10ng/mlの濃度では最大限にDNA合成を増強した。b-FGF (1ng/ml), インスリン (10 μ g/ml) の存在下でLDL及びLp (a) の添加はHUVECのDNA合成を濃度依存性に増加させた。単位コレステロールあたりで比較すると、Lp (a) は150 μ g cholesterol/mlの濃度では、LDLより40%低い [3 H] -thymidineの取り込みを示した。DNA合成のみならずHUVECの細胞数も、150 μ g cholesterol/mlの濃度ではLDLが、Lp (a) より22%強い増殖作用を示した。このLDLとLp (a) の増殖作用の差は、抗TGF- β 中和抗体の添加によっても消失しなかった。しかしながら、LDLとLDLレセプターとの結合を阻害する抗LDLレセプター抗体を添加すると、LDLとLp (a) 間に認められた増殖作用の差は消失した。150 μ g cholesterol/mlのLp (a) あるいはLDLと48時間培養した後の細胞内コレステロールエステル含有はLp (a) の方がLDLと比較して50%低い値を示した。

【考察】

今回の我々の結果では、培養血管内皮細胞に対するLp (a) の増殖作用はLDLと比較すると40%弱い作用であった。一方、培養血管平滑筋細胞の増殖に対してはLp (a) はLDLよりも強い増殖促進作用を有していることが報告され、その作用機序はLp (a) がプラスミン生成を抑制する結果、TGF- β の活性化を抑えることにより培養平滑筋の増殖を亢進させることが示されている。血管内皮細胞におけるLDLとLp (a) の増殖能に対する、TGF- β の関与を検討するために抗TGF- β 中和抗体を添加した結果、両リポ蛋白による血管内皮細胞数はいずれも増加したが、その差は消失しなかった。これらの結果より、TGF- β は二つのリポ蛋白の増殖能の違いには関与しないと考えられた。

Lp (a) はLDLと異なりLDL様粒子にapo (a) が結合している。Lp (a) のマクロファージや繊維芽細胞のLDLレセプターによる親和性はLDLよりも低い。これはLDLレセプターのリガンドであ

るapoB-100のレセプター認識部位の近傍にapo (a) が結合しているためと考えられており、還元処理によってapo (a) が切り離されるとLDL様粒子は繊維芽細胞やマクロファージにLDLと同等に取り込まれる。そこで二つのリポ蛋白の増殖能の違いにおけるLDLレセプターの関与を調べるために、apoB-100とLDLレセプターの結合を抑制する抗LDLレセプター抗体の存在下でLDLとLp (a) の増殖能を比較した。その結果、二つのリポ蛋白の増殖能はいずれも著明に抑制され、両者の違いが消失した。これらの結果よりLDLレセプターに対する親和性の差が増殖能の違いに繋がることが示唆された。HUVECをLDLあるいはLp (a) と共に培養するとこれらのリポ蛋白は細胞内に取り込まれて分解され、増殖時に主として細胞膜の合成に使用されるか、あるいはコレステロールエステルとして蓄積される。150 μ g cholesterol/mlのLp (a) あるいはLDLと48時間培養した後の細胞内コレステロール含量は総コレステロールで20%、コレステロールエステルが50%とそれぞれLp (a) の方がLDLと比較して低い値を示した。これらの結果よりリポ蛋白の細胞増殖刺激作用には、細胞内へリポ蛋白が取り込まれることが重要であることが示唆された。Lp (a) は血管内皮細胞に対する増殖作用はLDLと比較して弱く、内皮細胞の修復が遅延する結果、動脈硬化に促進的に働くことが示唆された。

【総括】

- i) Lp (a) の血管内皮細胞に対する増殖促進作用はLDLと比較して弱かった。
 - ii) LDLとLp (a) の増殖能の違いはTGF- β の活性化の差よりも、LDLレセプターへの親和性の差によることが示唆された。
 - iii) Lp (a) 存在下でのHUVECの細胞内コレステロールエステル含量はLDLの50%であった。
- 以上よりリポ蛋白の血管内皮細胞増殖刺激作用には、LDLレセプターを介した細胞内へのリポ蛋白の取り込みとの関連が認められた。Lp (a) はLDLより強い血管平滑筋細胞の増殖作用を有しているが、血管内皮細胞に対する増殖作用はLDLと比較して弱く、結果として動脈硬化に促進的に働くことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

血管内皮細胞の増殖は、経皮的冠動脈形成術をはじめ種々の原因による血管損傷時における修復機構において重要な役割を果たしている。血管内皮細胞に対する増殖因子としては塩基性fibroblast growth factor (b-FGF) が重要な役割を果たしていると考えられる。b-FGFは内皮細胞自身が合成しており、主として内皮細胞周囲の細胞外マトリックスに蓄積されている。一方内皮細胞の増殖抑制因子中最も重要であると思われるのはtransforming growth factor- β (TGF- β) の作用である。TGF- β は種々の細胞から前駆体として生成され、蛋白分解酵素の作用によって活性型に変化するが、この反応に働く酵素としてプラスミンが重視されている。

リポ蛋白 (a) [Lp (a)] は血漿中に存在するリポ蛋白の一種であり、主として疫学的根拠により冠動脈疾患との関連性が指摘されてきたが、そのメカニズムについては全く不明であった。Lp (a) はapo (a) とLDL様粒子 (LDL-like particle) の二つの部分からできている。apo (a) はプラスミノゲンと構造上高い相同性を持っていることが特徴であり、そのためLp (a) はプラスミノゲンの活性化を阻害し、二次的にTGF- β の活性化を抑制する。血管平滑筋細胞ではLp (a) によってTGF- β 活性が低下することにより、その増殖及び内膜への遊走が促進される。Lp (a) は直接血管内皮

細胞と接しており、その増殖にも影響を与えていると考えられる。今回、我々はLp (a) の培養血管内皮細胞の増殖に及ぼす影響をLDLと比較検討した。

ヒト臍帯よりコラゲナーゼ処理にて採取したヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を2日間培養後サブコンフルエントの状態を実験に用いた。LDLは健常者の空腹時採血にて得られた血清から、超遠心法にて比重: 1.019–1.050g/mlの分画を採取して用いた。Lp (a) は高Lp (a) 血症者 (50mg/dl以上) の空腹時採血にて得られた血清を超遠心法にて比重: 1.050–1.120g/mlの分画を採取し、リジンセファールカラムを用いて精製したものを用いた。リポ蛋白のDNA合成への影響は、b-FGF (1ng/ml), インスリン (10 μ g/ml) 存在下に種々の濃度のLDLあるいはLp (a) と24時間培養し [3 H] -thymidineの取り込みにより評価した。細胞数はHUVECを96 well plateに 4×10^3 cells/wellで播種し、150 μ g cholesterol/mlのLp (a) あるいはLDLと3日間培養してクリスタルバイオレットで染色し、吸密度590nmで測定した。細胞内コレステロール含量は脂質を抽出し、Heider & Boyetteの変法により総コレステロールと遊離コレステロール含量を測定し、その差をコレステロールエステル含量とした。本研究において以下の結果を得た。

b-FGFはインスリン10 μ g/mlの存在下で、濃度依存性にHUVECのDNA合成を増強した。LDL及びLp (a) の添加はb-FGF (1ng/ml) とインスリン (10 μ g/ml) の存在下でHUVECのDNA合成を濃度依存性に増加させた。単位コレステロールあたりで比較すると、Lp (a) は150 μ g cholesterol/mlの濃度では、LDLより40%低い [3 H] -thymidineの取り込みを示した。DNA合成のみならずHUVECの細胞数も、150 μ g cholesterol/mlの濃度ではLDLが、Lp (a) より22%強い増殖作用を示した。血管内皮細胞におけるLDLとLp (a) の増殖刺激作用に対するTGF- β の関与を検討するために抗TGF- β 中和抗体を添加したところ、両リポ蛋白によって血管内皮細胞数はいずれも増加したが、LDLとLp (a) の増殖刺激作用における差は消失しなかった。この結果より、TGF- β は二つのリポ蛋白の増殖刺激作用の違いには関与しないと考えられた。次に、二つのリポ蛋白の増殖刺激作用の違いにおけるLDLレセプターの関与を調べるために、apoB-100とLDLレセプターの結合を抑制する抗LDLレセプター抗体の存在下でLDLとLp (a) の増殖刺激作用を比較した。その結果、二つのリポ蛋白の増殖刺激作用はいずれも著明に抑制され、両者の違いが消失した。これらの結果よりLp (a) とLDLの増殖刺激作用に対する違いはこれらのリポ蛋白のLDLレセプターに対する親和性の差によって生じることが示された。150 μ g cholesterol/mlのLp (a) あるいはLDLと48時間培養した後の細胞内コレステロール含量はLp (a) の方がLDLと比較して総コレステロールで20%、コレステロールエステルが50%とそれぞれ低い値を示した。これらの結果よりリポ蛋白の細胞増殖刺激作用には、細胞内へリポ蛋白が取り込まれ分解され、増殖時に主として細胞膜の合成に使用されるか、あるいはコレステロールエステルとして蓄積されることが重要であることが示された。Lp (a) の血管内皮細胞に対する増殖刺激作用はLDLと比較して弱く、血管障害により内皮細胞の修復が遅延する結果、動脈硬化に促進的に働くことが示唆された。

本研究は培養ヒト血管内皮細胞増殖に対するLp (a) とLDL効果を比較検討したものであるが、Lp (a) とLDLは血管内皮細胞の増殖刺激作用を有したが、Lp (a) の血管内皮細胞に対する増殖刺激作用はLDLと比較して弱かった。LDLとLp (a) の増殖刺激作用の違いはTGF- β の活性化の差異によるのではなく、LDLレセプターへの親和性の差異によることが示された。

以上の研究成績は、従来行われていない重要な新しい知見を得たものとして、価値ある業績であると認める。

よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があるものと認める。