



Chylomicron remnants upregulate CD40 expression via the ERK pathway and a redox-sensitive mechanism in THP-1 cells

亀村, 幸平

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2006-02-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3502

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003502>

※ 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。



【 86 】

氏 名・(本 籍)	亀村 幸平 (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1708号
学位授与の 要 件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の 日 付	平成18年2月28日

【 学位論文題目 】

Chylomicron remnants upregulate CD40 expression via the ERK
pathway and a redox-sensitive mechanism in THP-1 cells
(カイルロミクロンレムナントは THP-1 細胞において ERK 経路
および redox-sensitive mechanism を介して CD40 の
発現を亢進する)

審 査 委 員

主 査	教 授	中村 俊一
	教 授	秋田 穂束
	教 授	春日 雅人

【 緒言】

臨床では low-density lipoprotein (LDL)コレステロールと並んで、トリグリセリドに富むリポ蛋白の増加が虚血性心疾患発症に関与する。その中でカイロミクロンレムナント（以下レムナント）は食後高脂血症における主要なリポ蛋白であり、強い粥状硬化惹起性を持つとされる。食事由来脂質で小腸粘膜細胞において合成されたカイロミクロンが、血管内皮上に存在するリポ蛋白リパーゼによってリポ蛋白中の中性脂肪の加水分解を受け、コレステロールエステル転送蛋白の作用により他のリポ蛋白からコレステロールエステルの供給を受けた結果、血管壁に侵入できる大きさの粒子となるが、これをレムナントと呼んでいる。異化を受ける過程でアポ蛋白 C が遊離し、アポ蛋白 E が集積する。アポ E をリガンドに、肝細胞やマクロファージに存在する LDL 受容体を主体として、そして一部はレムナントを結合する他の受容体も介して細胞に取り込まれる。レムナントは正常では食後数分から数時間で肝臓に取り込まれるが、耐糖能異常や複合型高脂血症において血中に停滞し、これらの疾患における動脈硬化病変形成に寄与している。これまで我々はレムナントが変性を受けずにマクロファージの泡沫化をきたすこと、血管内皮細胞において低濃度では plasminogen activator inhibitor-1 の分泌を亢進し、高濃度ではアポトーシスを誘導すること、血管平滑筋細胞において monocyte chemoattractant protein-1 の分泌を亢進することを明らかにしてきた。CD40 は TNF 受容体スーパーファミリーに属する 48-kDa の膜蛋白である。近年、CD40 とそのリガンドである CD154(CD40L)の動脈硬化発症への関与が注目

されている。CD40 の発現は粥状硬化巣を形成するマクロファージ、平滑筋細胞、内皮細胞等において認められる。本研究において、食後高脂血症における動脈硬化の発症進展の更なる機序解明のため、レムナントがマクロファージ系細胞である THP-1 細胞における CD40 発現に及ぼす影響を検討した。

【 方法】

細胞はヒト単球由来白血病細胞系の THP-1 細胞またはヒト末梢血単核球細胞を用いた。雄性ラットの胃瘻より 10%の卵黄液を持続注入し、回収したリンパ液から超遠心法によりカイロミクロンを精製した。次に機能的肝切除術を施行したラットにカイロミクロンを静脈注入し、3 時間後血液を回収し超遠心法によりレムナントを精製した。THP-1 細胞にレムナントを添加して CD40 蛋白の発現をウエスタンブロット法、CD40 mRNA の発現を real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction 法、THP-1 細胞表面での CD40 発現を fluorescence-activated cell sorting(FACS)法で調べた。また THP-1 細胞に、抗酸化剤である *N*-acetylcysteine、p38 mitogen-activated protein kinase、(MAPK)阻害剤である SB203580、MAPK kinase (MEK)阻害剤である U0126 をそれぞれ前処置し、これら薬剤の CD40 蛋白発現やリン酸化経路制御への影響を調べた。p38 MAPK および extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2)のリン酸化はそれぞれ特異的リン酸化抗体を使用し、ウエスタンブロット法で調べた。THP-1 細胞内での活性酸素種の発現は reactive oxygen species (ROS)を認識する carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein

diacetate を使用した FACS 法で検討し、redox-sensitive mechanism の評価とした。

【結果】

レムナントは THP-1 細胞において濃度(0-1 $\mu\text{g/ml}$)および時間(0-24 時間)依存性に CD40 蛋白の発現を増加させた。ヒト末梢血単核球細胞でも CD40 蛋白発現の増加を認めた。レムナントは CD40 mRNA の発現を濃度(0-1 $\mu\text{g/ml}$)依存性に増加した。FACS 法で評価した細胞膜表面における CD40 発現も増加させた。カイロミクロン、lysophosphatidylcholine (LPC)、酸化 LDL の添加では THP-1 細胞において CD40 蛋白の増加は軽度の上昇にとどまり有意でなかった。レムナントは THP-1 細胞において ROS の産生を増加させ、抗酸化剤である *N*-acetylcysteine の前処置はレムナントによる ROS の産生を抑制させた。また THP-1 細胞においてレムナントは p38MAPK および ERK1/2 のリン酸化を誘導した。しかしレムナントによる CD40 蛋白発現増加は MEK を阻害する U0126 で完全に抑制されたものの、p38 MAPK を阻害する SB203580 では抑制されなかった。また *N*-acetylcysteine はレムナントによる CD40 蛋白発現増加を約 60%抑制した。ERK1/2 のリン酸化は U0126 により濃度依存性に抑制されたが、*N*-acetylcysteine では抑制されなかった。

【考察】

本研究でレムナントは THP-1 において CD40 蛋白および mRNA の発現を亢

進する事が明らかになった。ヒト末梢血単核球細胞でも CD40 発現の亢進を認めた。他の脂質、特に酸化 LDL で我々は CD40 発現の有意な亢進を認めなかったが、亢進を認める報告もあり、LDL の酸化の程度や細胞の違い等に起因すると思われる。また LPC は酸化 LDL に含まれる生理活性の強い物質であり、レムナントでもカイロミクロンと比べてそのリン脂質中の比率が増加している。今回の検討では LPC による CD40 発現は軽度の上昇にとどまったが、LPC も含めてレムナント中のどの成分が CD40 発現に関わるかは今後の検討課題である。

CD40 の発現機序として、レムナントは p38MAPK および ERK1/2 のリン酸化を誘導するものの、CD40 発現には p38MAPK ではなく ERK1/2 のリン酸化経路が介することが明らかとなった。一方、レムナントは THP-1 細胞において ROS 産生を亢進し、抗酸化剤である *N*-acetylcysteine で ROS 産生は抑制され、CD40 発現の抑制は約 60%ながら抑制された。このようにレムナントの CD40 発現亢進には ERK1/2 を介する経路と ROS を含む redox-sensitive mechanism が関与することが明らかとなった。また *N*-acetylcysteine で ERK1/2 リン酸化が阻害されなかったことより、ROS が直接 ERK1/2 を活性化させて CD40 発現を誘導する事は考えにくい。以上の結果からレムナントは CD40 の発現を亢進させることにより粥状硬化の形成に関与することが示唆された。

【結論】

レムナントは THP-1 細胞において ERK1/2 および redox-sensitive mechanism を介して CD40 の発現を亢進した。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第1709号	氏 名	亀村 幸平
論文題目 Title of Dissertation	Chylomicron remnants upregulate CD40 expression via the ERK pathway and a redox-sensitive mechanism in THP-1 cells カイロミクロンレムナントはTHP-1細胞においてERK経路およびredox-sensitive mechanismを介してCD40の発現を亢進する		
審査委員 Examiner	主 査 中村 俊一 Chief Examiner 副 査 秋田 稔 Vice-examiner 副 査 春日 雅人 Vice-examiner		
審査終了日	平成18年 1月18日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【はじめに】

LDL コレステロールと並んで、トリグリセリドに富むリポ蛋白質の増加が虚血性心疾患に関与することが知られる。その中でカイロミクロンレムナント（以下、レムナント）は、食後高脂血症における主要リポ蛋白質であり、強い粥状硬化惹起性を有する。レムナントは正常では食後数分から数時間で肝臓に取り込まれるが、耐糖能異常や複合型高脂血症に於いて血中に停滞し、これらの疾患に於ける動脈硬化病変形成に寄与していると考えられる。申請者らはこれまでレムナントが変性を受けずにマクロファージの泡沫化を来すこと、血管内皮細胞に於いては低濃度では plasminogen activator inhibitor-1 の分泌を亢進し、高濃度ではアポトーシスを誘導すること、また血管平滑筋細胞に於いて monocyte chemoattractant protein-1 の分泌を亢進することなどを明らかにしてきた。CD40 は TNF 受容体スーパーファミリーに属する膜蛋白質である。近年、CD40 とそのリガンドである CD154 の動脈硬化発症への関与が注目されている。本研究において、食後高脂血症に於ける動脈硬化の発症進展の更なる機序解明のため、レムナントがマクロファージ系細胞である THP-1 細胞に於ける CD40 発現に及ぼす影響を検討した。

【方法】

ラットの胃瘻より10%の卵黄液を持続注入し、回収したリンパ液から超遠心法によりカイロミクロンを精製した。次に、機能的肝切除術を施行したラットにカイロミクロンを静脈注入し、3時間後血液を回収し、超遠心法によりレムナントを精製した。THP-1細胞にレムナントを添加してCD40の発現をウェスタンブロット法、CD40 mRNAを定量PCR法、細胞表面でのCD40発現をFACS法で調べた。p38 MAPK 及び ERK1/2 のリン酸化はそれぞれ特異的リン酸化抗体を使用し、ウェスタンブロット法で調べた。

【結果】

レムナントはTHP-1細胞に於いて濃度および時間依存性にCD40蛋白質の発現を増加させた。カイロミクロン、LPC、酸化LDLの添加では、CD40の発現上昇は有意では無かった。レムナントはTHP-1細胞においてROSの産生を増加させ、抗酸化剤であるN-acetylcysteineの前処置により、レムナントによるROSの産生は抑制された。また、THP-1細胞に於いてレムナントはp38MAPKおよびERK1/2のリン酸化を誘導した。しかし、レムナントによるCD40蛋白質発現の増加はMEKの阻害剤U0126で完全に抑制されるものの、p38MAPKの阻害剤SB203580では抑制されなかった。

【考察】

本研究では、レムナントがTHP-1細胞に於いてCD40の蛋白質およびmRNAの発現を増加させることを明らかにした。他の脂質、特に酸化LDLで申請者らはCD40発現の優位な増加を認めなかったが、亢進を認める報告もあり、LDLの酸化の程度や、細胞の違い等に起因すると思われる。また、LPCは酸化LDLに含まれる生理活性の強い物質であり、レムナントでもカイロミクロンに比べてその比率が増加していることが知られる。今回の検討では、LPCによるCD40発現は軽度の上昇にとどまったが、LPCも含めてレムナント中のどの成分がCD40発現に関与するのか、今後の検討課題である。また、レムナントによるCD40の発現亢進にはERK1/2を介する経路とROSを含むredox感受性機構が関与することが明かとなった。

本研究は、カイロミクロンレムナントがTHP-1細胞に於いてCD40の発現亢進を引き起こすことを初めて報告したもので、動脈硬化発症のメカニズムを理解する上で重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。