



Caffeine induces apoptosis of human umbilical veinendothelial cells through the Caspase-9 pathway

松岡, 正造

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2006-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3575

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003575>

※ 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。



【 96 】

氏 名・（本 籍） 松岡 正造 （ 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1718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3月25日

【 学位論文題目 】

Caffeine induces apoptosis of human umbilical vein
endothelial cells through the Caspase-9 pathway

（カフェインは培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）の
Caspase-9を介したアポトーシスを誘導する）

審 査 委 員

主 査 教 授 西尾 久英

教 授 尾原 秀史

教 授 横野 浩一

カフェインはコーヒーや紅茶などの飲料およびチョコレートなどの嗜好品に含まれ、日常的に摂取されている。これまで、妊娠中のカフェイン摂取はストレス軽減など利点もあり、特に問題ないとされてきた。一方で、近年、妊娠中のカフェイン摂取により流産や子宮内胎児発育不全の頻度を高めるとの疫学的な報告や、母体が摂取したカフェインの大部分が胎児胎盤循環に移行し、カフェイン摂取により胎盤血流が減少するとの報告がなされている。さらには、カフェイン摂取により胎盤において angiotensin II type 2 receptor の mRNA の発現を促すなどの報告があり、カフェイン摂取により胎児胎盤循環に影響を及ぼしている可能性が示唆されている。一方、in vitro 系の研究では神経細胞においてカフェイン添加により Caspase-3 を介したアポトーシスが起これとの報告もなされている。そこで本研究では流産や妊娠高血圧症候群の原因となる血管内皮障害に着目し、血管内皮細胞のアポトーシスに及ぼすカフェインの影響について培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて検討した。

患者の同意を得て分娩時に臍帯を採取し、トリプシン処理を行い臍帯静脈より血管内皮細胞を採取した。細胞は EGM-2 培地で培養し、2~3 継代の HUVEC を用いた。単層培養が 80 % confluence となった時点で無血清培地に変え、カフェイン 30, 100, 300 μ M 添加下、非添加下に 24, 48 時間培養した。カフェインの HUVEC に及ぼす影響に関して cell viability をトリプルにより、さらに、カフェインのアポトーシス誘導に及ぼす影響に関しては、DNA に特異的に結合する Hoechst 33342 染色を用いて、アポトーシス細胞における核の断片化、クロマチン凝縮を検出し、ミトコンドリアを介したアポトーシス誘導因子である Caspase-3、Caspase-9、および、細胞膜上のレセプターを介したアポトーシス誘導因子である caspase-8、さらに Poly-ADP

ribose polymerase (PARP) 蛋白発現を Western blot 法により検討した。

生細胞数はカフェイン 300 μ M 添加群においてカフェイン添加 24 時間、48 時間後ともに、非添加群に比し有意に減少した。カフェイン 30, 100 μ M 添加群においてカフェイン添加 24 時間後では生細胞数の有意な減少は認められなかったものの、48 時間後には非添加群に比し各々 56.1, 30.9 % と有意に減少した。Hoechst 33342 染色では、カフェイン 100, 300 μ M 添加群でクロマチン凝縮陽性細胞比率がカフェイン添加 24 時間後より有意に増加し、48 時間後には非添加群に比し各々 3.6, 4.3 倍へと有意に増加した。カフェイン添加後の HUVEC のアポトーシス関連蛋白発現の推移に関しては、Cleaved Caspase-9 蛋白発現は、100, 300 μ M カフェイン添加群において非添加群に比しカフェイン添加後 24 時間で有意に増加した。Cleaved Caspase-3 蛋白発現は、いずれの添加濃度でも非添加群に比し 24 時間後有意に増加した。Cleaved PARP 蛋白発現は、カフェイン 100, 300 μ M 添加群において非添加群に比し、カフェイン添加後 24 時間には各々 1.9, 2.2 倍へと有意に増加した。Cleaved Caspase-8 蛋白発現は、カフェイン添加群、非添加群いずれにおいてもいずれの添加濃度でも非添加群に比し有意な増加は認められなかった。

以上のことより、培養 HUVEC においてカフェイン添加により cell viability は抑制され、Caspase-8 を介する経路ではなく、ミトコンドリアから Caspase-9, Caspase-3 を介したアポトーシスがフェイン添加濃度依存性に誘導された。このことより妊婦のカフェイン摂取は臍帯静脈血管内皮細胞のアポトーシスに対し促進的に働くことが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1713 号	氏 名	松岡 正造
論文題目 Title of Dissertation	Caffeine induces apoptosis of human umbilical vein endothelial cells through theCaspase-9 pathway カフェインは培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）の Caspase-9 を介したアポトーシスを誘導する		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 副 査 Vice-examiner 副 査 Vice-examiner 西尾久英 尾原市史 横野浩一		
審査終了日	平成 18 年 2 月 16 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

カフェインはコーヒーや紅茶などの飲料およびチョコレートなどの嗜好品に含まれ、日常的に摂取されている。これまで、妊娠中のカフェイン摂取はストレス軽減など利点もあり、特に問題ないとされてきた。一方で、近年、妊娠中のカフェイン摂取により流産や子宮内胎児発育不全の頻度を高めるとの疫学的な報告や、母体が摂取したカフェインの大部分が胎児胎盤循環に移行し、カフェイン摂取により胎盤血流が減少するとの報告がなされている。さらには、カフェイン摂取により胎盤において angiotensin II type 2 receptor の mRNA の発現を促すなどの報告があり、カフェイン摂取により胎児胎盤循環に影響を及ぼしている可能性が示唆されている。一方、in vitro 系の研究では神経細胞においてカフェイン添加により Caspase-3 を介したアポトーシスが起こるとの報告もなされている。そこで本研究では流産や妊娠高血圧症候群の原因となる血管内皮障害に着目し、血管内皮細胞のアポトーシスに及ぼすカフェインの影響について培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）を用いて検討した。

患者の同意を得て分娩時に臍帯を採取し、トリプシン処理を行い臍帯静脈より血管内皮細胞を採取した。細胞は EGM-2 培地で培養し、2～3 継代の HUVEC を用いた。単層培養が 80 % confluence となった時点で無血清培地に変え、カフェイン 30, 100, 300 μ M 添加下、非添加下に 24, 48 時間培養した。カフェインの HUVEC に及ぼす影響に関して cell viability をトリパンプブルーにより、さらに、

カフェインのアポトーシス誘導に及ぼす影響に関しては、DNAに特異的に結合するHoechst 33342染色を用いて、アポトーシス細胞における核の断片化、クロマチン凝縮を検出し、ミトコンドリアを介したアポトーシス誘導因子であるCaspase-3、Caspase-9、および、細胞膜上のレセプターを介したアポトーシス誘導因子であるcaspase-8、さらにPoly-ADP ribose polymerase (PARP) 蛋白発現をWestern blot法により検討した。

生細胞数はカフェイン300 μ M添加群においてカフェイン添加24時間、48時間後ともに、非添加群に比し有意に減少した。カフェイン30, 100 μ M添加群においてカフェイン添加24時間後では生細胞数の有意な減少は認められなかったものの、48時間後には非添加群に比し各々56.1, 30.9%と有意に減少した。Hoechst 33342染色では、カフェイン100, 300 μ M添加群でクロマチン凝縮陽性細胞比率がカフェイン添加24時間後より有意に増加し、48時間後には非添加群に比し各々3.6, 4.3倍へと有意に増加した。カフェイン添加後のHUVECのアポトーシス関連蛋白発現の推移に関しては、Cleaved Caspase-9蛋白発現は、100, 300 μ Mカフェイン添加群において非添加群に比しカフェイン添加後24時間で有意に増加した。Cleaved Caspase-3蛋白発現は、いずれの添加濃度でも非添加群に比し24時間後有意に増加した。Cleaved PARP蛋白発現は、カフェイン100, 300 μ M添加群において非添加群に比し、カフェイン添加後24時間には各々1.9, 2.2倍へと有意に増加した。Cleaved Caspase-8蛋白発現は、カフェイン添

加群、非添加群いずれにおいてもいずれの添加濃度でも非添加群に比し有意な増加は認められなかった。

以上のことから、培養HUVECにおいてカフェイン添加によりcell viabilityは抑制され、Caspase-8を介する経路ではなく、ミトコンドリアからCaspase-9, Caspase-3を介したアポトーシスがフェイン添加濃度依存性に誘導された。このことから妊婦のカフェイン摂取は臍帯静脈血管内皮細胞のアポトーシスに対し促進的に働くことが示唆された。

本研究は胎児胎盤循環に関連性の高い血管内皮細胞に焦点をあて、カフェインの影響をin vitro臍帯静脈血管内皮細胞培養系で検討し、高濃度のカフェインが臍帯静脈血管内皮細胞のアポトーシスに対し促進的に働くことを国際的に初めて明らかにしたものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。