



Endothelial urocortin has potent antioxidative properties and is upregulated by inflammatory cytokines and pitavastatin

本庄, 友行

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3798

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003798>

※ 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。



【 1 0 0 】

氏 名・(本 籍) 本庄 友行 (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1798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19年3月25日

【 学位論文題目 】

Endothelial urocortin has potent antioxidative properties and is
upregulated by inflammatory cytokines and pitavastatin
(内皮細胞由来ウロコルチンの抗酸化作用と、炎症性サイトカイン
及びpitavastatinによる発現調節)

審 査 委 員

主 査 教 授 千原 和夫
教 授 秋田 穂束
教 授 清野 進

[緒言]

ウロコルチンは、ラットの中脳から同定された 40 のアミノ酸からなるペプチドで、コルチコトロピン放出因子ファミリーに属し、中枢神経系において食欲抑制作用などが報告されている。ヒトでは、大脳・下垂体などの中枢神経系だけでなく、胎盤・消化管・関節・リンパ球・脂肪細胞・心臓など様々な末梢器官に発現している。これらのことから、ウロコルチンは、中枢神経に対する作用だけではなく、末梢器官でなんらかの病態生理に関係していると推測される。実際、心血管系においては、外因性にウロコルチンを投与することにより、強心作用や血管拡張作用、虚血再還流時における心筋保護効果が報告されている。しかし、血管局所におけるウロコルチンの発現及び機能に関しては明らかになっていない。

最近、高脂血症治療薬である HMG-CoA 還元酵素阻害剤（スタチン）が、脂質低下作用だけではなく、抗炎症作用・抗酸化作用などの多面的作用を持つことが報告され、この多面的作用が血管内皮機能障害の改善・不安定粥腫の安定化に寄与していることが明らかになってきた。さらにスタチンが、心不全症例において、炎症性機転の抑制とともに、心機能を改善することが報告された。しかし、この薬剤の心機能改善のメカニズムは明らかにされていない。

今回我々は、血管内皮細胞におけるウロコルチンの発現・発現調整及びその機能について検討した。そして内皮細胞におけるスタチンとの関連についても検討した。

[方法]

1. ヒト冠動脈剖検標本を用いた免疫染色

凍結ヒト冠動脈剖検標本を用いて、6 μ m の薄切標本を作成した。1 次抗体

は rabbit anti-urocortin antibody (1:200)、2 次抗体は biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulins (1:500)、発色には streptavidin horse-radish peroxidase conjugate、DAB を用いた。また、ネガティブコントロールには、1 次抗体の代わりに rabbit nonspecific immunoglobulin を用いた。

2. 培養血管内皮細胞を用いたウロコルチン発現の検討

培養ヒト血管内皮細胞（HUVECs；ヒト臍帯静脈内皮細胞）でのウロコルチン発現を RT-PCR 法で確認した。HUVECs からの total RNA を鋳型に逆転写により相補的 DNA（cDNA）を作成し、Taq polymerase を用いて PCR を行った。プライマーは、sense 5'-CAGGCGAGCGGCCGCG-3'、anti-sense 5'-CTTGCCCACCGAGTCGAAT-3' で、PCR は 94℃1 分・60℃1 分・72℃1 分を 40 サイクル行った。PCR 産物は電気泳動により確認し、DNA 塩基配列も DNA シークエンスにより確認した。

3. 培養血管内皮細胞の細胞内活性酸素種産生の検討

HUVECs をスライドガラス上で培養し、アンジオテンシン II (10^{-7} M) またはウロコルチン (10^{-8} M) で 1 時間刺激した後、H₂DCFDA (10 μ M) を 30 分、37℃ でインキュベーションした。その後、共焦点レーザー顕微鏡で細胞内活性酸素種（ROS）を検討した。

4. 内皮ウロコルチンの発現調整の検討

内皮ウロコルチンの発現調整を検討するため、HUVECs を Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) (0.1~10ng/ml)・Interferon-gamma (IFN- γ) (20~200ng/ml)・Pitavastatin (0.1~3.0 μ M) で 0~24 時間刺激した。mRNA レベルでの発現を RT-PCR 法で、タンパク質レベルでの発現については細胞培養液を用いて ELISA 法で確認した。

5. ヒト血中ウロコルチン変動についての検討

インフォームドコンセントの得られた健常男性 15 名（25~41 歳）に

pitavastatin (2mg/day)を4週間投与し、空腹時採血により血清中のウロコルチン濃度の変化をELISA法で検討した。

[結果]

1. 内皮細胞におけるウロコルチンの発現

ヒト剖検冠動脈標本でのウロコルチン免疫染色による検討で、冠動脈内皮細胞及び、心筋内微小血管内皮細胞にウロコルチン発現を認めた。また、RT-PCRによりHUVECsでのウロコルチン発現を確認し、DNAシーケンスにより内皮ウロコルチンが中枢神経系ウロコルチンと同一であることを確認した。

2. 内皮ウロコルチンの抗酸化作用

H₂DCFDAを用いたHUVECsにおける細胞内ROSの検討で、アンジオテンシンII (10⁻⁷M)刺激によりHUVECsからのROS産生増強を認めた。ウロコルチン(10⁻⁶M)で同時刺激することにより、アンジオテンシンII刺激によるROSの産生が著明に抑制された。

3. 炎症性サイトカインによる内皮ウロコルチンの発現調節機構

内皮ウロコルチンの発現調節を検討するために、HUVECsに種々の炎症性サイトカインを投与した。タンパク質レベルでの発現調節をELISA法で確認したところ、TNF- α ・IFN- γ 刺激により時間依存性・用量依存性にウロコルチン発現が増加した。

また、mRNAレベルでの発現調整をRT-PCR法で確認したところ、TNF- α では3時間刺激をピークとしてウロコルチンmRNA発現は増加を認め、用量依存性の増加も確認できた。IFN- γ では時間依存性・用量依存性に増加を認めた。このように、内皮ウロコルチンは、炎症性サイトカインにて発現が調節されていた。

4. スタチンによる内皮ウロコルチンの発現調節機構

外因性に投与されたウロコルチンが心血管系に対して強心作用・心保護作用を有することが報告されている。また、スタチンもその多面的作用として心保護作用を有している。そこで、内皮ウロコルチンとスタチンの関連を検討した。

HUVECsにPitavastatinを投与しウロコルチン発現量を検討したところ、Pitavastatin投与により、ウロコルチンのタンパク質・mRNAレベルともに用量依存性に増加を認めた。

5. スタチン内服の血中ウロコルチンへの影響

PitavastatinによるHUVECsでのウロコルチン発現増加という結果より、Pitavastatin内服がヒトの血中ウロコルチン濃度に影響を及ぼすことが考えられた。そこで、Pitavastatin内服前後での血中ウロコルチン濃度の変化を検討した。

健常男性にPitavastatin (2mg/day, 4weeks)を投与すると、血清総コレステロール値・LDLコレステロール値は有意に低下し、それとともに、血清ウロコルチンは内服前11.0 \pm 6.5 ng/mlから内服後16.4 \pm 7.3 ng/mlと有意に増加を認めた。

[考察]

ウロコルチンは大脳・下垂体などの中枢神経系、胎盤・消化管・心臓など様々な末梢器官に発現しているが、今回の実験により血管内皮細胞でのウロコルチン発現が初めて明らかにされた。さらに、内皮ウロコルチンが、炎症性サイトカインによって、その発現が調節されていることが明らかとなった。

ウロコルチンは、食欲抑制・強心作用・心保護作用など多彩な生理機能を有することが報告されている。しかし、炎症性機転及び酸化ストレスに対す

る作用に関しては、ウロコルチンによりマウスでリポポリサッカライドによる血清 $\text{TNF-}\alpha$ ・ $\text{IL-1}\beta$ 産生を抑制するという報告がある一方で、ウロコルチンによりヒト末梢単核球からの IL-6 産生が増加するという報告もあり、統一された見解は得られていない。今回、ウロコルチンが血管内皮細胞において細胞内 ROS 産生を抑制し、抗酸化作用を有することが証明された。また、ウロコルチン発現は $\text{TNF-}\alpha$ や $\text{IFN-}\gamma$ などの炎症性サイトカイン・スタチンなどで調整されることから、血管内皮ウロコルチンは局所的に抗酸化作用を持ち、炎症が惹起された時は、その防御機構として発現が増加すると推測された。

また今回の研究により、培養血管内皮細胞にスタチンを投与すると、ウロコルチンの発現が著明に増加することが明らかにされた。さらにヒトにおいて、スタチン内服により血中ウロコルチン濃度の有意な増加を認めた。最近、スタチンの多面的作用として、抗炎症作用・抗酸化作用が明らかにされ、血管内皮機能障害の改善・不安定粥腫の安定化をもたらすこと、スタチン内服により心不全患者での症状・左室駆出率を改善することなどが報告されている。ウロコルチンの強心作用・心保護作用から考えると、スタチンの多面的作用にウロコルチンがなんらかの役割を果たしていることが推測できる。今後、スタチンによる血中ウロコルチン増加のメカニズムに関してさらなる研究が必要になると考えられる。

[結論]

ウロコルチンは血管内皮細胞に発現し、炎症性サイトカイン・スタチンなどにより発現調整をうける。その一方で、血管局所においては抗酸化的に作用する。また、ヒトにスタチンを投与すると血中ウロコルチン濃度は上昇し、ウロコルチンがスタチンの多面的作用に関係している可能性が示唆された。

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|----------------------------------|--|----|-------|
| 受付番号 | 甲 第1804号 | 氏名 | 本庄 友行 |
| 論文題目 Title of Dissertation | Endothelial urocortin has potent antioxidative properties and is upregulated by inflammatory cytokines and pitavastatin 内皮細胞由来ウロコルチンの抗酸化作用と、 炎症性サイトカイン及び pitavastatin による発現調節 | | |
| 審査委員 Examiner | 主 査 千原和夫 Chief Examiner 副 査 秋田和彦 Vice-examiner 副 査 清野 進 Vice-examiner | | |
| 審査終了日 | 平成 19 年 1 月 19 日 | | |

（要旨は1,000字～2,000字程度）

279

ウロコルチンは、コルチコトロピン放出因子（CRF）ファミリーに属する 40 アミノ酸からなるペプチドで、従来からその存在が想定されていたが本体が不明のままであった”組織 CRF”の有力候補物質として近年注目されている。ウロコルチンは、食欲抑制・強心作用・心保護作用など多彩な生理機能を有し、ヒトでは、中枢神経系だけでなく、胎盤、消化管、関節、リンパ球、脂肪組織、心臓など様々な末梢器官に発現している。特に、心血管系においては、外因性にウロコルチンを投与することにより、強心作用や血管拡張作用、虚血再還流時における心筋保護効果が報告されているが、血管局所におけるウロコルチンの発現及び機能に関しては明らかになっていない。今回、申請者は、血管内皮細胞におけるウロコルチンの発現・発現調節及びその作用について検討した。まず、ヒト冠動脈剖検標本を用いたウロコルチンの免疫染色法によって冠動脈内皮細胞及び、心筋内微小血管内皮細胞にウロコルチン発現を認めた。また、培養ヒト血管内皮細胞（HUVECs；ヒト臍帯静脈内皮細胞）でのウロコルチン発現を RT-PCR 法で確認した。血管内皮細胞にウロコルチンが発現していることは、かつて報告がなく初めての報告である。H₂DCFDA を用いた HUVECs における細胞内 ROS の検討で、アンジオテンシン II (10⁻⁷M) 刺激により HUVECs からの ROS 産生増強を認めた。ウロコルチン (10⁻⁸M) で同時刺激することにより、アンジオテンシン II 刺激による ROS の産生が著明に抑制された。血管内皮細胞におけるウロコルチンの発現調節を検討するために、HUVECs を種々の炎症性サイトカインで刺激したところ、TNF- α ・IFN- γ 刺激により時間依存性・用量依存性に蛋白レベルでウロコルチン発現が増加した。また、mRNA レベルでの発現調整を RT-PCR 法で確認したところ、TNF- α では刺激後 3 時間をピークとしてウロコルチン mRNA 発現の増加を認め、用量依存性の増加も確認できた。IFN- γ では時間依存性・用量依存性に増加を認めた。血管内皮細胞のウロコルチンの発現が、炎症性サイトカインによって調節されていること、ウロコルチンが血管内皮細胞において細胞内 ROS 産生を抑制し、抗酸化作用を有すること、ウロコルチン発現は TNF- α や IFN- γ などの炎症性サイトカイン・スタチンなどで調整されることから、血管内皮細胞ウロコルチンは局所的に抗酸化作用を持ち、炎症が惹起され

た時は、その防御機構として発現が増加する可能性が推測された。また、外因性に投与されたウロコルチンが心血管系に対して強心作用・心保護作用を有することが報告されていることから、申請者は血管内皮細胞におけるウロコルチンとスタチンの関連を検討した。HUVECs に Pitavastatin を投与したところ、ウロコルチンのタンパク質・mRNA レベルともに用量依存性に増加を認めた。最後に申請者は、Pitavastatin 内服前後での血中ウロコルチン濃度の変化を検討した。インフォームドコンセントの得られた健常男性 15 名に pitavastatin (2mg/day) を 4 週間投与し、空腹時採血により血清中のウロコルチン濃度の変化を調べたところ、血清総コレステロール値、LDL コレステロール値は共に有意に低下し、一方、血清ウロコルチンは内服前 11.0 \pm 6.5 ng/ml から内服後 16.4 \pm 7.3 ng/ml と有意に増加していた。最近、スタチンの抗炎症作用・抗酸化作用が明らかにされ、スタチン内服により心不全患者での症状・左室駆出率を改善することなどが報告されておりウロコルチンの強心作用・心保護作用から考えると、スタチンの多面的作用にウロコルチンがなんらかの役割を果たしていることが推測できる。

以上、本研究はウロコルチンの生理的役割および疾病との関係について、血管内皮細胞に発現しているウロコルチンに注目し、その発現調節機構および作用を研究し、さらにスタチン投与の血中ウロコルチン濃度変化を研究したものであるが、従来ほとんど知られていなかったウロコルチンと炎症性サイトカインの関係やウロコルチン及びスタチンの強心作用・心保護作用における相互作用について重要な知見を得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。