



Leptin stimulates rat aortic smooth muscle cell proliferation and migration

Oda, Akihiko

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-02-13

(Date of Publication)

2013-05-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2732

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002732>

※ 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 7 0 】

氏 名・（本 籍） 小田 明彦 （大分県）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博ろ第1901号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成16年2月13日

【 学位論文題目 】

LEPTIN STIMULATES RAT AORTIC SMOOTH MUSCLE
CELL PROLIFERATION AND MIGRATION

（レプチン刺激によるラット大動脈由来血管平滑筋細胞
の増殖と遊走）

審 査 委 員

主 査 教 授 横山 光宏

教 授 山村 博平

教 授 春日 雅人

「Leptin 刺激によるラット大動脈由来血管平滑筋細胞の増殖と遊走」

小田 明彦、谷口 隆弘、横山 光宏

神戸大学大学院医学系研究科 循環動態医学講座 循環呼吸器病態学

【Abstract】

脂肪細胞から分泌されるペプチド、レプチンは摂食行動とエネルギー代謝の調節に重要な役割を果たしていると考えられている。肥満患者において血漿中のレプチン濃度の上昇が指摘されており、また肥満は心・血管疾患の重要な危険因子である。今回我々は leptin が培養ラット大動脈由来血管平滑筋細胞に与える影響について検討した。

VSMC は short form type のレプチン受容体を発現しており、レプチンは血管平滑筋細胞の増殖と遊走を共に刺激した。また、レプチンは mitogen-activated protein (MAP) kinases の活性化と phosphatidylinositol (PI) 3-kinase 活性を上昇させた。さらに、2 種類の異なる PI 3-kinase インヒビター wortmannin と LY294002 はレプチン刺激による血管平滑筋細胞の遊走を抑制した。

これらの結果より、レプチンは血管平滑筋細胞に対する増殖・遊走因子であり、血管病変の形成と生成に重要な役割を果たしている事が示唆された。

【Introduction】

以前より、動脈硬化巣やバルーン血管形成術後に見られる動脈壁の内膜肥厚に、成長因子やサイトカイン、血管作動性ペプチドの様な種々の因子により引き起こされる血管平滑筋細胞の中膜から内膜への遊走と増殖の関与が示唆されている。

肥満は心血管疾患の危険因子であると考えられているが、直接の関連メカニズムについては現在まで報告が無い。

ob 遺伝子産物であるレプチンは摂食行動とエネルギー代謝の調節因子である事が示されている。レプチン受容体は少なくとも 5 種類の存在が知られており、その内、下垂体に存在する long form タイプの受容体は摂食行動の調節に関わっている事が知られているが、short form タイプの受容体は体内に広く存在しており、摂食行動や体重調節以外に何らかの役割を有している可能性が示唆される。

造血幹細胞や繊維芽細胞、脾β細胞の培養細胞系においてレプチンによる細胞増殖効果が報告されており、血管細胞においては、レプチンの内皮細胞増殖効果と血管新生の誘導が報告されている。

しかし、レプチンの血管平滑筋細胞に対する影響や、血管平滑筋細胞におけるレプチン受容体の発現については未知である。今回我々は血管平滑筋細胞におけるレプチン受容体の発現と、レプチン刺激による血管平滑筋細胞の機能への影響について調べた。

【方法と結果】

1. まず最初に、血管平滑筋細胞におけるレプチン受容体の発現について調べた。細胞はラット胸部大動脈由来の培養平滑筋細胞を用い、レプチン受容体蛋白の発現は抗ラットレプチン受容体抗体を用いた western blot 法にて検出した。レプチン受容体は 3 本のバンドとして検出され、分子量は約 130、80、78kDa であった。(レプチン受容体の N 末端側を認識する抗体、C 末端側を認識する抗体のいずれにおいても同じサイズの 3 本のバンドが検出された。)。約 130kDa のバンドは short form タイプのレプチン受容体であると考えられた。

2. レプチンによる血管平滑筋細胞の増殖と遊走に対する影響について調べた。レプチン蛋白はヒト脂肪組織より RT-PCR 法にて得たレプチン cDNA を transform した大腸菌から精製して用いた。2%FBS、ITS(insulin, transferrin, selenium)存在下に種々の濃度 (0-100ng/ml) のレプチンにて 3 日間培養した後、細胞数を crystal violet 染色法で評価した。レプチンは濃度依存性に血管平滑筋細胞増殖を促進し、その効果は 100ng/ml で最大であり、約 20% の細胞数増加が見られた。遊走活性は modified Boyden's chamber 法にて評価した。100ng/ml のレプチンで、約 3 倍の遊走活性亢進がみられた。

3. レプチンによる血管平滑筋細胞の増殖、遊走活性亢進のメカニズムを明らかにするため、レプチンにより誘導されるシグナル伝達経路について調べた。SDS-PAGE を用いて VSMC における細胞内蛋白のチロシンリン酸化反応を抗リン酸化チロシン抗体を用いて調べたところ、レプチン刺激 10 分後に分子量 44kDa、42kDa のタンパクにチロシンリン酸化が認められた。Epidermal growth factor (EGF)で刺激したところ同様の反応が見られ、EGF 刺激でチロシンリン酸化が見られる 44kDa、42kDa のタンパクは MAP キナーゼである事が知られている事より、今回のレプチン刺激でチロシンリン酸化が見られた 44kDa、42kDa のタンパクは MAP キナーゼであると考えられた。

4. レプチン刺激による血管平滑筋細胞における MAP キナーゼのリン酸化と活性亢進の time course について検討した。MAP キナーゼのリン酸化については、western blot 法による p44、p42MAP キナーゼの泳動度の遅延による band の上方へのシフトで、また MAP キナーゼの活性はミエリン塩基性蛋白を基質とした in-gel kinase assay にて測定した。

レプチン刺激により、10 分を peak として MAP キナーゼのリン酸化、活性亢進がみられ、60 分でほぼ baseline まで低下した。

5. レプチン刺激による血管平滑筋細胞における PI3 キナーゼ活性への影響を検討した。PI3 キナーゼ活性は細胞抽出液を抗リン酸化チロシン抗体にて免疫沈降し、phosphatidylinositol を基質として測定した。レプチン刺激により、5 分後に約 14 倍の活性亢進がみられ、その亢進は 20 分後まで持続した。

6. これまでの報告で、PI3 キナーゼが種々の agonist による細胞の遊走に重要な役割をもつとされていることから、レプチンによる血管平滑筋細胞の遊走に対する PI3 キナーゼ阻害剤の効果について調べた。レプチン刺激は 100ng/ml で行い、100nM wortmannin、あるいは 100 μ M LY294002 により、レプチンによる血管平滑筋細胞の遊走は完全に抑制された。

【考察】

血管平滑筋細胞において short form タイプのレプチン受容体蛋白の発現を認めた。レプチンは濃度依存的に血管平滑筋細胞の増殖を促進し、MAP キナーゼのリン酸化と活性の亢進を伴っていた。PI3 キナーゼ活性の亢進はレプチン刺激によって生じ、レプチンの平滑筋細胞遊走亢進作用は PI3 キナーゼ inhibitor の wortmannin と LY294002 で抑制された。

【総括】

血管平滑筋細胞はレプチン受容体を発現しており、レプチンが血管平滑筋細胞に対し増殖、遊走を誘導したことから動脈硬化やバルーン血管形成術後の内膜肥厚において重要な役割を果たしていることが示唆された。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 1902 号	氏 名	小田 明彦
論文題目	LEPTIN STIMULATES RAT AORTIC SMOOTH MUSCLE CELL PROLIFERATION AND MIGRATION 「レプチン刺激によるラット大動脈由来血管平滑筋細胞の増殖と遊走」		
審査委員	主 査 柳山 孝 副 査 山 村 裕 平 副 査 春日 雅人		
審査修了日	平成 16 年 1 月 9 日		

（要旨は 1,000 字～2,000 字程度）

ob 遺伝子産物であるレプチンは摂食行動とエネルギー代謝の調節因子である事が示されている。レプチン受容体は少なくとも5種類の存在が知られており、その内、下垂体に存在する long form タイプの受容体は摂食行動の調節に関わっている事が知られているが、short form タイプの受容体は体内に広く存在しており、摂食行動や体重調節以外に何らかの役割を果たしている可能性が示唆される。

肥満は心血管疾患の危険因子であり、肥満患者では血漿レプチン濃度の上昇が報告されている。血管細胞においては、レプチンの内皮細胞増殖効果と血管新生の誘導が報告されている。しかし、レプチンの血管平滑筋細胞に対する影響と、血管平滑筋細胞におけるレプチン受容体の発現については未知である。今回我々は血管平滑筋細胞におけるレプチン受容体の発現とレプチン刺激による血管平滑筋細胞の機能への影響について調べた。

以下の結果を得た。

1. まず、血管平滑筋細胞におけるレプチン受容体の発現について調べた。

細胞はラット胸部大動脈由来の培養平滑筋細胞を用い、レプチン受容体蛋白の発現は抗ラットレプチン受容体抗体を用いた western blot 法にて検出した。レプチン受容体は3本のバンドとして検出され、分子量は約130、80、78kDaであった。約130kDaのバンドは short form タイプのレプチン受容体であると考えられた。

2. レプチンの血管平滑筋細胞の増殖と遊走に対する影響について調べた。レプチン蛋白はヒト脂肪組織より RT-PCR 法にて得たレプチン cDNA を transform した大腸菌から精製して用いた。2%FBS、ITS(insulin, transferrin, selenium)存在下に種々の濃度(0-100ng/ml)のレプチンにて3日間培養した後、細胞数を crystal violet 染色法で評価した。レプチンは濃度依存性に血管平滑筋細胞増殖を促進し、その効果は100ng/mlで最大であり、約20%の細胞数増加が見られた。遊走活性は modified Boyden's chamber 法にて評価した。100ng/mlのレプチンで約3倍の遊走活性亢進がみられた。

3. レプチンの血管平滑筋細胞の増殖、遊走活性亢進のメカニズムを明らかにするため、レプチンにより活性化されるシグナル伝達経路について調べた。SDS-PAGE を用いて血管平滑筋細胞における細胞内蛋白のチロシンリン酸化反応を抗リン酸化チロシン抗体を用いて調べたところ、レプチン刺激10分後に分子量44kDa、42kDaのタンパクに

チロシンリン酸化が認められた。今回のレプチン刺激でチロシンリン酸化が見られた44kDa、42kDaのタンパクはMAPキナーゼであると考えられた。

4. レプチン刺激による血管平滑筋細胞におけるMAPキナーゼのリン酸化と活性亢進のtime courseについて検討した。MAPキナーゼのリン酸化については、western blot 法によるp44、p42MAPキナーゼの泳動度の遅延によるbandの上方へのシフトで、またMAPキナーゼの活性はミエリン塩基性蛋白を基質としたin-gel kinase assayにて測定した。レプチン刺激により10分をpeakとしてMAPキナーゼのリン酸化と活性亢進がみられ、60分ではほぼbaselineまで低下した。

5. レプチン刺激による血管平滑筋細胞におけるPI3キナーゼ活性への影響を検討した。PI3キナーゼ活性は細胞抽出液を抗リン酸化チロシン抗体にて免疫沈降し、phosphatidylinositolを基質として測定した。レプチン刺激により5分後に約14倍の活性亢進がみられ、その亢進は20分後まで持続した。

6. レプチン刺激による血管平滑筋細胞の遊走に対するPI3キナーゼ阻害剤の効果について調べた。レプチン刺激は100ng/mlで行い、100nM wortmanninあるいは100μM LY294002によりレプチンによる血管平滑筋細胞の遊走は完全に抑制された。

本研究は血管平滑筋細胞におけるレプチン受容体の発現とレプチン刺激の細胞機能への影響について研究したものである。その結果、血管平滑筋細胞においてshort formタイプのレプチン受容体蛋白の発現を認めた。レプチン刺激による血管平滑筋細胞の増殖促進作用はMAPキナーゼのリン酸化と活性の亢進を伴っていた。レプチン刺激による平滑筋細胞の遊走亢進作用はPI3キナーゼ活性亢進を伴い、PI3キナーゼ阻害剤で抑制された。従って、従来知られていなかった血管平滑筋細胞はレプチン受容体を発現しており、レプチンが血管平滑筋細胞に対し増殖、遊走を誘導したことから動脈硬化やバルーン血管形成術後の内膜肥厚において重要な役割を果たしていることが示唆されるといふ重要な知見が得られ価値ある集積であると認める。よって、本研究は博士(医学)の学位を得る資格があると認める。