



# Chylomicron remnants induce monocyte chemoattractant protein-1 expression via p38 MAPK activation in vascular smooth muscle cells

堂本, 康治

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-05-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2762

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002762>

※ 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。



【 189 】

氏 名・(本 籍) 堂本 康治 (兵庫県)  
博士の専攻分野の名称 博士(医学)  
学 位 記 番 号 博ろ第1920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5月12日

【 学位論文題目 】

Chylomicron remnants induce monocyte chemoattractant  
protein-1 expression via p38 MAPK activation  
in vascular smooth muscle cells  
(カイルロミクロンレムナントは血管平滑筋細胞において  
p38MAPK の活性化を介して MCP-1 の分泌を誘導する)

審 査 委 員

主 査 教 授 春日 雅人  
教 授 山村 博平  
教 授 秋田 穂束

## (緒言)

食後高脂血症と冠動脈疾患との関連性は以前から指摘されている。食後高脂血症における動脈硬化惹起性のリポ蛋白としてカイロミクロンレムナント（以下レムナント）が注目されている。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、レムナントと呼ばれるリポ蛋白になる。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。レムナントは変性を受けずにマクロファージの泡沫化をきたす。レムナントは正常では数分から数時間で肝臓に取り込まれるが、耐糖能異常や III 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と考えられる。これまでレムナントの精製が困難であるため、直接的な血管平滑筋細胞に対する作用はほとんど解明されていない。一方、MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) は、内皮細胞をはじめ平滑筋細胞や単球等様々な細胞から分泌される単球の走化活性化因子であるが、血液中の単球を内皮下へ遊走させ、その結果マクロファージへの分化、泡沫化につながるにより、動脈硬化巣形成に重要な役割を果たす。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機序解明のため、レムナントが血管平滑筋細胞の MCP-1 分泌に及ぼす影響を検討した。

## (方法)

雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットの胃瘻より卵黄液を持続投与し、回収したリンパ液から超遠心法を用いてカイロミクロンを精製した。得られたカイロミクロンを、機能的肝切除状態にしたラットに静脈投与し、3 時間後に血液を回収し超遠心法でレムナントを精製した。血管平滑筋細胞は SD ラット大動脈から酵素処理により得て、6-18 代の継体培養で準備した。レムナントの細胞生存性に与える影響はラット血管平滑筋細胞に対して 24 時間刺激を行った後、WST-1 を用いて無刺激群に対する割合で示した。MCP-1 の細胞上清中への分泌は ELISA 法、mRNA 発現はノーザンブロット法を用いて検討した。また、p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) と extracellular signal-regulated kinase

(ERK1/2) の活性化はそれぞれの特異的抗体を用いてウェスタンブロット法にて検討した。

## (結果)

レムナントの濃度を 0.1 から 10  $\mu$ g/ml まで変化させ、24 時間後 WST-1 を用いて血管平滑筋細胞の生存性の検討を行った。5  $\mu$ g/ml 以上で生細胞数の減少が認められたため実験には 1  $\mu$ g/ml までの濃度を使用した。まず、レムナント 1  $\mu$ g/ml の刺激による血管平滑筋細胞での MCP-1 の mRNA 発現と蛋白分泌の経時的変化を検討した。mRNA の発現は 3 時間を最大として以後漸減が認められた。また、培養上清中への MCP-1 分泌は 24 時間まで経時的に上昇した。また、3 時間後の mRNA 発現、24 時間後の MCP-1 分泌で検討したところ、共に濃度依存性の増加を示した。

レムナント刺激による p38MAPK と ERK1/2 の活性化を検討した。p38MAPK は刺激後 2 分より活性化が認められ、5 分後に最大となり以後漸減した。また、ERK1/2 の活性化に関しては 5 分後に最大となり、以後漸減した。次に、それぞれの特異的阻害剤を用いてレムナント刺激による p38MAPK および ERK1/2 の活性化抑制と MCP-1 発現の影響を検討した。p38MAPK の特異的阻害剤である SB203580 と SB202190 による処置をレムナント刺激 30 分前に血管平滑筋細胞に行い、その影響をレムナント刺激 3 時間後の MCP-1 mRNA の発現と 24 時間後の MCP-1 分泌で検討したところ、共に濃度依存性の抑制効果が認められた。MEK の阻害剤である PD98059 には抑制効果は認められなかった。また、酸化させた低比重リポ蛋白(酸化 LDL)、酸化 LDL やレムナントに含まれるリゾフォスファチジルコリン (LPC)、インターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) を用いて血管平滑筋細胞における 24 時間後の MCP-1 分泌を比較検討したところ、レムナントは酸化 LDL や LPC よりも強く、IL-1 $\beta$  に匹敵する MCP-1 の発現刺激因子であることが認められた。

## (考察)

本研究でラット由来のレムナントは直接的に血管平滑筋細胞の MCP-1 の mRNA 発現と蛋白分泌を促進することを明らかにし、その作用はこれまで報告のあるリゾフォスファチジルコリンや酸化 LDL よりも強いことを示した。中膜平滑筋は動脈硬化病変形成過程で中膜から内膜に侵入増殖する。内膜下に侵

入したレムナントは脂質を供給するのみならず、平滑筋細胞を介して単球を走化活性化させて動脈硬化進展にはたらくことが示唆された。この研究はこれまで十分には検討されていなかった食後高脂血症の動脈硬化症を引き起こす機序の一端を明らかにした。MCP-1 の発現機序に関して p38MAPK の関与が明らかとなったが、阻害剤によって完全な抑制は認められず他の刺激伝達系の関与の存在が示唆され、今後の更なる研究が必要と考えられた。さらに、レムナントの組成の検討を進め、MCP-1 発現をになう成分の検討を行うことも重要であると考えられた。

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1922 号	氏 名	堂本 康治
論文題目	<p>Chylomicron remnants induce monocyte chemoattractant protein-1 expression via p38 MAPK activation in vascular smooth muscle cells</p> <p>カイロミクロンレムナントは血管平滑筋細胞において p38MAPK の活性化を介して MCP-1 の分泌を誘導する</p>		
審査委員	<p>主 査 春日 雅人</p> <p>副 査 山下 裕平</p> <p>副 査 沢田 純一</p>		
審査終了日	平成 16 年 4 月 27 日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

本研究は、食後高脂血症における動脈硬化惹起性のリポ蛋白としてカイロミクロンレムナント（レムナント）の血管平滑筋細胞に対する作用及びその機序を研究したものである。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は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、レムナントと呼ばれるリポ蛋白に変化する。レムナントの精製が困難であるため、これまで血管平滑筋細胞に対する直接的な作用はほとんど解明されていない。一方、MCP-1（monocyte chemoattractant protein-1）は、内皮細胞をはじめ平滑筋細胞や単球等様々な細胞から分泌される単球の走化活性化因子であり、血液中の単球を内皮下へ遊走させる。その結果マクロファージへの分化、泡沫化につながり動脈硬化巣形成に重要な役割を果たしている。本研究では食後高脂血症における動脈硬化の発症進展の機序解明のため、レムナントによる血管平滑筋細胞における MCP-1 分泌に及ぼす影響を検討している。その方法は、雄性 Sprague-Dawley ラットの胃瘻より卵黄液を持続投与し、回収したリンパ液から超遠心法を用いてカイロミクロンを精製し、得られたカイロミクロンを機能的肝切除状態にしたラットに静脈投与し 3 時間後に血液を回収しゲルフィルトレーションクロマトグラフィー及び超遠心法によりレムナントを精製している。得られたレムナントを血管平滑筋細胞に負荷し、MCP-1 の細胞上清中への分泌は ELISA 法を、mRNA 発現はノーザンブロット法を用いて検討し、p38 mitogen-activated protein kinase（MAPK）の活性化は特異的抗体を用いウェスタンブロット法により検討している。その結果、血管平滑筋細胞においてレムナント刺激による MCP-1 mRNA 発現及び MCP-1 分泌が確認されている。加え、p38MAPK の活性化が確認され、p38MAPK の特異的阻害剤である SB203580 と SB202190 による前処置により MCP-1 mRNA の発現及び MCP-1 分泌に対する抑制効果が認められている。以上のごとく、レムナントは血管平滑筋細胞の MCP-1 の mRNA 発現と蛋白分泌を一部 p38MAPK の活性化を介し促進することが明らかにされている。内膜下に侵入したレムナントは脂質を供給するのみならず、血管平滑筋細胞を介して単球を走化活性化させて動脈硬化進展にはたらくことが示唆された。

本研究はレムナントの血管平滑筋細胞に対する作用とその機序を研究したものであるが、従来ほとんど行われていなかった食後高脂血症の動脈硬化症を引き起こす機序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）の学位を得る価値があると認める。