Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Shear Stress Enhances Glutathione Peroxidase Expression inEndotherial Cells

竹下，佐織

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2006-05-10
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙2885
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002885

※ 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。

【 176 】

氏　　名・（本　籍）	竹下　佐織	（　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1975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5月10日	

【 学位論文題目 】

Shear Stress Enhances Glutathione Peroxidase Expression in Endotherial Cells
（内皮細胞におけるずり応力によるグルタチオンペルオキシダーゼ発現増強効果）

審　査　委　員

主 査　教　授　西尾　久英
教　授　錦織　千佳子
教　授　秋田　穂束

［緒言］

血管壁の恒常性を保つためには、ずり応力(shear stress)や伸展張力(stretch force)などの血行力学的応力が重要な役割を担っている。動脈硬化病変はずり応力の低下した部位や乱流をきたす部位に好発する。また、ずり応力は内皮依存性に血管のトーヌス調節や抗血栓活性、血管平滑筋の増殖制御、白血球や単球の遊走などの調節を行い、抗動脈硬化作用を示すと考えられている。一方、伸展張力は血管平滑筋に対して細胞増殖作用、形質転換、LDL の酸化的修飾やスーパーオキサイドの産生刺激をきたし、これらは動脈硬化を促進させる作用と考えられる。

活性酸素産生系と消去系の不均衡によって生じる酸化ストレスは、動脈硬化の進展に深く関わっている。生理的ずり応力は血管内皮細胞において強力な抗酸化酵素である Cu/Zn-SOD と Mn-SOD の発現を増強することが報告されている。これらの抗酸化酵素の発現増強は、血管壁に対する生理的ずり応力の保護作用を示している。SOD はスーパーオキサイド(O_2^-)を H_2O_2 に代謝する酵素であるが、H_2O_2 もまた血管平滑筋の増殖促進や血管内皮細胞の接着分子の活性化などの動脈硬促進作用を持っている。それゆえに H_2O_2 に対する防御機構は酸化ストレスの減弱に重要と考えられる。H_2O_2 は グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx) やカタラーゼにより H_2O に還元される。GPx はセレン含有酵素で多くの細胞に分布しており、H_2O_2 ばかりでなく過酸化脂質も分解し細胞内のアンチオキシダントとして重要である。GPx は 5 つのアイソザイムが同定されているが、GPx-1 は多くの細胞に発現し、H_2O_2 や過酸化脂質に対する防御に中心的な役割を担っている。

動脈硬化の進展機構を明らかにするために、血行力学的応力によるアンチオキシダントの調節機構を検討することは重要と考えられる。本研究では、ウシ大動脈血管内皮細胞を用いてずり応力や伸展張力が GPx-1 の発現に及ぼす効果を検討した。

［方法］

継代培養したウシ大動脈内皮細胞(BAEC、6～12 代)を用い、層流流れ負荷（ずり応力負荷）と伸展張力負荷をかけた。平行平板型流れ負荷は、平らなディッシュに BAEC を培養し、0.02cm の距離を開けた平行に並べた 2 枚の平板の間に pH を調整した培養液を潅流し行った。ポンプを用いて潅流液の速度を変更することでずり応力を調整した。BAEC に動脈レベルの 20 dynes/cm^2 と静脈レベルの 5 dynes/cm^2 のずり応力を負荷し、対照には同条件で静置したものを用いた。20 dynes/cm^2 のずり応力を 12 時間以上負荷すると内皮細胞は細長く、長軸を流れの

方向と平行に配列する形態変化をきたした。形態変化は 5 dynes/cm^2 のずり応力負荷では生じなかった。また、伸展張力負荷はラミニンでコーティングしたシリコン膜に BAEC を培養し、初期長の 10%、20%の一方向の伸展刺激をかけた。すべての培養液には 50nM のセレンを加えた。

RT-PCR 法を用いて BAEC から Bovine GPx-1 の cDNA プローベを作成した。各負荷後、RNA を抽出しノーザンブロット解析により mRNA の発現を測定した。

GPx 酵素活性は、GPx の作用により還元型グルタチオンが酸化型グルタチオン(GSSG)に酸化されると直ちに NADPH とグルタチオンレダクターゼにより GSSG が還元されることを用い、NADPH の消費を GPx の反応による GSSG 生成とみなした。NADPH の消費は酸化による 340nm の吸光度の減少により測定した。

［結果］

1. ずり応力の GPx-1 遺伝子発現に対する効果

BAEC において動脈レベルのずり応力負荷（20 dynes/cm^2）により時間依存性に GPx-1 mRNA レベルは増強し、24 時間で 2.1±0.16 倍（vs. control）に増強した。また、静脈レベルのずり応力負荷（5 dynes/cm^2、24 時間）では GPx-1 mRNA レベルの有意な増強は認められなかった。

2. ずり応力の GPx 酵素活性に対する効果

ずり応力負荷（20 dynes/cm^2、24 時間）により BAEC における GPx 酵素活性は 1.52±0.16 倍（vs. control）に増加した。

3. 伸展張力の GPx-1 遺伝子発現に対する効果

BAEC において 10%と 20%の伸展刺激（24 時間）により GPx-1 mRNA レベルに有意な変化は認められなかった。

4. ずり応力の GPx-1 遺伝子発現増強に対する一酸化窒素（NO）の影響

ずり応力により内皮細胞の内皮型 NO 合成酵素（ecNOS）が発現増強し、NO が産生されることが知られている。ずり応力による GPx-1 遺伝子発現増強に NO 産生が関与するかどうかを検討するために NOS 阻害剤である L-NAME(1mM)を用いた。L-NAME 処置はずり応力（20 dynes/cm^2、24 時間）による GPx-1 遺伝子発現に影響を及ぼさなかった。

［考察］

本研究では生理的な動脈レベルのずり応力により内皮細胞の GPx-1 遺伝子発現増強と酵素活性増加をきたすことが示された。一方、伸展張力は有意な変化を来たさなかった。O_2^-、H_2O_2 やヒドロキシラジカルは血管壁の酸化ストレスとな

り動脈硬化を進展させることが知られている。GPx は H_2O_2 やヒドロキシラジカルを消去するが、ヒトの動脈硬化プラークでは GPx 活性が著明に低下しているという報告があり、GPx は動脈硬化形成に対して抑制的に働く重要な酵素であると考えられる。一方、ずり応力に関しては、病理学的な検討から低レベルのずり応力にさらされた部分は高レベルの部分よりも動脈硬化が進行しやすいことが知られている。また、血管内皮細胞においてずり応力によりさまざまな遺伝子発現の変動が生じることが示されており、ecNOS、C-type natriuretic peptide、Cu/Zn SOD などの抗動脈硬化的、抗酸化的な遺伝子の発現を増強する。本研究では生理的動脈レベルのずり応力が持続的に GPx-1 の遺伝子発現を増強することが示されたが、低レベルのずり応力では増強しなかった。これらの所見から、高レベルのずり応力を保つことにより血管壁の抗酸化状態を保っており、低レベルのずり応力の部分では GPx 産生低下により酸化ストレスが増大し動脈硬化が進行しやすくなる可能性がある。また、伸展刺激では GPx-1 遺伝子発現に影響はなかったが、伸展刺激により血管細胞の O_2^- 産生を増加させることをあわせて考慮すると活性酸素産生系と消去系の不均衡が生じて血管病変の病因となる可能性がある。

ずり応力による遺伝子発現調節機構に関していくつかのメカニズムが報告されている。PDGF-B 鎖遺伝子に関しては、ずり応力応答配列(SSRE)と呼ばれる塩基配列 GAGACC に NFκ-B が結合しプロモーター活性を上昇すると報告されている。また一方、ずり応力による MCP-1 の遺伝子発現に AP-1 の活性化が示されている。GPx-1 の遺伝子にはプロモーター領域には SSRE、イントロンには AP-1 の塩基配列が存在することから、転写レベルでの発現増強の可能性が考えられる。ずり応力による GPx-1 遺伝子増強の分子機構の解明には、今後の検討が必要である。

［まとめ］

ずり応力により内皮細胞のグルタチオンペルオキシダーゼ（GPx-1）遺伝子発現増強と酵素活性増加が認められた。GPx のアンチオキシダントとしての重要性を考慮すると、ずり応力による GPx の発現増強はずり応力の抗動脈硬化作用のメカニズムに重要な役割を果たしていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

受付番号	乙 第 1977 号	氏 名	竹下 佐織
論文題目 Title of Dissertation	Shear Stress Enhances Glutathione Peroxidase Expression in Endotherial Cells 内皮細胞におけるずり応力によるグルタチオンペルオキシダーゼ発現増強効果		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 西尾久英 副査 Vice-examiner 錦織千佳子 副査 Vice-examiner 秋田穂束		
審査終了日	平成 18 年 4 月 19 日		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

[緒言]

血管壁の恒常性を保つためには、ずり応力(shear stress)や伸展張力(stretch force)などの血行力学的応力が重要な役割を担っている。動脈硬化病変はずり応力の低下した部位や乱流をきたす部位に好発する。また、ずり応力は内皮依存性に血管のトーヌス調節や流血栓活性、血管平滑筋の増殖制御、白血球や単球の遊走などの調節を行い、抗動脈硬化作用を示すと考えられている。一方、伸展張力は血管平滑筋に対して細胞増殖作用、形質転換、LDL の酸化的修飾やスーパーオキサイドの産生刺激をきたし、これらは動脈硬化を促進させる作用と考えられる。

活性酸素産生系と消去系の不均衡によって生じる酸化ストレスは、動脈硬化の進展に深く関わっている。生理的ずり応力は血管内皮細胞において強力な抗酸化酵素である Cu/Zn-SOD と Mn-SOD の発現を増強することが報告されている。これらの抗酸化酵素の発現増強は、血管壁に対する生理的ずり応力の保護作用を示している。SOD はスーパーオキサイド(O_2^-)を H_2O_2 に代謝する酵素であるが、H_2O_2 もまた血管平滑筋の増殖促進や血管内皮細胞の接着分子の活性化などの動脈硬促進作用を持っている。それゆえに H_2O_2 に対する防御機構は酸化ストレスの減弱に重要と考えられる。H_2O_2 はグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)やカタラーゼにより H_2O に還元される。GPx はセレン含有酵素で多くの細胞に分布しており、H_2O_2 ばかりでなく過酸化脂質も分解し細胞内のアンチオキシダントとして重要である。GPx は 5 つのアイソザイムが同定されているが、GPx-1 は多くの細胞に発現し、H_2O_2 や過酸化脂質に対する防御に中心的な役割を担っている。

動脈硬化の進展機構を明らかにするために、血行力学的応力によるアンチオキシダントの調節機構を検討することは重要と考えられる。本研究では、ウシ大動脈血管内皮細胞を用いてずり応力や伸展張力が GPx-1 の発現に及ぼす効果を検討した。

[方法]

継代培養したウシ大動脈内皮細胞(BAEC、6～12 代)を用い、層流流れ負荷(ずり応力負荷)と伸展張力負荷をかけた。平行平板型流れ負荷は、平らなディッシュに BAEC を培養し、0.02cm の距離を開けた平行に並べた 2 枚の平板の間に pH を調整した培養液を海流し行った。ポンプを用いて海流液の速度を変更することですり応力を調整した。BAEC に動脈レベルの 20 dynes/cm^2 と静脈レベルの 5 dynes/cm^2 のずり応力を負荷し、対照には同条件で静置したものを用いた。20 dynes/cm^2 のずり応力を 12 時間以上負荷すると内皮細胞は細長く、長軸を流れの方向と平行に配列する形態変化をきたした。形態変化は 5 dynes/cm^2 のずり応力

負荷では生じなかった。また、伸展張力負荷はラミニンでコーティングしたシリコン膜に BAEC を培養し、初期長の 10%、20%の一方向の伸展刺激をかけた。すべての培養液には 50nM のセレンを加えた。

RT-PCR 法を用いて BAEC から Bovine GPx-1 の cDNA プローベを作成した。各負荷後、RNA を抽出しノーザンプロット解析により mRNA の発現を測定した。

GPx 酵素活性は、GPx の作用により還元型グルタチオンが酸化型グルタチオン(GSSG)に酸化されると直ちに NADPH とグルタチオンレダクターゼにより GSSG が還元されることを用い、NADPH の消費を GPx の反応による GSSG 生成とみなした。NADPH の消費は酸化による 340nm の吸光度の減少により測定した。

[結果]

1. ずり応力の GPx-1 遺伝子発現に対する効果

BAEC において動脈レベルのずり応力負荷(20 dynes/cm^2)により時間依存性に GPx-1 mRNA レベルは増強し、24 時間で 2.1±0.16 倍(vs. control)に増強した。また、静脈レベルのずり応力負荷(5 dynes/cm^2、24 時間)では GPx-1 mRNA レベルの有意な増強は認められなかった。

2. ずり応力の GPx 酵素活性に対する効果

ずり応力負荷(20 dynes/cm^2、24 時間)により BAEC における GPx 酵素活性は 1.52±0.16 倍(vs. control)に増加した。

3. 伸展張力の GPx-1 遺伝子発現に対する効果

BAEC において 10%と 20%の伸展刺激(24 時間)により GPx-1 mRNA レベルに有意な変化は認められなかった。

4. ずり応力の GPx-1 遺伝子発現増強に対する一酸化窒素(NO)の影響

ずり応力により内皮細胞の内皮型 NO 合成酵素(ecNOS)が発現増強し、NO が産生されることが知られている。ずり応力による GPx-1 遺伝子発現増強に NO 産生が関与するかどうかを検討するために NOS 阻害剤である L-NAME(1mM)を用いた。L-NAME 処置はずり応力(20 dynes/cm^2、24 時間)による GPx-1 遺伝子発現に影響を及ぼさなかった。

[考察]

本研究では生理的な動脈レベルのずり応力により内皮細胞の GPx-1 遺伝子発現増強と酵素活性増加をきたすことが示された。一方、伸展張力は有意な変化を来たさなかった。O_2^-、H_2O_2 やヒドロキシラジカルは血管壁の酸化ストレスとなり動脈硬化を進展させることが知られている。GPx は H_2O_2 やヒドロキシラジカルを

消去するが、ヒトの動脈硬化プラークではGPx活性が著明に低下しているという報告があり、GPxは動脈硬化形成に対して抑制的に働く重要な酵素であると考えられる。一方、ずり応力に関しては、病理学的な検討から低レベルのずり応力にさらされた部分は高レベルの部分よりも動脈硬化が進行しやすいことが知られている。また、血管内皮細胞においてずり応力によりさまざまな遺伝子発現の変動が生じることが示されており、ecNOS、C-type natriuretic peptide、Cu/ZnSODなどの抗動脈硬化的、抗酸化的な遺伝子の発現を増強する。本研究では生理的動脈レベルのずり応力が持続的に GPx-1 の遺伝子発現を増強することが示されたが、低レベルのずり応力では増強しなかった。これらの所見から、高レベルのずり応力を保つことにより血管壁の抗酸化状態を保っており、低レベルのずり応力の部分では GPx 産生低下により酸化ストレスが増大し動脈硬化が進行しやすくなる可能性がある。また、伸展刺激では GPx-1 遺伝子発現に影響はなかったが、伸展刺激により血管細胞の O_2^-産生を増加させることをあわせて考慮すると活性酸素産生系と消去系の不均衡が生じて血管病変の病因となる可能性がある。

ずり応力による遺伝子発現調節機構に関していくつかのメカニズムが報告されている。PDGF-B 鎖遺伝子に関しては、ずり応力応答配列(SSRE) と呼ばれる塩基配列 GAGACC に NFκ－B が結合しプロモーター活性を上昇すると報告されている。また一方、ずり応力による MCP-1 の遺伝子発現に AP-1 の活性化が示されている。GPx-1 の遺伝子にはプロモーター領域には SSRE、イントロンには AP-1 の塩基配列が存在することから、転写レベルでの発現増強の可能性が考えられる。ずり応力による GPx-1 遺伝子増強の分子機構の解明には、今後の検討が必要である。

[まとめ]

ずり応力により内皮細胞のグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx-1)遺伝子発現増強と酵素活性増加が認められた。GPx のアンチオキシダントとしての重要性を考慮すると、ずり応力による GPx の発現増強はずり応力の抗動脈硬化作用のメカニズムに重要な役割を果たしていると考えられる。

本研究は、血管細胞内皮細胞に負荷されたずり応力について、その効果をグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx-1)遺伝子発現誘導および酵素活性増強の側面から研究したものであるが、従来報告されていない「ずり応力により誘導された GPx 酵素が抗動脈硬化作用を発揮する」可能性を示唆する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。