Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2026-04-06

Chylomicron remnants regulate early growth response factor-1in vascular smooth muscle cells

高橋, 裕子

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2007-02-14
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙2924
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002924

※ 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。

【 183 】

氏　　名・（本　籍）　　高橋　裕子　　（　大阪府　）

博士の専攻分野の名称　　博士（医学）

学　位　記　番　号　　博ろ第2000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2月14日

【 学位論文題目 】

Chylomicron remnants regulate early growth response factor-1
in vascular smooth muscle cells
（カイロミクロンレムナントは血管平滑筋細胞におけるEarly Growth
Response Factor-1の発現を制御する）

審　査　委　員

主 査　教　授　秋田　穂束
　　　　教　授　中村　俊一
　　　　教　授　熊谷　俊一

＜緒言＞

高トリグリセリド（TG）血症は TG に富むリポ蛋白が増加する病態であり、近年心血管病変の独立した危険因子であると考えられるようになった。その中でカイロミクロンレムナント（以下レムナント）は、食後高脂血症における主要なリポ蛋白で、強い粥状硬化惹起性を持つとされている。食事由来のカイロミクロンにおいて、リポ蛋白リパーゼの働きによってその粒子中の TG が加水分解されて減少し、コレステロールエステル転送蛋白の作用によって他のリポ蛋白からコレステロールエステルが供給されたものがレムナントであり、小粒子になっているため血管壁内に侵入できる。正常では食後数分から数時間で肝臓に取り込まれるが、耐糖能異常、複合型高脂血症やメタボリックシンドロームでは血中に長時間停滞し、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。これまで我々はレムナントが変性を受けずにマクロファージの泡沫化をきたすことや様々な炎症や免疫反応に関与する CD40 発現を亢進すること、血管内皮細胞において低濃度では plasminogen activator inhibitor-1 の分泌を亢進し、高濃度ではアポトーシスを誘導すること、血管平滑筋細胞（VSMCs）において monocyte chemoattractant protein-1（MCP-1）の分泌を亢進することを報告し、動脈硬化発症におけるレムナントの重要性を明らかにしてきた。

近年、Zinc-finger 構造を持つ転写因子である Early growth response factor-1（以下 Egr-1）が細胞増殖因子、サイトカイン、低酸素状態、シェアストレスを含む様々な刺激により誘導され、一方 Egr-1 が動脈硬化巣の形成に関与する様々な遺伝子を誘導することが報告されている。ヒトの頚動脈硬化巣において Egr-1

の発現は隣接する中膜より 5 倍増加しており、動脈硬化巣において免疫染色を用いた解析で Egr-1 の発現はマクロファージが多く遊走している部分の VSMCs や内皮細胞において強く見られたなどの報告がある。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更なる機序解明のため、レムナントが VSMCs における Egr-1 発現に及ぼす影響について検討した。

＜方法＞

雄性ラットの胃瘻より 10%の卵黄液を持続注入し、回収したリンパ液から超遠心法によりカイロミクロンを精製した。次に機能的肝切除術を施行したラットにカイロミクロンを静脈注入し、3 時間後血液を回収し超遠心法によりレムナントを精製した。VSMCs はラット大動脈から酵素法によって得た細胞を継代培養して実験に供した。VSMCs をレムナントで刺激して、Egr-1 mRNA の発現をノザンブロット法で検討した。さらに Egr-1 蛋白の発現をウエスタンブロット法で検討した。extracellular signal-regulated kinase（ERK1/2）、p38 mitogen-activated protein kinase（MAPK）、c-Jun N-terminal kinase（JNK）のリン酸化はそれぞれ特異的リン酸化抗体を使用しウエスタンブロット法で調べた。また MAPK kinase（MEK）阻害剤である PD98059 と p38 MAPK 阻害剤である SB202190 と SB203580 をそれぞれ前処置し、これら薬剤の Egr-1 の mRNA および蛋白発現への影響を調べた。レムナント刺激により誘導される Egr-1 のターゲット遺伝子発現の変化は RNAase プロテクションアッセイ法で RiboQuant kit（Interleukin（IL）-1α、-1β、-2、-3、-4、-5、-6、-10、TNF-α、TNF-β、IFN-γを含む）を用い解析した。

＜結果＞

0―1 μg/ml のレムナントで 30 分 VSMC を刺激したところ、0.1μg/ml の濃度で Egr-1mRNA 発現が最大になった。0 分から刺激後 180 分までの間で、レムナント 0.1 μg/ml の濃度では 15 分後より Egr-1mRNA が発現し、30 分後に発現が最大になった。Egr-1 蛋白の発現もレムナント 0.1 μg/ml の濃度で最大になり、刺激 3 時間後最大になった。レムナント刺激により ERK1/2 と p38MAPK のリン酸化が誘導されたが、JNK は誘導されなかった。また MEK の特異的阻害剤である PD98059 の前処置により Egr-1mRNA 及び Egr-1 蛋白の発現はレムナント無刺激のレベルまで抑制されたが、p38MAPK の特異的阻害剤である SB202190 及び SB203580 では抑制されなかった。一方、6 時間及び 12 時間のレムナント刺激で、IL-2mRNA と IFN-γ mRNA の発現が増加した。

＜考察＞

本研究でレムナントは VSMCs において Egr-1 発現を誘導することが明らかとなった。そしてレムナントは p38MAPK および ERK1/2 のリン酸化を誘導するものの、Egr-1 発現は p38MAPK ではなく MEK-ERK リン酸化経路に依存していることが分かった。これまでの様々な細胞や刺激を用いた報告で Egr-1 の発現には ERK、p38MAPK、JNK を含む MAPK の活性化を介することが認められており、以前の我々の検討においてレムナント刺激による VSMCs からの MCP-1 発現が p38MAPK 依存性であったことからも、ターゲットとなる発現物質によりリン酸化経路の違いがあると考えられる。

レムナントは様々なアポ蛋白やリン脂質、コレステロール、トリグリセリドを含む複合体である。これら成分のうち、何が Egr-1 の発現を誘導しているかは明らかでない。その成分の中で、lysophatidylcholine (LPC) と酸化リン脂質の両方が血管内皮細胞において Egr-1 発現を誘導した報告や、LPC が ERK1/2 の活性化を介し Egr-1 発現を誘導したとの報告があり、今後我々の実験系において確かめる必要がある。

一方、本研究において VSMCs においてレムナント刺激で IL-2 mRNA 及び IFN-γ mRNA の発現の増加が明らかになった。両者とも動脈硬化発症における炎症機転に重要な役割を持つとされており、Egr-1 により誘導されるとされるが、今後レムナント刺激および Egr-1 の発現調節から IL-2 及び IFN-γ 蛋白発現までの分子機序を解明する必要がある。

＜結論＞

レムナントは VSMCs において、ERK1/2 の活性化を介して転写因子 Egr-1 の mRNA および蛋白発現を誘導した。またレムナント刺激により IL-2 及び IFN-γ mRNA 発現の増加を認めた。

論文審査の結果の要旨

受付番号	乙　第　2003号	氏　　名	高橋　裕子
論文題目 Title of Dissertation	Chylomicron remnants regulate early growth response factor-1 in vascular smooth muscle cells カイロミクロンレムナントは血管平滑筋細胞における Early Growth Response Factor-1 の発現を制御する		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner　秋田穂束 副　査 Vice-examiner　中村俊一 副　査 Vice-examiner　熊谷俊一		
審査終了日	平成　19　年　1　月　17　日		

（要旨は1，０００字～2，０００字程度）

　近年、食後高脂血症が動脈硬化形成の重要な因子と注目されている。これは、血中にカイロミクロン(CM)及び、CMが血中にて代謝を受けたカイロミクロンレムナント(CR)の増加によるものであるが、その中でCRが、強い粥状硬化惹起性を持つと考えられる。CRは正常では食後数分から数時間で肝臓に取り込まれるが、耐糖能異常、複合型高脂血症やメタボリックシンドロームでは血中に長時間停滞し、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。

Early growth response gene-1(Egr-1) は細胞増殖因子、サイトカイン、シェアストレス等の細胞外刺激により迅速かつ一過性に誘導される Zinc-finger 構造を持つ転写因子である。様々な細胞で発現が見られ、PDGF、FGF、TGF-β、TNF-α 等多数の遺伝子の発現を制御する。血管障害後や動脈硬化病変の内皮細胞や平滑筋細胞において、Egr-1 及び Egr-1 により誘導される遺伝子群の発現の増加が見られた。また、Egr-1 ノックアウトマウスとアポ E ノックアウトマウスとの交配実験により、動脈硬化発生に重要である事が示された。本研究ではラット大動脈の培養血管平滑筋細胞(VSMC)を用い CR 刺激による Egr-1 の発現を検討した。

　本研究では CR は、ラットに脂肪食負荷して得られたリンパ液から精製した CM を門脈血流を遮断し機能的肝切除状態とした別のラットに静注し、3時間後に採血を行い超遠心法により精製した。CR 刺激による VSMC の Egr-1mRNA 発現を Northern Blot により、Egr-1 蛋白の発現及び ERK1/2、P38MAPK、JNK の活性化は Western Blot により検討した。また MEK 阻害剤である PD98059 と p38 MAPK 阻害剤である SB202190 と SB203580 を用い、Egr-1 の mRNA および蛋白発現への関与を調べた。CR 刺激により誘導される Egr-1 のターゲット遺伝子発現の変化は RNAase プロテクションアッセイにて RiboQuant kit(Interleukin (IL)-1α、-1β、-2、-3、-4、-5、-6、-10、TNF-α、TNF-β、IFN-γ を含む)を用い解析した。

CR 0-1 μg/ml で 30 分間 VSMC を刺激したところ、0.1μg/ml の濃度で Egr-1mRNA 発現が最大になった。0 分から刺激後 180 分までの間で、0.1 μg/ml の CR 濃度では 15 分後より Egr-1mRNA が発現し、30 分後に発現が最大になった。Egr-1 蛋白の発現も 0.1 μg/ml の CR で濃度で最大になり、刺激 3 時間後最大になった。CR 刺激により ERK1/2 と p38MAPK のリン酸化が誘導されたが、JNK は誘導されなかった。また MEK の特異的阻害剤である PD98059 の前処置により Egr-1mRNA 及び Egr-1 蛋白の発現は CR 無刺激のレベルまで抑制されたが、p38MAPK の特異的阻害剤である SB202190 及び SB203580 では抑制されなかった。一方、0.1 μg/ml の CR で刺激 6 時間及び 12 時間後に、IL-2mRNA と IFN-γmRNA の発現が増加した。

動脈硬化の形成機序は、障害反応仮説が広く受け入れられており、T リンパ球や Mφ が重要な役割を持つと考えられる。機序はまず、血管壁に対する外的ストレス等により内皮細胞が、接着因子を表面に発現させ、T リンパ球や Mφ が内皮細胞に接着し、血管壁に進入する。そこで Mφ は変性 LDL やレムナントを取り込み泡沫化し、リピッドコアの形成に働く。また T リンパ球や Mφ は、中膜平滑筋を刺激し形質転換を起こし、この形質転換した平滑筋が内膜へ遊走し増殖し、サイトカインや細胞外基質を合成・放出しリピッドコアを覆う線維性被膜を形成し、プラークを形成すると考えられている。IL-2 は、T 細胞から産生され、T 細胞自体の増殖や活性化に働き、IFN-γ は Mφ の活性化に働く。また IL-2、IFN-γ は共に、ヒトの動脈硬化巣において T リンパ球より分泌されプラークの形成に関与すると報告されている。CR は血管平滑筋細胞において Egr-1 の発現を誘導し、IL-2 及び IFN-γ の発現を介し動脈硬化病変形成に関与する可能性が考えられた。

本研究は、VSMC において CR の動脈硬化における役割を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった CR の精製を行い、CR 刺激により Egr-1 の発現が増加すること証明したこと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。