

学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	小 山 聡
<h3>学 位 論 文 題 目</h3> <p>虚血/再灌流負荷における CL-P1 発現の動態に関する研究</p> <p>北海道医学雑誌第 80 巻第 2 号掲載予定</p> <h3>研 究 目 的</h3> <p>一過性虚血/再灌流によって生じる酸化ストレスは、血管内皮および平滑筋に炎症機転をもたらし、血管内皮機能を低下させ、動脈硬化を発症させる有力な要因として指摘されている¹⁾。最近、若宮らによって発見された新規コレクチン CL-P1 はスカベンジャー受容体と類似の構造をとっており、血管内皮に恒常的に発現していて微生物の貪食に関わり、酸化 LDL や後期糖化終末産物と結合する能力をもつ²⁾。一方、別のスカベンジャー受容体である LOX-1 は、高血圧や高脂血症といった条件下で、あるいは炎症性サイトカインや酸化ストレスを誘発する負荷によりその発現が一過性に上昇する性質から、初期動脈硬化の進展に重要な役割を果たしていると推測されている³⁾。LOX-1 と同じ C 型レクチン構造を有する CL-P1 の機能や発現動態に関する情報は乏しく、生理的役割は不明である。そこで今回、一過性虚血/再灌流モデルにおける CL-P1 の動態を <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> の系を用いて LOX-1 と比較し、CL-P1 の血管における虚血性血管障害における意義を検討した。</p>			

材料・方法

1. 細胞および動物

細胞は ATCC から購入後に 3 回継代培養したヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)を使用した。培養液は Clontecs 社の血管内皮細胞用基礎培地を用いた。動物は三共ラボ(株)から購入した体重 250g の雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。

2. 低酸素/再酸素負荷および虚血/再灌流負荷

HUVECs の低酸素/再酸素負荷は、細胞が sub-confluent の状態で、培養皿を専用培養器内へ移し、5%CO₂, 95%N₂ ガスを専用培養器内に流入させ、低酸素状態を作成した。60 分後に通常の培養状態に戻し、再酸素化とした。頸動脈虚血/再灌流負荷は、吸入麻酔下にてラット右総頸動脈を露出し、内頸動脈分岐部および同部位から心臓側に約 1cm の部位の 2 箇所をクリップを用いて閉塞し、虚血とした。虚血 30 分後にクリップを外すことにより再灌流とした。免疫組織染色のために、ラットの安楽死後に血管を 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、患部血管を切除した。また、RNA 抽出のためにラットを同様に手術したあと、直接血管を採取した。

3. RT-PCR による CL-P1 mRNA 発現の評価

Total RNA の抽出は TRIZOL を用いて HUVECs および血管組織を溶解し、同社のプロトコールに従って RNA を分離した。逆転写反応で、total RNA を Oligo(dT)-adaptor primers により cDNA とし、それを鋳型として LA Taq polymerase (TaKaRa) 並びにラット CL-P1 および LOX-1 を検出するプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物はアガロースゲル上で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。内部標準にβ-actin と GAPDH を用いた。

4. ラット総頸動脈の免疫組織染色

総頸動脈は採取後直ちに脱水・固定・凍結処理を行い、クリオスタットを用いて 5 μm の厚さで環状切片を作成した。免疫反応は抗 CL-P1 抗体を用いて蛍光顕微鏡下で観察した。また、血管内皮マーカーの抗体である抗 von Willebrand factor (vWF) 抗体を用いて CL-P1 と vWF の 2 重染色を行った。

成 績

1. HUVECs の低酸素/再酸素化による検討

CL-P1 mRNA および LOX-1 mRNA は低酸素/再酸素化刺激により、コントロールに比して有意にその発現が上昇した。しかし LOX-1 は負荷直後より発現の上昇が認められ、負荷後 24 時間をピークに低下したのに対し、CL-P1 mRNA 発現の上昇は負荷後 72 時間よりはじまり、負荷後 120 時間でもなお、発現上昇の状態が続いていた。

2. ラット総頸動脈の虚血/再灌流による検討

ラット総頸動脈における CL-P1 mRNA は、虚血/再灌流負荷により、コントロールに比して 48 時間後から有意にその発現が上昇し、そのピークは 72 時間後であり、120 時間後もなお上昇していた。一方、LOX-1 mRNA は再灌流後 12 時間より上昇し、24 時間をピークに減少し、72 時間以降は検出閾値以下であった。虚血/再灌流におけるラット総頸動脈の免疫組織染色による検討では、CL-P1 は定常状態の血管においてその発現が認められ、血管の最内側に発現しており、中膜や外膜などの他の血管構造体には発現していなかった。vWF の抗体を用いて二重染色を行った結果、CL-P1 の染色部位は、vWF の染色部位と一致し、血管内皮特異的であった。CL-P1 の発現は虚血、再灌流 3 日後からその発現が顕著に増加した。また、再灌流後 7 日目において CL-P1 の発現増加はピークに達し、14 日目では 7 日目に比して減少した。

考 察

虚血/再灌流時における CL-P1 の発現を、*in vitro*, *in vivo* の系において検討した結果、CL-P1 は LOX-1 と同様にメッセンジャーレベルで変動することが明らかになった。LOX-1 は、血管内皮の機能低下や動脈硬化の進展、アポトーシス等に関与している可能性が報告されている。C レクチンの構造が LOX-1 と類似している CL-P1 は、その局在性や虚血/再灌流によって発現誘導がおこることから、LOX-1 と同様に動脈硬化に関わる可能性が推測される。今回の実

験で CL-P1 と LOX-1 の発現に関していくつかの相違点が明らかになった。第一に低酸素/再酸素化負荷に対する LOX-1 と CL-P1 の mRNA の発現誘導の時間差である。この結果は、CL-P1 と LOX-1 において、低酸素化/再酸素化負荷ストレスに対して発現誘導をおこすメカニズムの違いを示唆している。すなわち LOX-1 は直接的に誘導され、CL-P1 は複数の反応を経ていると推測される。In vivo においても CL-P1 mRNA の発現は負荷後から一定の時間を経て上昇しており、in vitro における CL-P1 mRNA の kinetics と類似していた。第二に、CL-P1 は定常状態においても総頸動脈の血管内皮に特異的に存在していた。LOX-1 は定常状態ではその発現が少なく、更に動脈硬化巣においては血管内皮以外にも、マクロファージや血管平滑筋に強く発現することが報告されている。これらの事実は CL-P1 と LOX-1 の組織特異的な発現調節が異なることを示唆している。CL-P1 は虚血/再灌流による低酸素/再酸素化負荷などのストレスによって、転写レベルから誘導される蛋白質の 1 つであり、その発現上昇に複数の因子が関与している可能性が推測された。このメカニズムは直接的に発現誘導がかかる LOX-1 とは異なっており、その局在の違いとも相まって、血管内皮における生理的役割について興味もたれる。

結 論

新規スカベンジャー受容体 CL-P1 は虚血/再灌流によって血管内皮における発現が誘導される。

引 用 文 献

- 1) Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; **340**: 115-126.
- 2) Ohtani K, Suzuki Y, Eda S, Kawai T, Kase T, Keshi H, Sakai Y, Fukuoh A, Sakamoto T, Itabe H, Suzutani T, Ogasawara M, Yoshida I, Wakamiya N. The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2001; **276**: 44222-44228.
- 3) Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, Masaki T. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 1997; **386**: 73-77.

参 考 論 文

参考論文 1

1. 題目

頸部交感神経系の局所脳循環自動調節に果たす役割（第2報）一側上頸神経節節後線維切断後慢性期の血圧上昇時の脳循環自動調節.

小山聡他6名と共著

2. 印刷公表の方法及び時期

脳循環代謝 1998; 10: 1-8.

参考論文 2

1. 題目

頸部交感神経系の局所脳循環自動調節に果たす役割（第1報）一側上頸神経節節後線維切断後慢性期の血圧低下時の脳循環自動調節.

小山聡他6名と共著

2. 印刷公表の方法及び時期

脈管学 1998; 38: 49-56.

参考論文 3

1. 題目

糖尿病患者における血中可溶性 E-selectin の検討. 小山聡他6名と共著

2. 印刷公表の方法及び時期

医療 1999; 54: 125-128.

参考論文 4

1. 題目

Plasma von willebrand factor activities in vascular parkinsonism: comparison with Parkinson's disease.

Koyama S, ほか 6 名と共著

2. 印刷公表の方法及び時期

J Stroke and Cerebrovascular diseases. 2001; 10: 227-230.

参考論文 5

1. 題目

Effects of right stellate ganglion block on the autonomic nervous function of the heart: a study using the head-up tilt test.

Koyama S, ほか 7 名と共著

2. 印刷公表の方法及び時期

Circ J. 2002; 66: 645-648.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	小山 聡
<p>審査委員長 若 宮 伸 隆 ㊞</p> <p>審査委員 菊 池 健 次 郎 ㊞</p> <p>審査委員 吉 田 成 孝 ㊞</p> <p>審査委員 谷 口 隆 信 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>虚血 / 再灌流負荷における CL-P1 発現の動態に関する研究</p>			
<p>動脈硬化症の発症には血管内皮細胞の機能障害や活性化が関与するとする Ross らの仮説が 1993 年に発表されて以来、高血圧や肥満、糖尿病などの危険因子とそれに対する血管内皮機能の恒常性維持機構に注目が集まっている。その際、虚血 / 再灌流は、血管内皮および平滑筋に炎症機転をもたらし、血管内皮機能を低下させ、動脈硬化を発症させる有力な要因として捉えられている。近年、大谷らによって発見された膜型コレクチン CL-P1 は、血管内皮細胞に特異的に存在し、酸化 LDL や AGE 化合物などに結合することや微生物をファゴサイトーシスすることが報告されている。さらに免疫組織染色や血管内皮細胞を用いた膜蛍光染色などの研究から、CL-P1 は常在型スカベンジャー受容体で、誘導型スカベンジャー受容体とはその発現形態が異なっていることが予備実験により明らかになっていた。</p> <p>本学位論文の目的は、既知の血管内皮発現型スカベンジャー受容体を比較材料として、虚血 / 再灌流負荷における CL-P1 発現の動態を検討することにより、CL-P1 の虚血性血管障害における意義を明らかにすることである。</p> <p>方法としては、in vitro の実験系では、ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC を用いて細胞レベルでの低酸素 / 再酸素負荷実験を行い、in vivo の実験系では、ラット</p>			

総頸動脈を一過性にクリップし虚血 / 再灌流状態を創出して、細胞や組織における CL-P1 mRNA や 蛋白を RT-PCR 法、Western Blot 法、組織免疫染色法などにより、既知のスカベンジャー受容体である LOX-1 との比較検討を行った。

結果としては、細胞レベルで、低酸素 / 再酸素負荷において CL-P1 は LOX-1 同様、mRNA の発現誘導が認められた。しかしながら LOX-1 は負荷直後から発現上昇が認められ、負荷後 24 時間が発現のピークでその後消退するのに対し、CL-P1 の発現上昇は負荷後 72 時間よりみられ、負荷後 120 時間でも高い発現が認められた。個体レベルでの虚血 / 再灌流負荷では、ラット総頸動脈における CL-P1 mRNA は、48 時間後よりその発現が上昇し、72 時間にピークを認め、120 時間でも高い発現が認められた。一方 LOX-1 mRNA は、12 時間から上昇を認め、24 時間をピークに減少し、72 時間以降は検出閾値以下であった。虚血 / 再灌流負荷における組織における CL-P1 発現は、高感度免疫組織染色法によって検討した。フォンウィルブランドファクター (vWF) 抗体を用いた 2 重染色により、負荷前の状態でも、CL-P1 はすでに血管内皮に存在し、常在型スカベンジャー受容体であることをラットの系で確認した。また免疫染色による CL-P1 の動態は、虚血 / 再灌流後 3 日から発現が上昇し、7 日でピークになり、14 日では減少していた。

これらの結果から、常在型スカベンジャー受容体と考えられていた CL-P1 は、特定の刺激で発現が上昇する、誘導型スカベンジャー受容体としての性質をもつことが明らかになった。さらに誘導型スカベンジャー受容体である LOX-1 は、動脈硬化の進展に関与する知見が多く蓄積しており、CL-P1 においても動脈硬化の進展に関与する可能性があることが推測された。また、CL-P1 と LOX-1 発現誘導の時相の違いは、発現誘導を引き起こすメカニズムの違いか、また転写エレメントにおけるプロモーターの強さに関係するのかわかるか現在のところ明らかになっていない。しかしながら、この時相のずれは、虚血 / 再灌流後における 2 つ蛋白の機能分担の可能性を示唆する重要な知見であると推測された。

本研究は膜型コレクチンである CL-P1 が一過性虚血 / 再灌流によって誘導される、血管内皮発現型スカベンジャーであることを示した初めての論文であり、虚血性血管障害に対する新しい治療戦略の発見に繋がることが大いに期待でき、この分野の研究の発展に寄与すると考えられた。

なお、論文提出者に対する試問審査においても適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることを確認した。以上の結果から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位に値するものと判定した。