

論文の内容の要旨

論文題目 The Regulation of LOX-1 Expression in Organ Damages

和訳 (臓器障害における LOX-1 発現についての検討)

指導教官 藤田敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 千葉優子

酸化低比重リポ蛋白(LDL)は、動脈硬化性疾患の強力な危険因子である。酸化 LDL はマクロファージ細胞膜上に存在するスカベンジャー受容体を介して細胞内に取り込まれ、血管内皮細胞に対する血管拡張反応の抑制や接着因子等の発現誘導といった作用を介して動脈硬化の発症・進展を促しているものと考えられている。近年同定された内皮型酸化 LDL 受容体であるレクチン様酸化 LDL 受容体(LOX-1)は、高血圧、糖尿病など動脈硬化を生じる疾患モデル動物の腎臓や血管でその発現が亢進しており、炎症性サイトカインや酸化ストレスなどの刺激によっても強力に誘導されることから、動脈硬化の種々の危険因子が臓器障害をもたらす機序において、重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。

ところで、peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)は、高脂血症や糖尿病など代謝性疾患との関与が指摘されている。糖尿病治療薬であるチアゾリジン誘導体は PPAR γ に結合してその活性を発現し、炎症性サイトカインの産生を抑制するとの報告もある。PPARs は、代謝疾患だけでなく血管の炎症反応にも作用し、動脈硬化の進展機序に関与している可能性が考えられる。実際、臨床的には、PPAR γ のリガンドであるチアゾリジン誘導体の投与は、血中脂質の低下をきたし、インスリン抵抗性を改善して心血管危険因子を低下させる。また PPAR γ リガンドは、LDL 受容体欠損マウスにおいて動脈硬化の進展を抑制したとの報告もある。

以上のことから酸化 LDL/LOX-1 系と PPARs は、共に動脈硬化性病変の進展に影響を与えていると考えられ、このことから、相互に関与している可能性がある。今回我々は炎症性刺激における酸化 LDL/LOX-1 系と PPARs との関連について、*in vitro* 及び *in vivo* における検討を行った。

まず培養ウシ血管内皮細胞(BAEC)における PPAR α 及び PPAR γ の発現について、これまで検討されていなかったもので、その点について Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)法を用いて検討し、さらに PCR 産物のシーケンスを施行した。その結果、BAEC において PPAR α 及び PPAR γ は共に定常状態で発現していることが確認された。

次に、腫瘍壊死因子- α (TNF- α : 10ng/ml, 8 時間)を投与し、LOX-1 の発現が濃度依存性に亢進することを確認した。これは今まで報告されている結果とほぼ同様であった。さらに PPAR α リガンドとして Wy14643 または fenofibric acid (いずれも 20-200 μ M) を、PPAR γ リガンドとして 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂: 1-10 μ M)及びチアゾリジン誘導体(Pioglitazone または Troglitazone: 1-10 μ M)を使用して 24 時間前投与を行った後、TNF- α と共にさらに 8 時間培養した。培養終了後細胞を回収して RNA を抽出し、LOX-1 のプローブを用いてノザンプロットングを施行、各群における LOX-1 mRNA 発現を比較した。TNF- α 誘導による LOX-1 mRNA の発現亢進は、PPAR γ リガンドの併用投与によって濃度依存性に抑制された。これに対し、PPAR α リガンドを投与しても明らかな抑制作用を示さなかった。さらに LOX-1 抗体を用いた免疫染色においても、TNF- α により LOX-1 の蛋白レベルの発現が亢進し、PPAR γ リガンドの 15d-PGJ₂がこれを抑制したが、PPAR α リガンドの Wy14643 は有意の影響を与えなかった。これらの結果より PPAR γ リガンドの血管や重要臓器に対する保護作用の機序として LOX-1 発現の抑制が重要である可能性が示唆された。しかし、このような *in vitro* の成績の解釈で常に問題となるのは、得られた成績が *in vivo* をどの程度反映しているのかということである。そこで、マウスを用いて同様の現象が *in vivo* でも観察されるのか否かについてさらに検討を加えた。

8 週齢、オス C57BL/6J マウスに対して普通食ないしは 0.01% Pioglitazone 含有食を 7 日間投与し、両群に対して vehicle あるいは TNF- α (400 μ g/kg)の腹腔内投与を行った。その 8 時間後に両側の腎を摘出し、臓器における LOX-1 遺伝子発現の変化を検討した。TNF- α 非投与の C57BL/6J マウスにおいては腎 LOX-1 の発現はごくわずかであったが、TNF- α 腹腔内投与により明らかな発現の亢進を認めた。しかし、*in vitro* の成績と同様に、PPAR γ リガンド前投与によってこの LOX-1 発現は抑制された。さらに、他のチアゾリジン誘導体である Troglitazone (200mg/kg/day)を 7 日間強制経口投与した場合にも同様の結果が得られた。以上より、PPAR γ リガンドは、炎症性刺激に対する LOX-1 の発現亢進に対して、*in vitro*のみならず *in vivo*においても抑制的に作用することが認められた。

以上より、PPAR γ は炎症性刺激による LOX-1 の発現に対し、*in vitro*、*in vivo*において共に抑制的に作用したことから、PPAR γ において示唆されている臓器傷害保護作用のメカニズムの一つとして、動脈硬化形成に促進的に働く LOX-1 の発現抑制が何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。