

学位論文題名

Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 by mediators of the acute phase response : a potential progenitor of vasculopathy in hypertensives

(急性相反応のメディエーターはプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1の発現を増加させ高血圧患者の血管障害の前駆となる可能性がある)

学位論文内容の要旨

高血圧は冠動脈疾患の重要な危険因子であり、さらに冠動脈疾患は炎症や血栓を溶解させる生体の防御システムである線維素溶解系(線溶系)の低下により促進される。線溶系の活性は転写や翻訳レベルで成長因子やサイトカインにより調節されている。プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1型(plasminogen activator inhibitor type-1, PAI-1)は線溶系の主要な生理的阻害物質である。PAI-1 発現の増加は血管内のフィブリン蓄積に重要な役割を果たす。血管の内外における炎症で活性化される急性相反応は血管の血栓性動脈硬化に重要であり、肝臓は急性相反応での蛋白産生の重要な源の一つである。PAI-1 を含む急性相蛋白の血中濃度変化は肝細胞での産生の変化によるところがおおきい。本研究では人の肝臓癌由来の高度に分化した細胞である HepG2 細胞を急性相反応のモデルとして用いた。インターロイキン(interleukin, IL)-6 は多くの急性相反応蛋白の主要な刺激物質である。IL-1 など他のサイトカインも急性相反応の調節に貢献する。サイトカインは高血圧に見られる血栓塞栓症や血管障害に寄与すると考えられるため IL-1 β と IL-6 が肝臓での PAI-1 産生に及ぼす影響を培養肝細胞で検討し、また高血圧患者での血中サイトカインや線溶系因子のレベルを検討した。HMG-CoA reductase inhibitors (スタチン) は冠動脈疾患で血漿コレステロール濃度を下げるほかに、多様な好ましい作用を持つことが注目される。近年、特にスタチンの炎症や線溶系に及ぼす影響が焦点とされている。スタチンの血管や血球に及ぼす影響は検討されてきたが、スタチンが炎症性サイトカインによる肝臓での PAI-1 産生にどのように影響するかは不明な点が多い。培養肝細胞 HepG2 を炎症性サイトカインで刺激し培養液中に分泌された PAI-1 を Western blot で測定した。IL-1 β は PAI-1 の蓄積を濃度依存性に増加させた。最大効果は 1 ng/ml で見られ対照に比べ 2.1 \pm 0.2 倍に増加した。IL-1 β に比べ IL-6 の作用は軽度であった。最大効果は 1 ng/ml で見られ対照に比べ 1.4 \pm 0.2 倍に増加した。IL-1 β (1 ng/ml) と IL-6 (1 ng/ml) の同時投与で PAI-1 は 2.4 \pm 0.2 倍に増加した。Mevastatin (10

μM) は IL-1 β 、IL-6、及びその併用による効果を有意に減少させた。IL-1 β による PAI-1 増加は $23\pm 3\%$ 減少し、IL-6 による増加は $30\pm 3\%$ 減少させた。IL-1 β と IL-6 併用による PAI-1 増加は $47\pm 4\%$ 減少した。Mevastatin 単独では PAI-1 産生に影響しなかった。PAI-1 mRNA 発現も IL-1 β (1 ng/ml) や IL-6 (1ng/ml) で増加した (Northern blotting)。3.2kb と 2.2kb 両方の PAI-1 mRNA が増加した。IL-1 β と IL-6 の併用でも PAI-1 mRNA は増加した。Mevastatin (10 μM) は IL-1 β 、IL-6 および IL-1 β と IL-6 併用による PAI-1mRNA 増加を有意に減少させた。3.2kb と 2.2kb 両方の PAI-1 mRNA が減少した。患者血液中の PAI-1 活性は比色法で測定し、PAI-1 抗原は enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)法で測定した。血中 PAI-1 活性は高血圧患者で、正常血圧者に比べ上昇していた(10.0 ± 9.8 AU/ml 対 6.2 ± 4.5 , $p < 0.05$)。血中 PAI-1 抗原も高血圧患者で正常血圧者に比べ上昇していた (30.9 ± 22.4 ng/ml 対 24.4 ± 13.3 , $p < 0.05$)。従って (1) IL-1 β と IL-6 は肝細胞で PAI-1 産生を増加させ、(2) mevastatin は炎症惹起性サイトカイン刺激による PAI-1 産生増加を低下させることで抗血栓作用を行使する可能性が有る。これらの結果は、高血圧患者で見られる動脈硬化性血栓合併症に炎症が果たす役割を明らかとした。またスタチンが炎症により惹起される血栓症に好ましい影響を及ぼす可能性も明らかとした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 筒 井 裕 之
副 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 三 輪 聡 一

学位論文題名

Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 by mediators of the acute phase response : a potential progenitor of vasculopathy in hypertensives

(急性相反応のメディエーターはプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1の発現を増加させ高血圧患者の血管障害の前駆となる可能性がある)

高血圧は冠動脈疾患の重要な危険因子である。脳梗塞や心筋梗塞など高血圧患者に生じやすい心血管系合併症は血栓を基盤として発症する。また、冠動脈疾患の進展は炎症や、血栓を溶解させる生体の防御システムである線維素溶解系(線溶系)の低下により促進されることが知られている。線溶系の活性は転写レベルや翻訳レベルで成長因子やサイトカインにより調節されている。プラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1 (plasminogen activator inhibitor type-1, PAI-1)は線溶系の主要な生理的阻害物質である。PAI-1発現の増加は血管内のフィブリン蓄積に重要な役割を果たす。一方、血管の内外における炎症で活性化される急性相反応は血管の血栓性動脈硬化に重要であり、肝臓は急性相反応での蛋白産生の重要な源の一つである。PAI-1を含む急性相蛋白の血中濃度の変化は肝細胞での産生の変化によるところが大きい。人の肝臓癌由来の高度に分化した細胞であるHepG2細胞は急性相反応のモデルとして用いられている。インターロイキン(interleukin, IL)-6は多くの急性相反応蛋白の主要なメディエーターである。IL-1など他のサイトカインも急性相反応の調節に貢献する。サイトカインは高血圧患者に見られる血栓塞栓症や血管障害に寄与すると考えられるため、IL-1 β とIL-6が肝臓でのPAI-1産生におよぼす影響をHepG2細胞で検討した。また高血圧患者で血中サイトカインとPAI-1のレベルを検討した。血漿コレステロール濃度を下げ冠動脈疾患の発症を抑制する薬剤であるHMG-CoA reductase inhibitors (スタチン)は、多様な好ましい作用を持つことが注目されている。近年、特にスタチンの炎症や線溶系におよぼす影響が焦点とされている。スタチンの血管組織や血球に及ぼす影響は検討されてきたが、スタチンが炎症性サイトカインによる肝臓でのPAI-1産生にどのように影響するかは不明な点が多い。そこで培養HepG2細胞を炎症性サイトカインで刺激し培養液中に分泌されたPAI-1をWestern blot

で測定した。IL-1 β は PAI-1 の蓄積を濃度依存性に増加させた。最大効果は 1 ng/ml で見られ、対照に比べ2.1 \pm 0.2 倍に増加した。IL-1 β に比べ IL-6 の作用は軽度であった。最大効果は 1 ng/ml で見られ対照に比べ1.4 \pm 0.2倍に増加した。IL-1 β (1 ng/ml) と IL-6 (1 ng/ml) の同時投与で PAI-1 は 2.4 \pm 0.2 倍に増加した。メバスタチン(Mevastatin, 10 μ M) はIL-1 β 、IL-6、およびその併用による効果を有意に減少させた。IL-1 β によるPAI-1増加は 23 \pm 3% 減少し、IL-6による増加は 30 \pm 3% 減少した。IL-1 β と IL-6 併用によるPAI-1増加は 47 \pm 4%減少した。Mevastatin 単独ではPAI-1産生に影響しなかった。PAI-1 mRNA発現も IL-1 β (1 ng/ml) や IL-6 (1ng/ml) で増加した(Northern blotting)。3.2kb と 2.2kb両方のPAI-1 mRNAが増加した。IL-1 β と IL-6の併用でも PAI-1 mRNAは増加した。Mevastatin (10 μ M) はIL-1 β 、IL-6 および IL-1 β と IL-6 併用によるPAI-1mRNA増加を有意に減少させた。3.2kb と 2.2kb 両方のPAI-1 mRNAが減少した。高血圧患者の血液中の PAI-1 活性は比色法で測定し、PAI-1抗原はenzyme linked immunosorbent assay (ELISA)法で測定した。血中PAI-1 活性は高血圧患者で、正常血圧者に比べ上昇していた (10.0 \pm 9.8 AU/ml 対 6.2 \pm 4.5, p <0.05)。血中 PAI-1 抗原も高血圧患者で正常血圧者に比べ上昇していた (30.9 \pm 22.4 ng/ml 対 24.4 \pm 13.3, p <0.05)。ELISA法で測定した血液中のIL-6レベルは高血圧患者で正常血圧者に比べ有意な上昇はみられなかった (1.7 \pm 1.2 pg/ml 対 1.5 \pm 1.2)。IL-1 β と IL-6は培養肝細胞でPAI-1 産生を増加させ、mevastatinは炎症惹起性サイトカイン刺激によるPAI-1産生の増加を抑制することで抗血栓作用を行使する可能性があることが示された。これらの結果は、高血圧患者で見られる動脈硬化性血栓合併症に炎症が果たす役割を明らかとした。またスタチンが炎症により惹起される血栓症に好ましい影響を及ぼす可能性も明らかとした。

口頭発表に際し、安田教授から高安病やバージャー病など炎症性血管疾患でのPAI-1の動態、およびステロイドを投与された患者でのPAI-1の動態について質問がなされた。三輪教授から実験に用いたサイトカインの用量反応性、および高血圧患者で血液中のPAI-1レベルが上昇するメカニズムについて質問がなされた。筒井教授から高血圧患者のサイトカインレベルとPAI-1レベルの相関、およびサイトカイン、PAI-1と血管障害をつなぐメカニズムについて質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は過去のデータや関連論文を引用し、概ね妥当な回答を行った。

この論文はHypertension Research に掲載された。この論文で得られた結果は高血圧に合併する血栓症の発症機序の解明や、新たな治療法の開発に貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの研究成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。