

Title	LOW DENSITY LIPOPROTEIN AND APOPROTEIN B INDUCE INCREASES IN INOSITOL TRISPHOSPHATE AND CYTOSOLIC FREE Ca ²⁺ VIA PERTUSSIS TOXIN-SENSITIVE GTP-BINDING PROTEIN IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS
Author(s)	森田, 龍平
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37677
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 ・ (本 籍)	森	田	龍	平
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	第	9 8 1 5	号	
学位授与の日付	平 成	3 年	5 月	2 8 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
学 位 論 文 名	LOW DENSITY LIPOPROTEIN AND APOPROTEIN B INDUCE INCREASES IN INOSITOL TRISPHOSPHATE AND CYTOSOLIC FREE Ca^{2+} VIA PERTUSSIS TOXIN-SENSITIVE GTP-BINDING PROTEIN IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS (培養血管平滑筋細胞における低密度リポ蛋白及びアポ蛋白 B のカルシウムシグナル伝達機構に関する研究)			
論 文 審 査 委 員	(主査)			
	教 授	荻 原	俊 男	
	(副査)			
	教 授	三 木	直 正	教 授 祖 父 江 憲 治

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

血漿中のコレステロール輸送の大半を担うと考えられる低密度リポ蛋白 (LDL) は、主要構成成分のアポ蛋白 B (Apo-B) を介して細胞膜上の特異的受容体に結合し、血管平滑筋細胞の増殖を促進させることが知られており、動脈硬化の発症・進展における重要な役割を果たすと推察される。しかし LDL 及び Apo-B の細胞内での情報伝達機構の詳細は明らかではない。そこで、血管平滑筋細胞 (VSMC) における LDL 及び Apo-B のイノシトール三リン酸 ($Ins-1, 4, 5-P_3$)、及び細胞質内遊離カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) に及ぼす影響を検討した。

〔 方 法 〕

＜細胞培養＞ VSMC はラット大動脈中膜平滑筋から explant 法により単離し、10% ウシ胎仔血清 (FCS) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) で $37^{\circ}C$ 、5% CO_2 気相下で培養した。

＜イノシトールリン酸の測定＞ confluent に達した VSMC をイノシトールを含まない血清不含 DMEM 下で $myo-[^3H]$ イノシトールで 24 時間標識し、dispase で剥離の後、測定用緩衝液にて洗浄し、細胞浮遊液に各被検物質を加えトリクロロ酢酸で反応を停止させ、遠沈し、上清を水飽和エーテルにて洗浄し測定に供した。イノシトールリン酸の測定は HPLC 法にて行った。即ち陰イオン交換カラムを用い、蟻酸アンモニウムを溶出液とし階段状の濃度勾配により溶出し、各分画の $[^3H]$ 放射活性をシンチレーションカウンターで計測した。

＜ $[Ca^{2+}]_i$ の測定＞ $[Ca^{2+}]_i$ の測定は fura 2 を用いて行った。confluent に達した VSMC を 24

時間血清不含DMEMで培養後fura 2/AMを含むDMEMで50分間インキュベートし、細胞をdisperseで剥離し、細胞浮遊液の状態で分光蛍光光度計を用いて励起光340 nmによる500 nmの蛍光強度を測定し、Tsienらの方法により $[Ca^{2+}]_i$ の値を算出した。

〔結 果〕

① LDLによるイノシトールリン酸産生の経時的変化

VSMCにおいてLDL ($5 \mu\text{g/ml}$) 刺激前ではIns-1, 4, 5- P_3 は測定可能ながら低値を示したが、刺激後5秒でIns-1, 4, 5- P_3 値の急激な上昇を認め、30秒後には基礎値の330%に達する最大値を示した。イノシトール1, 3, 4, 5-四リン酸(Ins-1, 3, 4, 5- P_4)及びイノシトール1, 3, 4-三リン酸(Ins-1, 3, 4- P_3)もそれぞれ30秒後の段階で産生がみられ、Ins-1, 3, 4- P_3 は180秒後で高値を示した。

② LDL及びApo-BのIns-1, 4, 5- P_3 産生に対する濃度依存性の検討

LDL, Apo-B共に濃度依存的にIns 1, 4, 5- P_3 の産生を促進させ、その最大値を与える濃度はLDLが $50 \mu\text{g/ml}$ (基礎値の370%)、Apo-Bでは $5 \mu\text{g/ml}$ (基礎値の320%)であり、 $K_{0.5}$ 値はLDLで $1.1 \mu\text{g/ml}$ 、Apo-Bで $0.07 \mu\text{g/ml}$ であった。またVSMCを百日咳菌毒素(IAP)により24時間前処置すると、LDL及びApo-BによるIns-1, 4, 5- P_3 の産生は抑制された。

③ LDL及びApo-Bの $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼす影響

細胞外 Ca^{2+} の存在下ではLDL ($5 \mu\text{g/ml}$)、Apo-B ($0.5 \mu\text{g/ml}$) による刺激で共に急速かつ一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇とそれに続く持続的上昇が認められた。細胞外 Ca^{2+} を除いた条件下では $[Ca^{2+}]_i$ の持続的上昇は消失した。即ち $[Ca^{2+}]_i$ の早期の上昇は細胞内storeよりの Ca^{2+} の遊離、持続的上昇は細胞外からの Ca^{2+} 流入によると推察された。またIAP前処置により $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は共に抑制された。

〔総 括〕

- ① LDL及びApo-BはVSMCにおけるIns-1, 4, 5- P_3 産生を濃度依存的に亢進させた。
- ② LDL及びApo-BはIns-1, 4, 5- P_3 産生亢進に伴って細胞内storeからの Ca^{2+} の放出によると考えられる $[Ca^{2+}]_i$ の急速かつ一過性の上昇をもたらした。
- ③ LDL受容体のLDLに対する結合定数は約 $20 \mu\text{g/LDL-protein/ml}$ であると報告されているが、今回の検討ではLDLの $0.5 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ でIns-1, 4, 5- P_3 及び $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させており、生理的な濃度付近にあると考えられた。
- ④ IAP感受性GTP結合蛋白質が、細胞外の信号の細胞内への伝達を媒介することはよく知られているが、今回の検討では、VSMCをIAPにより前処置することにより、LDL刺激によるIns-1, 4, 5- P_3 の産生、及び $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が共に抑制された。
- ⑤ 以上より、LDLのVSMCにおける細胞内情報伝達機構のひとつとして、IAP感受性GTP結合蛋白質を介したIns-1, 4, 5- P_3 の産生及びそれに伴う $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が介在すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

コレステロールの増加は動脈硬化の危険因子であり、その血中輸送の大半を担う低密度リポ蛋白 (LDL) は動脈硬化における重要な役割を果たしていると推察されるが、LDLの血管平滑筋細胞内における情報伝達のメカニズムの詳細は不明である。本研究では、LDLのカルシウムシグナル伝達機構を解明する目的で、ラット培養血管平滑筋細胞を用いてLDLのイノシトール三リン酸 (Ins-1, 4, 5- P_3) 及び細胞質内遊離カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) に及ぼす影響について検討したものである。その結果、LDLはIns-1, 4, 5- P_3 の産生及び $[Ca^{2+}]_i$ の上昇をもたらし、その作用は百日咳菌毒素により抑制されることが明らかとなった。このことよりLDLの血管平滑筋細胞における細胞内情報伝達機構に、百日咳菌毒素感受性GTP結合蛋白質を介したIns-1, 4, 5- P_3 の産生及びそれに伴う $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が介在することが解明された。以上より、本研究はLDLの血管平滑筋細胞内情報伝達機構に新知見を加え、学位論文に値するものである。