The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Manganese-superoxide dismutase in endothelial cells : Localization and mechanism of induction
Author(s)	鈴木, 敬一郎
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3072927
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【 75 】

氏　　名	鈴木敬一郎（すずき けいいちろう）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第 10997 号
学位授与年月日	平成 5 年 12 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Manganese-superoxide dismutase in endothelial cells: Localization and mechanism of induction **(血管内皮細胞における Mn-スーパーオキサイドディスムターゼ：その局在と誘導機構)**
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之 (副査) 教授 志賀 健　教授 多田 道彦

論文内容の要旨

〔目　的〕

スーパーオキサイドディスムターゼ(SOD)は活性酸素の一つである O_2^- を消去する酵素で，哺乳類では Cu, Zn-SOD, Mn-SOD, Extracellular SOD の三種類が存在する。なかでも Mn-SOD はミトコンドリアに局在し，腫瘍壊死因子（TNF）などのサイトカインにより誘導され，細胞の保護蛋白として働くことが知られている。また我々は先に急性心筋梗塞において血中の Mn-SOD 及び TNF が上昇すること，また炎症性疾患や悪性腫瘍においても Mn-SOD が誘導されることを明らかにしている。一方，血管内皮細胞は組織と血流の間に存在し，虚血，炎症，動脈硬化などのストレスに直接曝されている。そこで血管内皮細胞における Mn-SOD の発現メカニズムと局在を明らかにするために以下の実験を行った。

〔方法ならびに成績〕

① 心筋における Mn-SOD の局在

開心術中の心筋生検により得られた標本を急速凍結置換法で固定し，家兎に免疫して得られた抗ヒト Mn-SOD 抗体を用いて電子顕微鏡で Mn-SOD の局在を検討した。その結果心筋細胞，冠血管内皮細胞とも Mn-SOD はミトコンドリアに局在していたが，同一条件下でのミトコンドリア上に存在する金粒子数を比較すると約 2 倍血管内皮細胞に多く存在した。

② ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞における Mn-SOD の発現

ヒト臍帯静脈よりディスパーゼを用いて血管内皮細胞を単離，培養を行った。実験には第 3 ～ 5 継代の細胞を用いた。血管内皮細胞培養液中にホルボールエステル（TPA; 100ng/ml），TNFα（10ng/ml）インターロイキン 1-α(IL-1α；10ng/ml)，リポポリサッカライド（LPS; 10ng/ml）を添加し，4 時間後に細胞を回収し，ノーザンブロット法により Mn-SOD, Cu, Zn-SOD の mRNA の発現を検討した。その結果 Mn-SOD はいずれの場合も著明な発現を示し，一方 Cu, Zn-SOD は変化を示さなかった。この Mn-SOD の誘導は，プロティンキナーゼ C（PKC）の阻害剤である 1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-2-methylpiperazine（H7）の添加により LPS を

除いて部分的に抑制された。

次にこの Mn-SOD の誘導を蛋白レベルで検討した。培養液中に TNF α を 1 ～100ng/ml 添加し24，48時間後に細胞を回収した。細胞中の Mn-SOD をモノクローナル抗体を用いた Enzyme-Linked Immunosorbent Assay（ELISA）で測定した。細胞中の Mn-SOD 量は TNF α の濃度に依存して増加し，100ng/ml の添加では 5 ～ 6 倍に達した。また TPA および TNF α による Mn-SOD 蛋白の増加は H7の添加によって部分的に抑制された。

TPA による Mn-SOD の mRNA の誘導に対する actinomycin D（AcD）および cyclohexamide（CHX）の影響を検討した。AcD は TPA による誘導をほぼ完璧に阻害したが，CHX では Mn-SODmRNA の過剰発現が認められた。

また培養液中に TPA を添加し，その24時間後にさらに TPA 及び TNF α を加えて Mn-SOD の mRNA の発現を検討した。TPA をさらに加えても Mn-SOD の mRNA の発現はみられなかった（脱感作）が，TNF α を加えると過剰発現が認められた。

③ 血管内皮細胞における Mn-SOD の局在

血管内皮細胞に TNF α を添加し，24時間後に回収し，急速凍結置換法により固定し，抗ヒト Mn-SOD 抗体を用いて電子顕微鏡でその局在を検討した。TNF α 添加後，Mn-SOD はミトコンドリアでのみ著明な増加を認めた。

④ Mn-SOD 発現に対するデキサメサゾンの効果

Mn-SOD 発現に対するデキサメサゾン（DEX）の効果を検討するため，培養液中に TNF α，TPA とともに DEX を10 μ M 加えた。24時間後に細胞を回収し，細胞の Mn-SOD 含量を検討したところ，DEX は TPA，TNF α による Mn-SOD の誘導をいずれも部分的に抑制した。

〔総　括〕

① 心筋において Mn-SOD は心筋細胞，特に冠血管内皮細胞のミトコンドリアに多く存在した。また臍帯静脈由来血管内皮細胞において TNF α により著明に発現される Mn-SOD もミトコンドリアにのみ局在した。

② 血管内皮細胞の Mn-SOD は TPA，TNF α，IL- 1 α，LPS により著明に誘導された。

③ 血管内皮細胞の Mn-SOD の誘導は PKC 阻害剤により部分的に抑制された。また TPA 脱感作後も TNF α の添加により過剰発現がみられた。これらより Mn-SOD の誘導経路には PKC を介する経路と介さない経路の少なくとも二つが存在すると考えられた。

虚血，炎症などの病態において血管内皮細胞の Mn-SOD は著明に増加し，細胞保護に働くと共に内皮細胞の障害に伴い血清中へ逸脱し，血清中 Mn-SOD 上昇の一因となっていると推測された。

論文審査の結果の要旨

スーパーオキサイドディスムターゼ（SOD）は哺乳類では Cu，Zn-SOD，Mn-SOD，Extracellular SOD の三種類が存在している。その中でミトコンドリアに局在している Mn-SOD は癌細胞において腫瘍壊死因子（TNF）による細胞障害などに対する保護蛋白であり，サイトカインにより誘導されることで注目されている。

本研究は急性心筋梗塞患者血清中における Mn-SOD の大変遅い発現の原因究明を端緒にしており，培養血管内皮細胞において Mn-SOD が癌細胞以上にサイトカインやホルボールエステルで誘導されること，そしてその誘導経路にはプロテインキナーゼ C を介する経路と介さない経路の少なくとも二つが存在すること明らかにした。また特異抗体を用いた免疫電顕により，その誘導後のミトコンドリアにおける局在も明らかにした。血流と組織の間に介在し，虚血，炎症等の影響を直接受ける血管内皮細胞の Mn-SOD の誘導経路は病態解析の面からも大変興味深い。

以上のように，本論文は心筋傷害などにおける Mn-SOD の誘導経路と血中逸脱機構を初めて明らかにしたもので，学位の授与に値すると考えられる。