



| | |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title | 150-kD Oxygen-regulated Protein Is Expressed in Human Atherosclerotic Plaques and Allows Mononuclear Phagocytes to Withstand Cellular Stress on Exposure to Hypoxia and Modified Low Density Lipoprotein |
| Author(s) | 塚本, 吉胤 |
| Citation | 大阪大学, 1997, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/40386 |
| 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 | 塚 本 吉 胤 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (医 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 1 2 8 4 6 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 9 年 3 月 18 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 | 150-kD Oxygen-regulated Protein Is Expressed in Human Atherosclerotic Plaques and Allows Mononuclear Phagocytes to Withstand Cellular Stress on Exposure to Hypoxia and Modified Low Density Lipoprotein (ヒト動脈硬化巣における低酸素誘導蛋白 ORP150の発現とその意義) |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 北村 幸彦 (副査) 教 授 堀 正二 教 授 青笹 克之 |

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】 動脈硬化巣の進展に伴い、血管壁における栄養血管構築における変化がおこり、血管内皮細胞・平滑筋細胞・マクロファージを構成要素とする血管壁の循環不全・酸素分圧の低下がおこることが、従来より示唆されている。しかし、従来の報告では、血管壁における酸素分圧の測定のみに着目されており、細胞のレベルでの低酸素に対するストレス応答の立場からの検索は行われていない。我々は最近、低酸素暴露によって誘導され、HSP ファミリーとホモロジーを有する分子量150 kDaの新規ストレス蛋白 ORP150の精製およびクローニングに成功した。本研究では、ヒト動脈硬化巣における ORP150の発現を検討した。

- 【方 法】 1) 細胞培養：培養細胞としてはヒト大動脈由来の平滑筋細胞およびヒト末梢血由来の mononuclear phagocytes (MPs) を用いた。ヒト末梢血をヘパリン採血し、lymphocyte separation medium にて分離した mononuclear cells を培養し adherent cells を10-14日間培養したものを MPs として用いた。
- 2) 低酸素負荷には、従来より使用している低酸素チャンバーを用いて酸素分圧 $pO_2 \approx 10-15$ Torr として用いた。その他の刺激としては、native LDL, acetylated LDL, oxidized LDL, lipopolysaccharide, interferon- γ , 2-deoxyglucose, heat shock, 過酸化水素, 塩化コバルトを使用した。
- 3) ヒト標本は、大阪大学医学部付属病院の剖検例で死後1-4時間の症例より大動脈を採取した。ヒト剖検例より得た大動脈標本は肉眼的所見により動脈硬化の程度の軽い病変と進行した病変の2種類に大別し、RNA および蛋白を抽出し、Northern blot および Western blot にて ORP150 mRNA および ORP150蛋白の発現を検討した。また、一部は、in situ hybridization (ISH) 用に包埋し、Digoxigenin 標識による riboprobe を用いて ISH を行い、同時に ORP150mRNA 発現細胞の同定を隣接切片の免疫組織化学により行った。
- 4) 低酸素および modified LDL の細胞の viability に及ぼす影響を調べるために antisense oligonucleotide を作製し、MPs の viability を LDH release によって評価した。また抗酸化剤により MPs の viability が rescue されるかを、probucol および N-acetylcysteine を加えることにより評価した。
- 5) 動脈硬化性疾患患者での血清中の抗 ORP150抗体の検索のため、動脈硬化性疾患患者 6 例および age matched

control 5 例の血清を採取し、抗体価を ELISA にて測定した。

【成績】 1) MPs および平滑筋細胞を低酸素負荷 0, 12, 24 時間および低酸素負荷 24 時間後再灌流 24 時間で ORP150 蛋白の発現を調べたところ、ORP150 蛋白の誘導は低酸素負荷 24 時間をピークにして認められ再灌流 24 時間でもとのレベルに戻っていた。

2) mononuclear phagocytes に native LDL, acetylated LDL, oxidized LDL, lipopolysaccharide, interferon- γ , 2-deoxyglucose, heat shock, 過酸化水素, 塩化コバルト 単独の負荷を加えたところ ORP150 蛋白の誘導は認められなかったが、低酸素負荷のみで認められ、さらに低酸素負荷に acetylated LDL, oxidized LDL, lipopolysaccharide, interferon- γ を加えることによりその発現の程度は増強された。同様の傾向は、mRNA レベルでも確認された。平滑筋細胞にては、低酸素負荷で ORP150 蛋白の誘導は認められたものの、低酸素負荷にその他の負荷を加えることにより発現の増強は認められなかった。

3) ヒト剖検例より得た大動脈標本を用いた検討では、ORP150 mRNA および ORP150 蛋白の発現は、動脈硬化が進行した症例および動脈硬化が進行した病変で強く認められ、動脈硬化が軽度の症例および動脈硬化が軽度の病変ではほとんど認められなかった。

4) ISH による検討では、ORP150 mRNA は動脈硬化巣内のマクロファージに優位に認められ、新生内膜の一部の平滑筋細胞にも認められた。

5) MPs を用いた細胞の viability の検討では、oligonucleotide を導入しなかったものや sense oligonucleotide を導入したものでは低酸素負荷で viability の低下は認められなかったが、antisense oligonucleotide を導入し低酸素負荷したものでは viability の低下が認められ、さらに低酸素下に oxidized LDL を加えたものでは著明な viability の低下が認められた。この場合 oxidized LDL の代わりに native LDL を加えても viability の低下の増強は認められなかった。また、低酸素および oxidized LDL 存在下で antisense oligonucleotide の導入による viability の低下は、抗酸化剤である probucol および N-acetylcysteine の添加により部分的に rescue された。以上より脂質は、modified LDL となつてはじめて低酸素下で細胞障害性に働き、ORP150 が cytoprotective に作用していることが示唆された。

6) 患者血清中の抗 ORP150 抗体の検索では、動脈硬化性疾患患者 6 例中 4 例で抗 ORP150 抗体が検出されたが、age matched control 5 例では、どの症例でも抗 ORP150 抗体は検出されなかった。

【総括】 1) マクロファージおよび平滑筋細胞を用いた細胞培養の検討では、ORP150 は、低酸素特異的に誘導された。

2) ORP150 は、ヒト動脈硬化巣でマクロファージに優位に発現していた。

3) ヒト動脈硬化巣における ORP150 の発現は、低酸素に対するストレス応答がヒト動脈硬化巣内で起こっていることを示唆していると考えられる。

4) また、同時にマクロファージにおいて ORP150 は、低酸素に応答するだけでなく、cytoprotective に作用している可能性が示唆された。

5) 動脈硬化性疾患患者の血清中の抗 ORP150 自己抗体の存在は、ORP150 蛋白の慢性的な血中への暴露を示唆すると考えられ、その機序としては、plaque rupture などが想定される。

論文審査の結果の要旨

動脈硬化と低酸素との関連性は極めて重要であると考えられてきたが、その関連性についての報告は少ない。細胞レベルでは、低酸素により血管内皮の透過性が亢進したり血管内皮が凝固促進の方向に働いたり、また、低酸素条件下でマクロファージが血管新生因子を産生する事などが報告されている。しかし動物実験では、動脈硬化と低酸素との関連性を示したものは皆無に等しい。ましてヒト動脈硬化は、動物モデルとその詳細な機序や長期的に進行するな

どの点において異なるものであり、ヒト動脈硬化と低酸素との関連性を病理学的に証明するのは困難であった。

本研究は、ヒト動脈硬化標本を利用し、低酸素で特異的に誘導される150-kD Oxygen-regulated Protein (ORP150) を用いて、低酸素状態を細胞レベルでの低酸素に対するストレス応答の立場より論じ、ヒト動脈硬化と低酸素との関連を解明しようとしたものである。その発想および手法は、非常に斬新であり、学位に値するものとする。