



Title	Angiotensin II Type 1 Receptor-Mediated Peroxide Production in Human Macrophages
Author(s)	柳谷, 良裕
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42640
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、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	やなぎ 柳 たに 谷 よし 良 ひろ 裕
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 0 7 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学 位 論 文 名	Angiotensin II Type 1 Receptor-Mediated Peroxide Production in Human Macrophages (ヒトマクロファージにおけるアンジオテンシンタイプ1受容体の酸化ストレスに及ぼす影響の検討)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 荻原 俊男 (副査) 教 授 松澤 佑次 教 授 三木 直正

論 文 内 容 の 要 旨

【背景と目的】

動脈硬化は、脳卒中、心筋梗塞などのいわゆる生活習慣病の基盤となる重要な病態である。従来より動脈硬化とレニン-アンジオテンシン (R-A) 系の関与は指摘されているが、動脈硬化巣におけるマクロファージに対する研究は未だ十分とはいえない。我々はヒト冠動脈動脈硬化巣内のマクロファージにおけるアンジオテンシン変換酵素 (ACE) の発現亢進、単球からマクロファージへの形質変換により ACE やアンジオテンシン II タイプ 1 (AT1) 受容体の発現亢進を既に報告している。R-A 系は、LDL 酸化亢進を介してマクロファージへの LDL 取り込みを促進し、粥状動脈硬化巣の進展に関与しているとされるが、マクロファージでの酸化ストレスと A II との関連は不明である。そこで今回我々は、単球からマクロファージへの形質変換による酸化ストレスへの影響と R-A 系により酸化ストレスが影響をうけるのか否かを検討した。

【方法ならびに成績】

単球としてヒト単芽球性白血病細胞株 THP-1 を RPMI1640 を使用し継体培養した。THP-1 を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で 24 時間刺激することによりマクロファージへ形質変換させた。形質変換後は PMA の影響を除去するために PBS での十分な洗浄を行い、さらに 48 時間の培養を行った。

また、ヒト末梢血中より midi-MACS を用い採取した単球およびマクロファージにおいても同様の検討を行った。

過酸化物質の総量は、細胞内の過酸化物質により蛍光する 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate を FACS-S CAN を用いたフローサイトメトリー法により DCF fluorescence intensity として測定した。

(1) 単球からマクロファージへの形質変換に基づく酸化ストレスの影響

単球およびマクロファージに 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate ($5 \mu\text{M}$) を添加し、30 分後に DCF fluorescence intensity を測定した。単球からマクロファージへの形質変換により DCF fluorescence intensity は 320% と有意に増加した。

(2) マクロファージにおける酸化ストレスに対する A II の影響

マクロファージに 10^{-11}M から 10^{-6}M までの A II を添加したところ、濃度依存性に DCF fluorescence intensity の増加を認めた ($\text{EC}_{50} = 5.4 \times 10^{-9}\text{M}$)。この反応は 15 分をピークとし、1 時間後まで持続した。

(3) 酸化ストレス亢進への A II 受容体サブタイプの関与の検討

マクロファージに 10^{-6} MのA II刺激30分前に、AT1受容体拮抗薬(CV11974、 10^{-6} M)およびアンジオテンシンIIタイプ2(AT2)受容体拮抗薬(PD123319、 10^{-6} M)を添加した。DCF fluorescence intensityの%増加率は、A II単独投与群215%、A II+AT1受容体拮抗薬投与群58%、A II+AT2受容体拮抗薬投与群221%と有意にAT1受容体拮抗薬投与群で低値となった。

(4)アンジオテンシンII類縁物質の酸化ストレスへの影響

マクロファージにアンジオテンシンI(10^{-8} M)、アンジオテンシンIII(10^{-6} M)、アンジオテンシンIV(10^{-6} M)、アンジオテンシン(1-7)(10^{-6} M)を添加し、A II(10^{-6} M)の添加時と比較検討した。アンジオテンシンIII、アンジオテンシンIV、アンジオテンシン(1-7)ではDCF fluorescence intensityに変化は認められなかったが、アンジオテンシンI投与群、A II投与群ではそれぞれ257%、360%と有意に増加した。

【総括】

単球からマクロファージへの形質変換により酸化ストレスは増大した。この酸化ストレスはA II投与によりさらに増強し、AT1受容体を介した作用であることが明らかとなった。さらに、アンジオテンシンIが酸化ストレスを増大させたが、マクロファージ由来のACEにより変換されたA IIが酸化ストレスを増強させたことが予想された。このことより動脈硬化巣内のマクロファージでR-A系がオートクライン-パラクライン的に酸化ストレスの亢進を介して動脈硬化の進展促進に関与している可能性が示唆された。

以上の結果より、マクロファージの酸化ストレスが一部R-A系により調節されていること、AT1受容体拮抗薬が動脈硬化予防に働く可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究により、マクロファージにおけるアンジオテンシンII(A II)の機能の解明を酸化ストレス亢進の観点より試みた。単球としてヒト単芽球性白血病細胞株THP-1を使用し、phorbol 12-myristate 13-acetateによる刺激で形質変換させたマクロファージと、ヒト末梢血よりプライマリーカルチャーしたマクロファージを用いた。過酸化物質の総量は、2', 7'-dichlorofluorescein-diacetateを用いフローサイトメトリー法により測定した。(1)単球からマクロファージへの形質変換により酸化ストレスは約3倍へと増大した。(2)マクロファージに対するA II刺激によりさらに2.5倍と増強した。(3)アンジオテンシンIIタイプ1(AT1)受容体拮抗薬およびアンジオテンシンIIタイプ2受容体拮抗薬の添加実験により、この酸化ストレスはAT1受容体をするものと解明された。(4)A II類縁物質ではアンジオテンシンI(A I)のみが酸化ストレスを増大させた。以上の結果より、レニン-アンジオテンシン系がAT1受容体を介してオートクライン-パラクライン的にマクロファージの酸化ストレスに関与し、LDLの酸化変性、マクロファージの泡沫化を促進することにより動脈硬化の進展に関与している可能性が示唆された。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、今後の発展性にも期待できるものがあり、生命科学への貢献度が極めて高い研究であると言える。したがって、学位授与に十分値すると考えられる。