

糖尿病における動脈硬化巣発症機序の解明

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2010-11-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高橋, 貞夫, 鈴木, 仁弥, 今川, 美智子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/2785

糖尿病における動脈硬化巣発症機序の解明

研究代表者：高橋 貞夫（医学部、講師）

電話：0776-61-3111、メールアドレス：sadaost@u-fukui.ac.jp

共同研究者：鈴木 仁弥（医学部、助教）、今川 美智子（医学部、大学院）

概 要	<p>高 TG 血症は糖尿病患者における冠動脈疾患の主要なリスクファクターであります。</p> <p>TG リッチリポ蛋白を特異的に認識する VLDL 受容体はマクロファージ泡沫化に関与することをヒトマクロファージ細胞で証明してきました。In vivo 系での動脈硬化症への VLDL 受容体の関与の証明のため、LDL 受容体ノックアウトマウスと VLDL 受容体/LDL 受容体ダブルノックアウトマウスの動脈硬化巣を比較しましたが差を認めませんでした。本研究にてマクロファージ VLDL 受容体蛋白発現がヒトと異なりマウスでは発現されていないことが判明致しました。動脈硬化研究に、マウスマクロファージ細胞株やマウス動物モデルが頻用されてきましたが、すべてに VLDL 受容体蛋白発現がなく、ヒト動脈硬化巣研究には応用できないことが分かりました。</p>
関連キーワード	VLDL 受容体 マクロファージ泡沫化 動脈硬化巣 マウスモデル動物 種族差

研究の背景

動脈硬化性疾患は糖尿病患者における死亡原因の主要な位置を占めており、高 TG 血症が糖尿病患者における冠動脈疾患の主要なリスクファクターであります。TG リッチリポ蛋白を特異的に認識する超低比重リポ蛋白 (VLDL) 受容体はマクロファージ泡沫化に関与することが推定されておりました。我々は IFN (インターフェロン) γ がヒト THP-1 細胞マクロファージ・ヒト HL-60 細胞マクロファージ・ヒト単球由来マクロファージの 3 種類のヒトマクロファージ細胞において、VLDL 受容体と LPL (リポ蛋白リパーゼ) 発現を抑制するとともに TG リッチリポ蛋白によるマクロファージ泡沫化を

も抑制することを示しました。この事実は、in vitro 系ではありますが VLDL 受容体と動脈硬化巣の関連を結びつける必要十分条件を満たす結果でありました。(Kosaka, S, Takahashi S, et al. Circulation, 2001). その後、in vivo 系において低比重リポ蛋白 (LDL) 受容体ノックアウト (KO) マウスと VLDL/LDL 受容体 double KO マウス間での動脈硬化巣面積を検討したが差異を認めませんでした。しかし、最近の研究で驚くべきことにヒトと異なり、マウスマクロファージ細胞における VLDL 受容体発現欠如の事実を発見致しました。

研究の目的

(抗体の作製)

ヒト・ウサギ・ラット・マウスにおける VLDL 受容体蛋白発現の差異を証明するため、ヒト・ウサギ・ラット・マウス VLDL 受容体蛋白を同時に認識できる抗体作製のため、ウサギに免疫後にポリクローナル抗体を作製致しました。

(マクロファージ VLDL 受容体蛋白発現の種族差の証明)

ヒト・ウサギ・マウスにおけるマクロファージ VLDL 受容体 mRNA と蛋白発現の差異を検討することで、マウスを用いた動脈硬化研究に限界があることを証明致します。この証明は現在の動脈硬化研究の方向性を変換し、ヒト糖尿病患者の動脈硬化病変の治療・予防に貢献する結果であると考えました。

研究の成果

(ポリクローナル抗体の作製)

ヒト・ウサギ・ラット・マウス VLDL 受容体 C 末端の 20 アミノ酸配列が同一である事を確認しまして合成ペプチドを作製し、ウサギに免疫後に抗 VLDL 受容体ポリクローナル抗体を得ました (VR2 抗体)。VR2 抗体の認識を VLDL 受容体発現が高い心臓にて確認したところ、ヒト・ウサギ・ラット・マウス心臓 VLDL 受容体すべてを認識することを確認致しました。Wild type マウス心臓の VR2 による VLDL 受容体バンドが、VLDL 受容体 KO マウス心臓では消失することから、VLDL 受容体の特異的に認識していることが分かりました。LDL 受容体・VLDL 受容体・apoE 受容体 2 遺伝子導入 CHO 細胞での Western blots で VR2 抗体は VLDL 受容体を認識するが LDL 受容体や apoE 受容体を認識しないことも確認致しました。

(in vitro 系におけるマクロファージ VLDL 受容体発現)

図 1 に示しますようにマウスマクロファージ細胞株 (Raw264.7, J774) や wild type マウスからの腹腔マクロファージには VLDL 受容体蛋白が発現されていないことが確認されました。一方、Raw264.7, J774 細胞・腹腔マクロファージの mRNA は Northern-blots と RT-PCR にて確認されたことから、マウスマクロファージ VLDL 受容体が発現されていないことが推定されました。マウス心臓 VLDL 受容体は mRNA と蛋白発現が確認されました。

(in vivo 系におけるマクロファージ VLDL 受容体発現)

VR2 抗体を用いました免疫染色により WHHL (LDL 受容体変異ウサギ)・ヒト冠状動脈の動脈硬化巣マクロファージに VLDL 受容体蛋白発現が確認されました。一方、動脈硬化症研究に頻用されている普通食アポ E KO マウス・高脂肪食 LDL 受容体受容体 KO マウスの動脈硬化巣マクロファージには VLDL 受容体蛋白発現は全く認められませんでした。アポ E KO マウス・LDL 受容体受容体 KO マウスの心臓では VLDL 受容体蛋白発現は認められており、マクロファージ VLDL 受容体蛋白発現に種差があることが判明致しました。

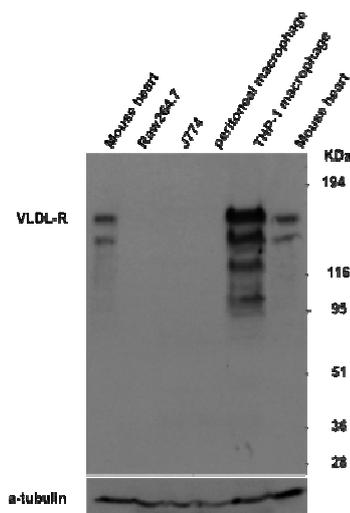


図 1 マウスマクロファージ細胞 VLDL 受容体蛋白の欠如

特記事項・発表論文など

「特記事項」

本研究では、頻用されているマウス動脈硬化モデルがヒト動脈硬化症研究に応用できないことを証明することが出来ました。この事実は動脈硬化研究の方向性を転換し、糖尿病患者の動脈硬化病変の治療・予防に貢献する結果であると考えました。

我々は 1992 年の VLDL 受容体発見論文から現

在までに、19 編の VLDL 受容体に関する欧米論文 (2 編は総説) を発表しております。2009.12.の時点での総被引用回数は 993 回であります。

「本研究に関わる発表論文」

現在 論文作成中です。学会発表は論文 accept 後に行う予定であります。