

学位の種類

博士

氏名

赤坂和美

学位論文題目

Homocysteine promotes p38-dependent chemotaxis
in bovine aortic smooth muscle cells

(ホモシステインによる p38 依存性の
ウシ大動脈平滑筋細胞走化性促進に関する研究)

共著者名

赤坂伸之、Gabriel Di Luozzo、笹嶋唯博、Bauer E Sumpio
Journal of Vascular Surgery Vol.41 No3. 517～522 頁
2005 年 3 月

研究目的

高ホモシステイン血症は動脈硬化の危険因子であることが知られている。その機序としては、ホモシステインによる血管内皮障害の報告が多くなされているが、血管平滑筋細胞 (SMC) の増殖機序も関与することが指摘されている。本研究の目的は、SMC の遊走に対するホモシステインの影響を明らかにし、さらに mitogen-activated protein kinase のひとつである stress-activated protein kinase 2 (p38) の活性がこの過程に関与しているか否かを明らかにすることである。

材料・方法

I. 細胞走化性

SMC は 子牛大動脈から採取し、10%ウシ胎児血清 (FBS) を加えた DMEM/F12 (1:1) にて 5%CO₂ 下 37°C にて培養した。0.5～2.0mmol/L の D,L-Homocysteine に対して SMC が走化するかを、ポアサイズ 8 μm のポリカーボネートフィルターと modified Boyden chamber を用いて検討した。

さらに SMC の遊走における p38 の関与を調べるために、p38 阻害薬である SB203580 を用いて 30 分間前処理した SMC を用いて、D,L-Homocysteine に対する走化性を前処理していない SMC と比較した。

また、SMC の 10%FBS への走化性を、D,L-Homocysteine による preconditioning の有無で比較した。

II. p38 のリン酸化

SMC を 2.0mmol/L の D,L-Homocysteine に 5～120 分間曝露したあとの phosphorylated p38 を Western blotting にて検出し、デンシトメトリーで測定した。また、SMC を 15 分間 0.1～2.0mmol/L の D,L-Homocysteine に曝露したあとの phosphorylated p38 についても検討した。

成 績

I. 細胞走化性

1.0、2.0mmol/L の D,L-Homocysteine を chemoattractant とした場合、走化した SMC は SFM に対して各々 4.4 ± 0.8 -fold ($n=15$; $p<0.01$)、 7.0 ± 1.2 -fold ($n=15$; $p<0.001$) に増加した。

また、p38 阻害薬である SB203580 ($10 \mu\text{mol/L}$)にて前処理した SMC は、SB203580 の溶媒である DMSO のみで前処理した SMC に比して、2.0mmol/L の D,L-Homocysteine に対する走化性が減弱していた (8.4 ± 1.4 -fold vs 15.2 ± 3.6 -fold; $n=3$; $p<0.01$)。

2.0mmol/L の D,L-Homocysteine にて preconditioning した SMC は、preconditioning していない SMC に比して、10%FBS への走化性は増強した (28.9 ± 3.3 -fold vs 15.6 ± 2.8 -fold; $n=3$; $p<0.05$)。preconditioning した SMC の走化性は、SB203580 により有意に阻害された (15.9 ± 2.1 -fold vs 29.2 ± 3.1 -fold; $n=4$; $p<0.01$)。

II. p38 のリン酸化

2.0mmol/L の D,L-Homocysteine に SMC を曝露すると、時間依存性に p 38 のリン酸化、すなわち p38 の活性化が認められ、ピークは 15 分後で 4.8 ± 1.4 -fold であった ($n=15$; $p<0.05$)。また、15 分間の曝露では濃度依存性に p 38 のリン酸化が認められ、2.0mmol/L の D,L-Homocysteine 曝露により、p38 のリン酸化は 4.0 ± 0.9 -fold に増強された ($n=6$; $p<0.05$)。

考 案

本研究において、私たちは SMC が D,L-Homocysteine に対して遊走すること、さらにはこの遊走は p38 阻害薬である SB203580 により有意に抑制されることを示した。また、SMC が D,L-Homocysteine に曝露されることにより、p38 のリン酸化が時間依存性、濃度依存性に認められた。これらの結果は D,L-Homocysteine が SMC にとって chemoattractant として作用しており、この過程において p38 が大きな役割を果たしていることを示している。活性化 P38 は heat shock protein 27 のリン酸化を引き起こすことにより、SMC の遊走に関わっていることが報告されているが、本研究においては P38 阻害薬の SB203580 が SMC 走化性を部分的にしか抑制していないことから SMC 遊走に複数の pathway が関与している可能性が示唆され、SMC 遊走の機序解明にはさらなる研究が必要である。

本研究において、SMC に作用したホモシステインの濃度は、in vitro での以前の報告と同様ではあるが、高ホモシステイン血症患者の血中濃度と比較するとやや高い濃度であった。しかし、in vitro での環境は、半減期の短いホモシステインが長時間常に一定の濃度を維持する生理学的環境とは異なる。たとえば上皮細胞におけるホモシステインの作用は in vitro では 2 時間で減弱し、24 時間後には完全に失われることも報告されている。

注目すべき結果は、D,L-Homocysteine による preconditioning が SMC の走化性を約 2 倍に増

強したことである。これはホモシステインが SMC に chemoattractive に作用するばかりでなく、SMC の遊走能自体を増強させることを示唆している。ホモシステインによるアテローム発生や血栓形成には、様々な機序が関与するとされるが、進行性肥厚内膜において血管壁中膜から内膜への SMC 遊走は重要な役割を果たしていると考えられ、SMC の遊走能増強はホモシステインによる動脈硬化促進の機序に大きく関わっているものと考えられる。

結 論

ホモシステインは SMC に対して chemoattractant として作用するだけでなく、SMC の走化能を増強しうることを示唆された。また、これらの作用機序の一部には p38 活性が関わっていることが明らかにされた。

引 用 文 献

- 1) Woo DK, Dudrick SJ, Sumpio BE. Homocysteine stimulates MAP kinase in bovine aortic smooth muscle cells. *Surgery* 2000; 128: 59-66
- 2) Hedges J, Dechert M, Yamboliev I, Martin J, Hickey E, Weber L, et al. A role for p38MAPK/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration. *J Bio Chem* 1999; 274: 24211-24219
- 3) Wall R, Harlan J, Harker L, Striker G. Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. *Thromb Res* 1980;18:113-121

参 考 論 文

- 1) 赤坂和美、秋葉裕二、石井良直、藤内智、長内忍、中野均、山下裕久、菊池健次郎. 睡眠時無呼吸症候群における冠動脈疾患の合併に関する検討—冠攣縮の関与について— *日本胸部疾患学会雑誌* 1997;35(1): 16~21
- 2) 赤坂和美、川嶋栄司、塩越隆広、石井良直、長谷部直幸、菊池健次郎. 肥大型心筋症における左房機能と左心耳血流速度：発作性心房細動合併の有無による比較. *Journal of Cardiology* 1998; 32(1): 31~38
- 3) Takahashi F, Hasebe N, Kawashima E, Takehara N, Aizawa Y, Akasaka K, Kawamura Y, Kikuchi K. Hyperinsulinemia is an independent predictor for complex atherosclerotic lesion of thoracic aorta in non-diabetic patients. *Atherosclerosis* 2006; 187: 336~342
- 4) 高井理江、赤坂和美、羽賀将衛、伊藤喜久、永峯晃、光部啓次郎、熱田義頭、小久保拓、角浜孝行、赤坂伸之、東信良、稲葉雅史、笹嶋唯博. 下肢血行再建術後の Duplex Scan によるグラフト不全診断の経験—その経時的観察の有用性— *The Journal of Japanese College of Angiology* 2006; 46: 99~103
- 5) 赤坂和美、稲葉雅史、高井理江、伊藤栄祐、山口基、小久保拓、古屋敦広、内田恒、赤坂伸之、東信良、笹嶋唯博. 血行再建術前後におけるバスキュラーラボの役割と重要性. *The Journal of Japanese College of Angiology* 2009 (in press)

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	赤坂和美
<p>審査委員長 牛首文隆</p> <p>審査委員 笹嶋唯博</p> <p>審査委員 長谷部直幸</p>			
<p>学位論文題目</p> <p>Homocysteine promotes p38-dependent chemotaxis in bovine aortic smooth muscle cells</p> <p>(ホモシステインによる p38 依存性のウシ大動脈平滑筋細胞走化性促進に関する研究)</p>			
<p>高ホモシステイン血症は、動脈硬化の危険因子であることが知られている。その機序として、ホモシステインによる血管内皮の障害や血管平滑筋細胞 (SMCs) の増殖促進が報告されている。しかし、その動脈硬化促進機構の詳細は不明である。</p> <p>本研究では、ホモシステインの SMCs 遊走に対する作用を明らかにし、その過程での stress-activated protein kinase-2 (p38) の関与を検討した。ホモシステインは、濃度依存的に SMCs の遊走を促進した。また、ホモシステインは FBS による SMCs の遊走を増強した。一方、これらホモシステインの SMCs 遊走あるいは走化性促進作用は、p38 阻害薬である SB203580 によって有意に抑制された。さらに、ホモシステインは、SMCs における p38 の活性化に伴うリン酸化を時間および濃度依存的に促進した。</p> <p>本研究の結果、ホモシステインは、SMCs の遊走および走化性を促進することが明らかとなった。また、その作用機構の一部に p38 の活性化が存在することが示された。これらの結果は、ホモシステインの動脈硬化促進効果における新規作用機序を明らかにした点に意義があるとともに、その臨床応用が期待される。</p> <p>なお、論文提出者に対し各審査委員より、本論文とその関連領域に関して試問が行われ、適切な回答が得られた。</p> <p>以上より、本論文は博士の学位論文として適切であると判定した。</p>			