

氏 名 (本籍)	いし だ いたる 石 田 格
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1 8 7 7 号
学位授与年月日	平 成 1 4 年 3 月 2 5 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 外科学系専攻
学 位 論 文 題 目	低酸素曝露による血管内皮細胞上のLPSレセプター 発現変化に関する研究

(主 査)

論 文 審 査 委 員	教授 近 藤 丘 教授 貫 和 敏 博
	教授 佐々木 巖

# 論文内容要旨

## 目 的

炎症の結果もたらされる組織の低酸素 (hypoxia) 状態は、炎症性サイトカインを含む様々な遺伝子発現を招来し、炎症の病態を修飾する要因となる。グラム陰性桿菌の菌体外膜を構成する lipopolysaccharide (LPS) は、LPS レセプターである Toll-like receptor 4 (TLR4) を介し血管内皮細胞をはじめとする多くの細胞を活性化する炎症惹起物質である。この TLR4 の発現変化は、LPS に対する細胞応答性に直接影響を及ぼす。本研究の目的は、hypoxia 曝露が血管内皮細胞の TLR4 発現変化と LPS 応答性に与える影響を培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた *in vitro* のモデルで検討すること、そして、この hypoxia による TLR4 発現変化のシグナル経路を解明することである。

## 方 法

HUVEC を hypoxia (PaO<sub>2</sub>: 35 torr) または normoxia (PaO<sub>2</sub>: 160 torr) 環境下で培養した。HUVEC の TLR4 mRNA 発現の変化を、Northern blot analysis および半定量的 RT-PCR 法にて測定した。細胞表面の TLR4 蛋白の発現変化を、抗ヒト TLR4 モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーにて測定した。LPS (50 ng/ml) 刺激による intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) の発現変化を、抗ヒト ICAM-1 抗体を用いたフローサイトメトリーにて測定し、細胞の LPS 応答性を評価した。ミトコンドリア由来の reactive oxygen species (ROS) は、hypoxia 刺激を細胞内に伝える 2nd messenger として重要であることが知られている。そこで、hypoxia による HUVEC の TLR4 発現変化のシグナルに、ミトコンドリア由来の ROS が関与しているか検討した。細胞内の ROS 産生量は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下に酸化され蛍光を発する CM-H<sub>2</sub>DCFDA を用いて蛍光プレートリーダーにて測定した。ミトコンドリアの ROS 産生を抑制するため、mitochondria site III inhibitor の myxothiazol (1 μM) を使用した。TLR4 の promoter region に存在する核内転写因子 AP-1 および IRF/PU.1 の転写活性を、electrophoretic mobility shift assay にて測定した。

## 結 果

hypoxia に曝露した HUVEC の TLR4 は、mRNA レベルでも蛋白レベルでも、発現が低下していた。hypoxia に曝露した HUVEC では、normoxia 群に比べて、LPS による ICAM-1 の発現増強が抑制されていた。hypoxia 曝露により、細胞内 ROS の産生が亢進した。

myxothiazol は、hypoxia による ROS 産生と TLR4 発現低下を抑制した。hypoxia 曝露により、AP-1 の転写活性が低下した。しかし、IRF/PU.1 の転写活性には変化を認めなかった。hypoxia 曝露による AP-1 転写活性低下は、myxothiazol 投与により抑制される傾向を認めた。

## 結 論

hypoxia に曝露した HUVEC では、ミトコンドリア由来の ROS を介した核内転写因子 AP-1 調節により TLR4 発現が低下し、LPS に対する細胞応答が抑制される。

## 審査結果の要旨

エンドトキシン (lipopolysaccharide : LPS) による細胞の活性化が、どのような機序で起こるのかは、多くの研究者の関心事であった。近年の研究により Toll-like receptor (TLR) が LPS の刺激を細胞内に伝えるレセプターであると考えられるようになり、TLR が脚光を浴びるようになった。本学位論文は、この LPS レセプターである TLR の発現と、炎症に伴う低酸素状態とを結び付け、低酸素曝露による TLR 発現変化を、培養細胞を用いた *in vitro* の実験を通して解析したものである。

本研究では、第一章で、培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) では、RT-PCR 法により TLR2 の発現を認めないことから、HUVEC では TLR4 が LPS のレセプターとして重要であることを示した。第二章では、ノーザンブロット法および特異的抗体を用いたフローサイトメトリーにより、TLR4 発現が、低酸素曝露により mRNA レベルでも、蛋白レベルでも低下することを明らかにし、低酸素に曝露した HUVEC では、LPS により惹起される intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) の発現増強が抑制されることを示した。第三章では、低酸素曝露による TLR4 発現の低下に至る細胞内シグナルに焦点をあてて実験を行った。低酸素曝露により、細胞内 ROS 産生が亢進し、核内転写因子 AP-1 の活性が低下することを示した。ミトコンドリア阻害剤である mixothiazol を用いると、低酸素曝露による細胞内 ROS の産生と TLR4 発現低下が抑制されることを明らかにした。

本論文の興味深い点は、低酸素に曝露されたとき、血管内皮細胞が TLR4 の発現を低下させ、LPS による過剰な炎症反応を抑制するという点である。さらに本研究では、低酸素曝露から TLR4 の発現低下に至るシグナル経路を追求し、低酸素による TLR4 の発現低下に、ミトコンドリア由来の ROS を介した核内転写因子 AP-1 調節が関与していることを示した。本研究は、RT-PCR 法、ノーザンブロット法、フローサイトメトリー、EMSA 法など、多彩な実験手法を用いてこれらの結論を導き出している。実験条件、実験手法は緻密に計画され、結論に至る考察も論理的である。

本論文は、学位授与に値するものとする。