

氏名(本籍)	三浦光弘(埼玉県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第3447号		
学位授与年月日	平成16年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	医学研究科		
学位論文題目	Insulin pretreatment inhibits p21 upregulation, p27 downregulation and apoptosis mediated by TNF-α in contact inhibited endothelial cells (接触阻害された血管内皮細胞において、TNF- α により誘発されるp21の発現の増加、p27の発現の減少、そしてアポトーシスはインスリン前投与によって抑制される)		
主査	筑波大学教授	医学博士	住田孝之
副査	筑波大学教授	医学博士	宮内卓
副査	筑波大学助教授	医学博士	小島寛
副査	筑波大学講師	医学博士	大塚定徳

論文の内容の要旨

(目的)

動脈硬化におけるプラークの破綻とびらんは、急性冠症候群を引き起こすと考えられている。一方、インスリンはある種の細胞には増殖効果を持ち、また他方ではアポトーシスを抑える効果を示すこともあり、様々な生理的作用を持つ。2型糖尿病や肥満症は冠動脈疾患や動脈硬化の進展に対する主要なリスクファクターであり、高インスリン血症を誘発する。高インスリン血症と冠動脈疾患との疫学的関係に関する研究は多いが、プラークの構成要素である血管内皮細胞の生存にインスリンがどのような作用をもつかは明確ではない。

2型糖尿病や肥満症では、脂肪細胞のTNF α の分泌の増加がインスリン抵抗性を引き起こすと考えられている。

本研究では、インスリンが血管内皮細胞の細胞増殖とアポトーシスとの関連に与える影響を見るため細胞周期の負の制御因子であるp21、p27CDK阻害因子の発現の変化について検討した。

(対象と方法)

1) 臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)は臍帯より採取し、Humedia EG2(KURABOU, Kurashiki, Japan)にて培養。4継代以前を実験に用いた。2) HUVECはコンフルエントまで培養したのち、各濃度のインスリンを含む2% FBS含有DMEMに培地交換し24時間インスリン前処理した後にTNF α 100ng/mlを投与し48時間経過観察した。インスリンによる前処理がTNF α 投与前後でHUVEC内のCKI(p21, p27)の発現にどのように影響するかをWestern blotting法にて検討した。3) 同時に、ヘキスト染色、TUNEL染色を行い、アポトーシスの発現頻度の変化を検討した。

(結果)

1) TNF α によりp21の発現は増加し、p27の発現は低下を認めた。2) インスリン前投与(0, 1, 10, and

100nM) により, 100nM にてタネル陽性率の低下を認めた。3) インスリン前投与により, p21 発現は低下し, p27 発現は増加した。

(考察)

p21 の発現は血管内皮細胞においては contact inhibition には増加せず, TNF α 刺激にて増加を認めた。このことから, p21 はアポトーシスの誘導と関わりがある可能性があることが示唆された。すなわち, p21 は p53 依存的に, TNF α によるアポトーシスに対する “checkpoint” の結果として発現が増強し, G1 停止にフィードバックしている可能性や, TNF α による NF- κ B の誘発により発現が増強している可能性もある。コンフルエントの血管内皮細胞にインスリンを投与しても p21 の発現は変化を認めなかったが, TNF α 刺激による p21 の発現の増加は 24 時間のインスリン前投与にて抑制された。このことは, インスリンそのものは p21 の発現経路に影響を与えないが, TNF α 刺激による p21 発現誘導経路に影響を与えていると思われる。

一方, p27 の発現は血管内皮細胞の contact inhibition にて増強し, 引き続き TNF α 刺激にて発現の低下を認めた。このことは, 血管内皮細胞を p27 が contact inhibition にて G1 期停止に誘導するのに対して, TNF α によりアポトーシスへ誘導される際には p27 の発現が低下することによって G1 期停止が解除されることを示唆している。さらに, この TNF α 刺激による p27 の発現の低下は 24 時間インスリン前投与にて抑制されたことから, インスリンによる抗アポトーシス作用の一部は p27 の発現が維持されることにより G1 期解除が減少するためと考えられる。

本研究の結果より CDK 阻害因子である p21 と p27 の制御が TNF α による血管内皮細胞のアポトーシスの誘導に関与していると考えられた。一方, インスリン前投与は TNF α による p21 と p27 の制御をキャンセルすることによって血管内皮細胞のアポトーシスを抑制する可能性が示された。高インスリン血症は動脈硬化の進行に深く関与していると考えられているが, 以上の結果より, インスリンによる細胞周期制御を介した血管内皮細胞のアポトーシスの抑制が動脈硬化の要因のひとつになりうる可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では, インスリンの血管内皮細胞の細胞増殖やアポトーシスに対する影響を検討することを目的とし, 細胞周期の負の制御因子である p21, p27CDK 阻害因子の発現について検討した。その結果, インスリンは, TNF α により誘導される p21 発現の増加, および p27 発現の減少を制御し, 血管内皮細胞のアポトーシスを抑制した。本研究は, 高インスリン血症による動脈硬化促進の分子メカニズムを明らかにする上で重要な知見であり, 高く評価されている。

よって, 著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。