

氏名(本籍)	藤原恭子(兵庫県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第2,150号		
学位授与年月日	平成11年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	細菌リポ多糖によるマクロファージの活性化と低密度リポ蛋白質酸化能の亢進		
主査	筑波大学教授	医学博士	林英生
副査	筑波大学教授	医学博士	山下亀次郎
副査	筑波大学助教授	医学博士	山口巖
副査	筑波大学講師	医学博士	范江霖
副査	筑波大学講師	薬学博士	田中栄之介

論文の内容の要旨

(目的)

生体内における低密度リポ蛋白質(LDL)の変性,特に酸化変性は粥状動脈硬化の主要な引き金であると考えられている。生体内でLDLが酸化される正確なメカニズムについては現在のところ不明であるが,動脈壁を構成する細胞を介して変性が起こることが推測されている。またLDLを遷移金属の存在下で,マクロファージ,繊維芽細胞等の細胞とともに培養すると,酸化変性を起こすことが報告されている。この現象は細胞媒介性LDL酸化と呼ばれ,LDL酸化の一つのモデル系となっている。この系では,遷移金属と並んで培地のシスチンが必須の因子であるが,シスチンは細胞により還元され,生じたSH化合物が,遷移金属と相互作用してラジカセを発生し,これがLDLを酸化すると考えられている。シスチンは細胞へ輸送担体の一種であるxc-系を介して取り込まれることから,この輸送担体の活性と,細胞媒介性LDL酸化に何らかの相関性があることが考えられた。一方,マクロファージはマウス腹腔より回収した当初はxc-活性をほとんど示さないが,培養とともにxc-活性が上昇することが知られている。しかしながら,この上昇の程度は用いる血清のロットによって異なっており,血清中に存在している何らかの物質がxc-活性に影響を与えている可能性が考えられた。その一つに,細菌リポ多糖(LPS)はマクロファージ活性化因子であり,マクロファージの代謝や運動を亢進させる。そこで,LPSはマクロファージのxc-を活性化するか,またその結果LDLの酸化が亢進するかどうか,この連鎖的反応について検討した。

(方法)

マウス(C57BL/6N)の腹腔より調製したマクロファージをLPS存在下,または非存在下で11時間培養し,RIラベルしたシスチンその他のアミノ酸の取り込み活性を測定した。この時のマクロファージの細胞内グルタチオン量,細胞外へのSH化合物産生量をそれぞれ,5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)を用いて調べた。SH化合物の同定・定量は蛍光試薬 monobromobimane でラベルし,逆相カラムを用いたHPLCによって行った。LDLの酸化は,100mg protein/mlのLDLをマクロファージと共に培養して行い,過酸化脂質の分解生成物であるマロンジアルデヒドの定量(TBA反応)およびアガロースゲル電気泳動法によって酸化LDLの生成を調べた。

(結果)

マクロファージを常法で培養した場合シスチン取り込み活性は低いが,LPSを添加すると大きく上昇した。このLPSの作用は0.01ng/mlの低い濃度より観察され,1ng/mlおよび 1×10^4 ng/mlの2ヶ所の濃度で活性ピー

クを示した。時間的には、LPS刺激後12時間でシスチン取り込み活性のピークがみられた。この他のマクロファージ活性化因子について検討したところ、TNF- α 、Zymozanにはxc-活性増強がみられたが、IL-1 β 、IFN- γ 、Phorbol myristate acetate等にはその作用はなかった。このxc-活性上昇に対応して細胞内グルタチオン量、細胞外へのSH化合物放出量も増加していた。細胞外へ放出されているものをHPLCで解析したところ、LPSの刺激に伴って増加しているものはシステインであった。また、LPS刺激を受けたマクロファージと共培養したLDLの酸化は、無刺激のマクロファージと共培養した場合と比較して強く起こった。このLPSの作用は濃度依存的であり、0.2ng-ml以上の濃度で効果が現れた。この作用は、xc-を活性化したTNF- α では見られたが、xc-を活性化能のないIL-1にはなかった。

(考察)

以上の結果より、マクロファージ活性化因子の一つであるLPSはxc-を活性化すること、この活性化に応じてシステイン放出量が増大することがわかった。またその結果としてLPSはマクロファージのLDL酸化能をも亢進した。同じくxc-活性化能のあったTNF- α 刺激によってもLDL酸化が亢進したこと、シスチン欠乏地ではLPSの効果がみられなかったことから、これはxc-活性化によるシステインの上昇が原因と考えられる。細胞媒介性LDL酸化はあくまでもモデル系であり、ここで得た結果を直接生体内での現象に結び付けるには飛躍があるが、動脈壁内などの組織に滲出しているマクロファージはある種の活性化された状態であることから、xc-が活性化し、それに伴うSH化合物産生が亢進して、LDL酸化活性の高い状態にある可能性もある。また、細胞外膜にLPSを有するある種の細菌の慢性感染が動脈効果のリスクファクターであるという報告がいくつかあり、本研究との関連を予想させる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

低密度リポ蛋白質(LDL)が酸化される血管内皮に障害がおこり粥状動脈硬化などを誘発することを着目し、またマクロファージにおいては細菌のリポ多糖体(LPS)によりシスチンの輸送系が活性化され、細胞外にシステインが高濃度に排泄され、これにより生じたSH基が遷移金属とともにたらしきLDLを酸化し、内皮細胞に何らかの障害を起こすのではないかという仮説で、実験研究を行った。LPSによるマクロファージのシスチンの輸送系の活性化、システインの排泄の増加、in vitroでのLDLの酸化などの部分反応は部分酵素の反応として解析され、理解できるが、LPSがLDLを酸化し粥状動脈硬化などを誘発するという一連の連続反応が生体内で起こっているか否かについては、その着眼点と部分解析結果にはオリジナリティを認めるが、確たる実証を得るには今後のさらなる詳しい解析が望まれる。

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。