



Bezafibrate attenuates the overexpression of plasminogen activator inhibitor-1 messenger RNA by a combination of mono-unsaturated fatty acid and insulin in HEPG2 cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 優子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1608

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 331号	学位授与年月日	平成13年 2月14日
氏 名	鈴木 優 子		
論文題目	<p>Bezafibrate attenuates the overexpression of plasminogen activator inhibitor-1 messenger RNA by a combination of mono-unsaturated fatty acid and insulin in HEPG2 cells (ヒト培養肝細胞におけるベザフィブレートによるプラスミノージェンアクチベーターインヒビター1の発現減弱効果)</p>		

博士(医学) 鈴木 優子

論文題目

Bezafibrate attenuates the overexpression of plasminogen activator inhibitor-1 messenger RNA by a combination of mono-unsaturated fatty acid and insulin in HEPG2 cells

(ヒト培養肝細胞におけるベザフィブレートによるプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1の発現減弱効果)

論文の内容の要旨

[はじめに]

血管内線溶では組織プラスミノゲンアクチベーター(tPA)とプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1(PAI-1)がその主役をなしており、線溶活性は両者のバランスにより規定されている。このバランスが崩れると血栓を生じたりあるいは逆に出血傾向を示したりする。血漿PAI-1値は、中性脂肪、総コレステロール、超低比重リポ蛋白(VLDL)濃度などと正相関し、臨床的には肥満、インスリン抵抗性あるいはNIDDM、高脂血症患者などで増加するため線溶活性が低下し、血栓形成に傾くとされる。血管内皮細胞、肝細胞などを用いた細胞培養実験では、これらの脂質により培養上清中のPAI-1蛋白量が増加することが報告されている。また血中脂質低下作用をもつフィブレート系などの薬剤では、線溶能が改善するとの報告もあるが未だ一定の見解が得られていない。一方、核内受容体の一つであるペルオキシソーム増殖剤応答性受容体(PPAR) γ のリガンドとして作用するチアゾリジン誘導体により、インスリン抵抗性の改善のみならず血漿PAI-1活性も低下することが報告されている。そこで、糖・脂質代謝に関し重要な器官の一つであり、PAI-1の産生も報告されている肝臓において脂肪酸、更にはベザフィブレート、トログリタゾンなどの薬剤がPAI-1発現にどのように関与するかを検討した。

[材料ならびに方法]

ヒトの肝癌細胞(HepG2)を用いた。通常の細胞培養法に従い継代培養し、実験には、細胞を 7.5×10^3 cells/cm²でまき4日間培養した後、1%FBSを含む培地に交換し、一晚培養したものを用いた。

- (1) 細胞をインスリンの存在下及び非存在下で種々濃度のオレイン酸、リノール酸と24時間培養し、培養上清と細胞から抽出されたRNAを得た。
- (2) 細胞をオレイン酸とインスリンの存在下及び非存在下で、種々濃度のベザフィブレート、トログリタゾンを添加して24時間培養後、培養上清と細胞から抽出されたRNAを得た。
- (3) (1)及び(2)の培養上清中のPAI-1蛋白量をELISA法で、またPAI-1mRNA発現量をnorthern blot法で解析した。

[結果]

- (1) コントロール状態では、24時間培養後の培養上清中のPAI-1蛋白濃度は 193 ± 7 ng/mlであった。オレイン酸を 100μ M、インスリンを10nM添加すると上清中のPAI-1蛋白量は2.3倍に増加した(438 ± 31 ng/ml、 $p < 0.001$)が、それぞれ単独添加では明らかな増加効果は認められなかった。PAI-1mRNA発現量はオレイン酸とインスリンにより約3倍の有意な増強を示した。
- (2) ベザフィブレート単独、ベザフィブレートとオレイン酸あるいはインスリンの添加ではPAI-1蛋白量

及びmRNA発現量は変化しなかった。オレイン酸とインスリンの両者の存在下では、ベザフィブレートはPAI-1蛋白量を濃度依存性に減少させ、100 μ Mの濃度で約30%の減少を認めた。

- (3) トログリタゾンもオレイン酸とインスリンの両者の存在下でのみPAI-1mRNA発現量を変化させた。しかしその効果はベザフィブレートと逆で1 μ Mで約40%増加させた。PAI-1蛋白量もPAI-1mRNAと同様に増加した。

[考察および結論]

HepG2細胞においてオレイン酸とインスリンによるPAI-1発現誘導と、ベザフィブレートおよびトログリタゾンによるその発現抑制並びに増強について示した。

最近、ヒトPAI-1遺伝子のプロモーター領域に、不飽和脂肪酸によりPAI-1遺伝子発現が誘導されると考えられるVLDL/fatty acid response elementの存在が報告された。オレイン酸は何らかの転写因子を介してVLDL/fatty acid response elementに作用してPAI-1発現を誘導している可能性が示唆された。これにインスリンが不可欠であることは興味深く、臨床的には高脂血症のみならずインスリン抵抗性あるいは高インスリン状態などの病態での血漿PAI-1値の上昇と関連する可能性が示唆された。

ベザフィブレートはPPAR α を活性化し、またトログリタゾンはPPAR γ のリガンドであるが、その作用発現機構としてレチノイドX受容体に結合後、共に標的遺伝子上のその特異的なresponse elementに作用するとされている。オレイン酸とインスリンの両者の存在下で、ベザフィブレートはそのPAI-1発現誘導を抑制し、一方トログリタゾンはさらに増強させた。種々のフィブレートによるPPAR α の活性化の程度とPAI-1産生抑制効果が一致しないとの報告もあり、ベザフィブレートによるPAI-1発現減弱効果はPPARに存在しない別の機構による可能性が推察された。

論文審査の結果の要旨

血管内線溶活性は組織プラスミノゲンアクチベーター(tPA)とプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1(PAI-1)のバランスにより規定され、これが崩れると血栓症、出血傾向などを示す。血漿PAI-1値は、肥満、インスリン抵抗性あるいはNIDDM、高脂血症患者などで増加がみられ、線溶活性の低下をきたし、血栓形成傾向となる。これらの病態時でのPAI-1値の増加には、脂肪組織、肝臓および血管内皮などでの産生亢進が関与すると言われる。今回は脂肪組織からの遊離脂肪酸の影響を直接にうける臓器として肝臓に注目し、肝細胞での脂肪酸とインスリンによるPAI-1発現への影響、さらに核内受容体の一つであるペルオキシソーム増殖剤応答性受容体(PPAR)を活性化するフィブレート、チアゾリジン誘導体などの薬剤によるPAI-1発現修飾に関し検討した。

ヒト肝癌細胞(HEPG2)を5日間培養した後、インスリンの存在下及び非存在下で種々濃度のオレイン酸と24時間培養したもの、オレイン酸とインスリンの存在下及び非存在下で種々濃度のベザフィブレートあるいはトログリタゾン(チアゾリジン誘導体)を添加して24時間培養したもの、に対し、培養上清中のPAI-1蛋白量をELISA法で、またPAI-1mRNA発現量をnorthern blot法で解析した。

これにより以下の結果が得られた。

- (1) オレイン酸を100 μ M、インスリンを10nM添加すると上清中のPAI-1蛋白量は2.3倍に増加し、mRNA発現量は3倍の増強を示したが、それぞれ単独添加では有意な増加効果は認められなかった。(2)

ベザフィブレート単独、ベザフィブレートとオレイン酸あるいはインスリンの単独添加ではPAI-1蛋白量及びmRNA発現量は変化しなかった。オレイン酸とインスリンの両者の存在下では、ベザフィブレートはPAI-1蛋白量を濃度依存性に減少させ、100 μ Mの濃度で約30%の減少を認めた。(3)オレイン酸とインスリンの両者の存在下でトログリタゾンはPAI-1蛋白量およびmRNA発現量を1 μ Mで約40%増加させた。

ベザフィブレートのオレイン酸とインスリンによるPAI-1発現誘導の抑制機序において、インスリンの作用は不可欠であると推察された。一方トログリタゾンはさらにPAI-1発現誘導を増強させており、肝細胞におけるPAI-1発現とPPARとの関連については今後さらに検討していく必要があると思われる。

本論文に関し、申請者に次のような質問がなされた。

- 1) インスリンがPAI-1産生を増加させる機序
- 2) オレイン酸以外の不飽和脂肪酸でも同じ効果がみられるか
- 3) オレイン酸とインスリンの添加で細胞数は変化しないか
- 4) PAI-1抗原量は活性型と非活性型のどちらを検出しているのか
活性型のみを測定すべきではないか
- 5) インスリン濃度を10nMに設定した理由は
- 6) 統計処理は適切か
- 7) PAI-1のプロモーター領域にPPREはあるか
- 8) オレイン酸とインスリンのPAI-1発現への相互作用の関係

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 菱 田 明

副査 梅 村 和 夫 副査 渡 邊 裕 司