



Do polymorphonuclear leukocytes contribute to pathogenesis of atherosclerosis ? : the effects on low density lipoprotein oxidation and adhesion to endothelial 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: 大石, 裕子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1139

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	医博第 286号	学位授与年月日	平成11年 3月26日
氏名	大石裕子		
論文題目	Do polymorphonuclear leukocytes contribute to pathogenesis of atherosclerosis? : the effects on low density lipoprotein oxidation and adhesion to endothelial cells (動脈硬化の成因に好中球は関与するか?—好中球の低比重リポ蛋白の酸化と血管内皮細胞への接着の検討)		

博士(医学) 大石裕子

論文題目

Do polymorphonuclear leukocytes contribute to pathogenesis of atherosclerosis? : the effects on low density lipoprotein oxidation and adhesion to endothelial cells

(動脈硬化の成因に好中球は関与するか?—好中球の低比重リポ蛋白の酸化と血管内皮細胞への接着の検討)

論文内容の要旨

[はじめに]

糖尿病では高率に動脈硬化を合併する。その成因に、酸化低比重リポ蛋白 (LDL) と単球マクロファージの関与がいられている。しかし、生体内のどこで、どの細胞が LDL の酸化をしているかについて、見解の一致を見ない。LDL の酸化に旺盛な活性酸素産生能を有する好中球が関与する可能性を単球と比較して検討した。また、糖尿病では慢性的な高血糖が蛋白を糖化変性させる。糖化 LDL が健常人よりも高い濃度で糖尿病患者の血中から検出された報告があるが、糖化 LDL と糖尿病性血管障害の発生との間の相関は認められていない。こうした変性 LDL が血管内皮細胞への好中球および単球の接着を惹起するか否か、その結果、好中球も動脈硬化病変に関与する可能性があるかについても調べた。

[材料ならびに方法]

健常人より空腹時採血した血漿から比重調整後、LDL を超遠心法にて得た (非変性 LDL)。単球ならびに好中球も健常人より血球分離液を用いてそれぞれ回収した。LDL の一部は 100mM グルコースにて糖化させた (糖化 LDL)。また、非変性 LDL および糖化 LDL はさらに塩化銅 5 μ M にてそれぞれ酸化させた (酸化 LDL および糖酸化 LDL)。単球あるいは好中球を各変性 LDL と 60 分インキュベーションし、血球成分を除いた後、各 LDL を回収し、各血球による LDL の過酸化度をチオバルビツール酸反応生成物検出法にて測定した。また、LDL とのインキュベーションにて血球から放出されたスーパーオキシド (O_2^-) をチトクローム法にて測定した。一方でヒト臍帯静脈血管内皮細胞を培養し、内皮細胞をあらかじめ各 LDL にて 6 時間インキュベーションした条件にて血球の内皮細胞への接着能が亢進されるかについて、蛍光染色を用いて観察した。

[結果]

1. 白血球による LDL の過酸化

各 LDL を好中球とインキュベーションした結果、各 LDL はさらに過酸化されたが各 LDL 間で増加の割合の差は見られなかった (非変性 LDL : 2.7 ± 0.7 、糖化 LDL : 2.5 ± 0.8 、糖酸化 LDL : 2.1 ± 0.3 、酸化 LDL : 2.1 ± 0.4 倍)。好中球を PMA で刺激して O_2^- を放出させた条件下でも、過酸化の進展はなく、単球と各 LDL をインキュベーションしても有意過酸化は認められなかった。

2. 好中球からのスーパーオキシド (O_2^-) の産生に対する変性 LDL の関与

好中球と各変性 LDL 間を接触させた時、好中球から O_2^- の産生は認められたが好中球自身の呼吸活動による産生量と差はなかった (好中球のみ : 94.0 ± 44.2 、非変性 LDL : 75.2 ± 24.3 、酸化 LDL : 69.1 ± 22.1 、糖酸化 LDL : 69.5 ± 18.1 、酸化 LDL : $68.6 \pm 17.5 \mu\text{M} / \text{min} / 10^5 \text{cells}$)。

3. 血球の内皮細胞への接着に対する変性 LDL の関与

単球は非変性LDL、酸化LDLよりも糖酸化LDLおよび酸化LDLによって前処理された内皮細胞に強く接着した (control: 8.32 ± 0.65 、非変性LDL: 10.68 ± 0.65 、糖化LDL: 10.54 ± 1.11 、糖酸化LDL: 21.64 ± 2.72 、酸化LDL: $19.60 \pm 1.67\%$ 、 $p < 0.05$ vs control)。しかし、好中球では各LDL間に差は見られず、コントロールと比しても接着の亢進は認めなかった。

〔結論〕

LDLの糖化変性が易酸化性であることは認められなかった。しかし、好中球はどの変性度のLDLでもそれらを単球より酸化することができた。一方で単球は変性LDLで前処理された内皮細胞に対して接着能が亢進した。しかし、好中球では接着は起こらなかった。

〔考察〕

好中球は循環血中でLDLとの接触にて過酸化を起こすことで、生体内のLDLの酸化変性に関与する可能性が示唆された。しかし、内皮細胞への単球の接着は酸化LDLにより惹起されたのに対して、好中球には起こらなかった。血管内皮細胞への血球の接着および内皮下への浸潤が動脈硬化病巣の成立の契機と考えられることから、好中球の動脈硬化進展への関与は少ないと思われた。

論文審査の結果の要旨

糖尿病では高率に動脈硬化を合併するが、酸化低比重リポ蛋白 (LDL) が重要な役割をしているといわれている。しかし、酸化LDLの生成過程は未だ解明されていない。また、糖尿病患者では糖化LDLが多く生成されるが、それと血管病変との関係は未だはっきりしていない。さらに、糖尿病の血管病変は血管炎を呈しており炎症細胞である好中球の関与が疑われる。

そこで、申請者は酸化LDLの生成に好中球が関与しているかを検討した。さらに、酸化あるいは糖化LDLが好中球や単球の血管内皮への接着を促進するかどうかを検討した。

- 1) 非変性LDLは健常人より空腹時採血した血漿から超遠心法にて得た。糖化LDLは非変性LDLを100 mMグルコースにて糖化した。酸化LDLおよび糖酸化LDLは非変性LDLおよび糖化LDLを塩化銅5 μ Mにて酸化した。
- 2) 好中球ならびに単球は健常人より血球分離液を用いて回収した。好中球あるいは単球が変性LDLをさらに過酸化するかどうかを検討するために、それぞれを変性LDLとインキュベーションし、その後のLDLの過酸化度をチオバルビツール酸反応生成物検出法にて測定した。
- 3) 変性LDLが好中球あるいは単球を刺激し、スーパーオキシドを産生させるかどうかを検討するために、それぞれを変性LDLとインキュベーションし、その後に放出されたスーパーオキシドをチトクローム法にて測定した。
- 4) 変性LDLが好中球あるいは単球の内皮への接着を促進するかどうかを検討するために、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞をあらかじめ変性LDLと6時間インキュベーション後に、好中球あるいは単球が内皮細胞へ接着するかを蛍光染色を用いて測定した。

これにより、以下の結果が得られた。

1) 好中球あるいは単球によるLDLの過酸化

好中球は酸化LDLをさらに酸化させた。また、好中球をPMAで刺激しスーパーオキシドを放出さ

せても、さらなる過酸化の進展はなかった。単球においては変性 LDL のさらなる過酸化はみられなかった。

2) 好中球あるいは単球からのスーパーオキシドの産生

変性LDLは好中球あるいは単球を刺激しスーパーオキシドの産生を促さなかった。

3) 好中球あるいは単球の内皮細胞への接着

変性LDLは好中球の接着を亢進させなかった。しかし、糖酸化LDLおよび酸化LDLは単球の内皮細胞への接着を亢進させた。

好中球は酸化 LDL の生成を促進し、この作用によって単球の内皮細胞への接着を亢進させ動脈硬化を進展させる可能性が示された。しかし、好中球自身の血管内皮細胞への接着および内皮下への浸潤が動脈硬化病巣の成立に関与している可能性は少ないと思われた。

本論文内容の説明の後、論文内容と関連の深い以下の点について申請者との間に質疑応答がなされた。

- 1) 酸化LDLの酸化度の程度
- 2) 実験で用いる時の酸化LDLの安定性
- 3) 糖化度の測定法
- 4) 脂質過酸化の測定法
- 5) 実験に用いたLDL濃度と単球、好中球数の妥当性
- 6) 単球におけるラジカル受容体の存在
- 7) PMA刺激時のスーパーオキシド産生能
- 8) 好中球とインキュベーションした際の酸化LDLをさらに酸化させた理由
- 9) 単球と好中球の内皮接着における機序の差異
- 10) 本研究の今後の発展性

以上の質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、本論文は博士(医学)の学位授与にふさわしい内容を備えていると審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 梅村 和夫

副査 教授 大関 武彦 副査 助教授 浦野 哲盟