

論文要旨等報告書

氏名	岩田宏隆
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3 5 6 7 号
学位授与の日付	平成 2 0 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	高血糖状態でlipopolysaccharide刺激を受けたヒト単球系細胞株THP-1におけるサイトカイン産生性の変化および細胞内刺激伝達分子の活性化に関する研究
論文審査委員	教授 福井 一博 准教授 久保田聡 教授 高柴 正悟

学位論文内容の要旨

糖尿病患者では血中のtumor necrosis factor-alpha (TNF- α) やmonocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) が上昇しており、これらは主に単球・マクロファージから産生されると考えられている。また、高血糖下の単球では、細胞内刺激伝達分子の一つであるprotein kinase C (PKC) が活性化している。これらの事実は、糖尿病患者における単球・マクロファージの活性化と血管壁における泡沫化の助長を示唆するものであり、動脈硬化の重症化を説明する一要因と考えられてきた。しかし、他方、血糖コントロールのみでは、冠状動脈性心疾患のリスクを大幅に軽減することは困難であるとの報告もある。近年、歯周炎が、糖尿病患者において動脈硬化の進行促進因子となることが示唆された。高血糖の影響を受けた単球が、歯周炎由来の感染抗原刺激を受けることで、血管壁における炎症反応が助長され、動脈硬化がより進行する可能性がある。しかし、高血糖下の単球が感染抗原刺激を受けた際の動態については未だ明らかではない。そこで、本研究では、高血糖状態でlipopolysaccharide (LPS) 刺激を受けた単球系細胞株THP-1において、活性化細胞内刺激伝達分子の同定および炎症性サイトカインの産生性を調べることを目的とした。

【材料および方法】

- THP-1の培養**：THP-1は10 mM Hepes (SIGMA), 10 % ウシ胎児血清 (CANCERA International), 1 % ペニシリンストレプトマイシン, 1 % L-グルタミン酸, 1 % ピルビン酸ナトリウムを含むRPMI 1640培地 (以上Invitrogen) を用いて5.0 % 炭酸ガス存在下で培養し, 100 mM phorbol 12-myristate 13-acetate (SIGMA) を用いてMethaらの方法に従い分化させ, 実験に供じた。
- 高血糖状態下のLPS刺激THP-1細胞で産生が亢進するサイトカインのスクリーニング**：高血糖下の分化THP-1をLPSで24時間刺激した際に, 正常血糖下で同様の刺激を受けた細胞と比較して, 産生が増加するサイトカインをサイトカインアレイ (Ray Biotech) でスクリーニングした。
- 高血糖状態下のLPS刺激THP-1細胞で産生が亢進するサイトカインの定量**：上記2でスクリーニングした結果よりTNF- α およびMCP-1に着目し, その産生量を市販のenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キット (Endogen) で定量した。
- 高血糖状態下のLPS刺激THP-1細胞でより活性化する刺激伝達分子のスクリーニング**：高血糖下の分化THP-1をLPSで10分刺激した際に, 正常血糖下で同刺激を受けた細胞と比較して, 活性化が増強される刺激伝達分子を抗体マイクロアレイ (PanoramaTM Ab Microarray Cell Signaling: SIGMA) を用いてスクリーニングした。

5. **高血糖状態下のLPS刺激THP-1細胞で活性化した刺激伝達分子の確認**：上記4のスクリーニング結果を参考に、高血糖下でLPS刺激を受けたTHP-1でc-jun N-terminal kinase (JNK) のリン酸化が増強されるかどうかをイムノブロット法で確認した。またJNK以外の mitogen activated protein kinaseである extracellular regulated protein kinase および p38 mitogen activated protein kinase のリン酸化も確認した。
6. **JNKおよびPKC活性を阻害した場合のTNF- α およびMCP-1の産生量の定量**：JNK阻害剤であるSP600125, SP600125の異性体でJNKに対する親和性が弱い陰性対照ペプチドあるいはPKC阻害剤であるGF109203X (以上Calbiochem) を種々の濃度で添加した後、細胞をLPSで24時間刺激した。その後、得られた培養上清について、上記と同様のELISA kit を用いてTNF- α およびMCP-1の産生性を調べた。

【結果】

高血糖下でLPS刺激を受けたTHP-1は正常血糖下で同様の刺激を受けた細胞と比較して、

1. TNF- α およびMCP-1の産生が亢進した。
 2. JNKの活性が増強した。
- さらに、
3. 上記1のTNF- α およびMCP-1の産生亢進は、JNK阻害剤により、その濃度依存的に抑制された。またこれらサイトカイン産生亢進はPKC阻害剤によってもある程度抑制されるが、その程度はJNK阻害剤の場合と比較するとはるかに低いものであった。

【考察】

以前から、血管壁における単球の泡沫化には、TNF- α やMCP-1などが関与すると考えられている。また、糖尿病患者のインスリン分泌不全などの糖尿病の病態形成に、JNKの活性化が関わると考えられている。本研究の結果は、高血糖下の単球系細胞が、LPS刺激で、主にJNKの活性化を介してTNF- α およびMCP-1の産生をさらに亢進することを明らかにした。そして、このことが糖尿病本来の病態形成のみならず、動脈硬化の進行にも関与する可能性を示唆した。他方、糖尿病患者においては重度の歯周炎が合併しやすい。本研究の結果は、糖尿病患者において感染症由来の炎症反応が増強する理由の一つである可能性があり、糖尿病患者における歯周炎の重症化を説明する要因となるかもしれない。

【結論】

高血糖下の単球が LPS 刺激を受けると、正常血糖下の細胞が LPS 刺激を受けた場合と比較して、炎症性サイトカインである TNF- α と MCP-1 を高産生し、このサイトカイン産生の亢進には主として JNK の活性化が関与することを明らかにした。

論文審査結果の要旨

単球は血管壁において泡沫化し動脈硬化の病態に深く関わる。糖尿病患者は健常者と比較して動脈硬化を合併しやすいが、血糖を十分にコントロールするのみでは、糖尿病患者における動脈硬化に起因する冠状動脈性心疾患のリスクを、大幅に軽減することは困難であると考えられている。近年糖尿病患者において、軽微で持続的な感染症である歯周炎が動脈硬化の進行促進因子となることが示唆された。このことは、高血糖下の単球が正常血糖下と比較して、感染抗原に対して過剰に反応する可能性を示唆している。

高血糖状態下において感染抗原負荷がかかった場合の単球の動態を明らかにすることは、糖尿病患者においてより高頻度に発症・進行する動脈硬化への感染症の関与を機序の面から明らかにする上で極めて重要な課題である。

本研究では、高血糖状態で lipopolysaccharide (LPS) 刺激を受けたヒト単球系細胞株 THP-1 細胞において、活性化される細胞内情報伝達分子の同定、およびその際の炎症性サイトカインの産生量の変化を調べることを目的とした。

申請論文は以下の内容を示すものであった。

高血糖下で LPS 刺激を受けた単球では、正常血糖下で同様の刺激を受けた細胞と比較して、

- 1) tumor necrosis factor- α (TNF- α) および monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の産生が亢進した。
- 2) c-jun N-terminal kinase (JNK) がより強く活性化した。

さらに

- 3) JNK を阻害すると TNF- α および MCP-1 の産生量は、阻害剤の濃度依存的に抑制された。また、protein kinase C を阻害した場合は、TNF- α および MCP-1 の産生量はある程度抑制されるが、その程度は JNK 阻害剤を用いた場合と比較すると、はるかに低いものであった。

以上より、高血糖状態下で LPS 刺激を受けた単球は、主に JNK 経路の活性化を介して炎症性サイトカインを高産生することが明らかとなった。この事実は歯周炎に罹患した糖尿病患者で、動脈硬化がより進行する原因の一端を説明しうるものであり、JNK 阻害による動脈硬化の進行抑制といった臨床応用への道を開くものである。よって本申請論文は博士（歯学）の学位論文として価値があるものと認めた。