

論文内容の要旨

【研究の目的】

血管内皮の酸化 LDL 受容体として同定されたレクチン様酸化 LDL 受容体-1(LOX-1)の軟骨細胞での発現が知られ、酸化低比重リポ蛋白(酸化 LDL)と軟骨変性の関連が注目されている。一方、単球走化性蛋白-1(MCP-1)が軟骨細胞にも発現し軟骨変性に関与することが示されている。

本研究の目的は軟骨細胞における酸化 LDL・LOX-1 結合による MCP-1 の発現、さらに MCP-1 発現における核内転写因子 NF-κB 活性の関与を検討することである。

【方法】

正常ヒト軟骨細胞の培養液中に恒常的にレクチン様酸化受容体-1(LOX-1)が発現していることを RT-PCR 法にて確認、酸化 LDL を添加し発現を検討した。つづいて同様に酸化 LDL を添加し MCP-1 の発現を RT-PCR 法ならびに ELISA 法にて検討、同時に抗 LOX-1 抗体による抑制実験を行った。さらにその経路が NF-κB を介していることを NF-κB の活性化を NF-κB p65 DNA binding activity を ELISA 法にて測定し、NF-κB の inhibitor を用いて MCP-1 発現抑制をみた。

【結果】

正常ヒト軟骨細胞の培養液中に RT-PCR 法にて LOX-1 の恒常的な発現を認め、酸化 LDL を添加し用量依存性に発現の増加を認めた。また、酸化 LDL を添加し MCP-1 が経時的増加ならびに用量依存性に RT-PCR 法にて発現し、ELISA 法にて産生されていることを認め、さらに抗 LOX-1 抗体による抑制実験にて有意に抑制を認めた。さらに酸化 LDL を添加する事で NF-κB が活性化することを ELISA 法による NF-κB p65 DNA binding activity で確認し、同時に NF-κB の inhibitor を用いて MCP-1 発現抑制を認めた。

【考察】

以上の結果より、酸化 LDL・LOX-1 結合は NF-κB を介して MCP-1 の発現亢進に関与していることが明らかになった。酸化 LDL による軟骨変性のメカニズムの一つに、NF-κB を介した MCP-1 発現亢進があることが示唆された。

【結論】

本研究は、酸化 LDL が NF-κB 活性化を介して軟骨細胞での MCP-1 産生の亢進を生じ、軟骨組織の加齢現象や変性の進行に重要な役割を果たしていることを示唆するエビデンスの一つを示すことが出来たと考える。

博士論文の印刷公表	公表年月日	出版物の種類及び名称
	平成20年 月 日 公表予定	出版物名 近畿大学医学雑誌 第33巻 第2号
	公表内容	平成20年 月 日 発行予定
	全文	

氏名	うえ だ あき ひさ 上田 晃久
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医第976号
学位授与の日付	平成21年3月21日
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当
学位論文題目	酸化低比重リポ蛋白(酸化 LDL)によるヒト培養軟骨細胞の単球走化性蛋白-1(MCP-1)発現亢進:レクチン様酸化低比重リポ蛋白受容体(LOX)-1との結合による核内転写因子 NF-κB 活性化の関与
論文審査委員(主査)	教授 濱 西 千 秋
(副主査)	教授 伊 藤 浩 行
(副主査)	教授 義 江 修

## 論文審査結果の要旨

変形性関節症(OA)のリスクファクターとして生活習慣病である高血圧症、高脂血症を挙げる疫学調査の結果がある。当教室では、動脈硬化症の重要な原因物質とされる酸化低比重リポ蛋白(酸化LDL)とその受容体であるレクチン様酸化LDL受容体-1(LOX-1)が軟骨代謝に与える影響について報告を行ってきた。すなわち、in-vivoではヒトOA軟骨における酸化LDLの存在、軟骨細胞におけるLOX-1発現を示し、軟骨変性との関連を示唆し、in-vitroでは培養軟骨細胞を用いて酸化LDLとLOX-1の結合は細胞内活性酸素種(ROS)の産生を介して、核内転写因子NF- $\kappa$ Bの活性化を行うことを示した。しかし、酸化LDLによるNF- $\kappa$ B活性化の結果、どのような遺伝子発現が生じるかについては不明であった。

一方、以前より関節リウマチなどの炎症性関節症の病態におけるケモカイン・ケモカイン受容体系の関与が示されてきた。近年、OAにおいてもその病態との関連が報告された。すなわち、関節軟骨細胞はケモカインを産生するとともに、ケモカイン受容体を発現していることが示され、リガンドの結合により基質分解酵素の発現亢進を生じ、オートクライン・パラクライン的に軟骨組織の変性に関与することが明らかにされた。最近、軟骨細胞におけるケモカイン発現にはNF- $\kappa$ Bの活性化が関与するとの報告があり、本研究ではこれに着目した。すなわち、培養ヒト軟骨細胞を用いて酸化LDLとLOX-1結合がケモカインの一種である単球走化性蛋白-1

(MCP-1)の発現亢進を行うかどうかを検索すると共に、MCP-1発現亢進におけるNF- $\kappa$ B活性化の関与について明らかにすることが本研究の目的である。

本論文では、まず、軟骨細胞の酸化LDL刺激によるMCP-1の発現について検討した。培養ヒト軟骨細胞に酸化LDLを添加するとMCP-1 mRNAおよび蛋白発現は経時的・経量的に増加し、また、抗LOX-1抗体を用いてLOX-1をブロックすると、MCP-1発現は著しく抑制された。従って、MCP-1発現の亢進は、LOX-1との結合を介すると思われた。また、このMCP-1発現亢進は48時間後にも継続していた。次に、NF- $\kappa$ B活性化について検討したところ、酸化LDLとLOX-1結合によりNF- $\kappa$ Bの活性化が認められ、この活性化には明確な用量反応が認められた。さらに、NF- $\kappa$ B活性化阻害薬による前処理を行うと、酸化LDLによるMCP-1発現の著しい抑制が見られた。これらのことより、酸化LDLはその受容体LOX-1と結合することによりNF- $\kappa$ Bを活性化し、その結果MCP-1発現が亢進することが明らかになった。これは、軟骨細胞におけるMCP-1発現の新たな経路を示すものである。

次いで本論文では、軟骨細胞におけるMCP-1発現の病的意義について考察している。すなわち、軟骨細胞によるMCP-1産生は、その受容体CCR2が関節症軟骨細胞に発現するためオートクライン・パラクライン的に軟骨組

織の基質分解に関与している点を挙げ、酸化 LDL 刺激による MCP-1 発現亢進は炎症細胞の関節内遊走による関節炎の慢性的持続のみならず、軟骨基質の分解による軟骨変性に繋がる可能性を述べている。また、酸化 LDL 刺激による MCP-1 発現が刺激後 48 時間を経過しても依然として認められることは、ポジティブフィードバック回路の存在を伺わせると考察している。その理由として、リガンドである酸化 LDL がその受容体 LOX-1 の発現亢進を行うことより、発現亢進した LOX-1 を介して酸化 LDL はさらに MCP-1 の発現亢進を持続することを挙げている。

酸化 LDL と LOX-1 の結合による NF- $\kappa$ B 活性化は最終的に MCP-1 産生を生じ、軟骨変性に繋がる可能性を示した本論文は、昨今の高齢化社会にて著しい増加を示す OA の進展、増悪に関わる一因子として酸化 LDL が存在することを細胞レベルで示し、変形性関節症の病態理解と新たな予防・治療戦略に新たな局面を提示したとすることができる。

以上をふまえ、主査と副主査は規定の各種審査試験、ならびに博士学位論文公聴会（平成 20 年 9 月 18 日）を実施し、慎重に審査した結果、本論文は博士（医学）学位論文に十分値すると判断された。

氏 名	ちば てる あき 千葉 輝 明
学位の種類	博 士 (医学)
学位記番号	医 第 9 7 9 号
学位授与の日付	平 成 21 年 3 月 21 日
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Quantitative evaluation of norcholesterol scintigraphy, CT attenuation value, and chemical-shift MR imaging for characterizing adrenal adenomas (副腎腺腫におけるノルコレステロールシンチグラフィ、CT 値、MRI 化学シフトの定量的評価)
論文審査委員 (主 査)	教 授 宮 崎 俊 一
(副主査)	教 授 池 上 博 司
(副主査)	教 授 佐 賀 俊 彦