

氏 名 (本 籍)	佐 藤 喜 祝 (大阪府)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 3 6 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 9 年 3 月 2 6 日
学 位 論 文 題 目	Increased expression of CCAAT/enhancer binding protein- and - and monocyte chemoattractant protein-1 genes in aortas from hyperinsulinaemic rats  (高インスリン血症ラットの大動脈では CCAAT/enhancer binding protein-beta, -delta および monocyte chemoattractant protein-1 遺伝子の発現が増加する)
審 査 委 員	主 査 教 授 堀 江 稔 副 査 教 授 上 島 弘 嗣 副 査 教 授 遠 山 育 夫

## 論文内容要旨

*整理番号	541	(ふりがな) 氏名	さとうよしのり 佐藤喜祝
学位論文題目	Increased expression of CCAAT/enhancer binding protein-beta and -delta and monocyte chemoattractant protein-1 genes in aortas from hyperinsulinaemic rats (高インスリン血症ラットの大動脈では CCAAT/enhancer binding protein-beta、-delta および monocyte chemoattractant protein-1 遺伝子の発現が増加する)		
<p>【目的】高インスリン血症は動脈硬化性疾患の独立した危険因子であり、炎症との関連も指摘されている。さらに、動脈硬化の発症、進展に炎症が関与していることも知られているが、その詳細な機構は明らかではない。以前我々は、ラット血管平滑筋培養細胞(ratVSMCs)において、アデノウイルスベクターを用いてインスリンの下流シグナルである PI3 キナーゼ(PI3K)を持続的に活性化すると、転写因子 CCAAT/enhancer binding protein(C/EBP)-<math>\beta</math> 及び <math>\delta</math> の遺伝子発現が亢進し、さらに動脈硬化と関連のある炎症性サイトカインである monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)の発現が誘導されることを報告した。今回我々はインスリン刺激下の ratVSMCs および高インスリン血症モデルラットの心血管組織におけるこれらの遺伝子発現調節を検討した。</p> <p>【方法】雄性 SD ラットの動脈より酵素法にて ratVSMCs を分離、培養した。ratVSMCs にインスリン刺激を加え培養液中の MCP-1 量を ELISA 法にて測定した。また、インスリンの下流シグナルである PI3 キナーゼを阻害する LY29400 を加え、C/EBP-<math>\beta</math>、<math>\delta</math> および MCP-1 遺伝子の発現量を定量的リアルタイム PCR 法(qPCR)にて解析した。次に、MCP-1 遺伝子上流域における C/EBP-<math>\beta</math> の結合量をクロマチン免疫沈降法(ChIP)にて解析した。siRNA 法を用いて C/EBP-<math>\beta</math> 遺伝子を抑制し、インスリン刺激による MCP-1 の発現量を検討した。さらに、雄性 SD ラットを高フルクトース食で 4 週間飼育し高インスリン血症ラットを作成した。体重を測定し、血液中のインスリン値、血糖値、総コレステロール値、中性脂肪値、MCP-1 値を測定した。大動脈を摘出し、インスリンの下流シグナルである Akt のリン酸化をイムノブロット法にて検討した。続いて C/EBP-<math>\beta</math>、<math>\delta</math> および MCP-1 の遺伝子発現、蛋白発現を qPCR、イムノブロット法、免疫組織化学法にて検討した。MCP-1 遺伝子上流域における C/EBP-<math>\beta</math> の結合量を ChIP にて解析した。また、心臓を摘出し、ノザンブロット法を用いて C/EBP-<math>\beta</math>、<math>\delta</math> および MCP-1 の遺伝子発現量を検討した。</p> <p>【結果】1) ratVSMCs を 10 nM インスリン存在下で培養すると培養液中の MCP-1 産生量は 1.4 倍(<math>p &lt; 0.01</math>)増加した。2) インスリン刺激により亢進した C/EBP-<math>\beta</math>、<math>\delta</math> および MCP-1 の遺伝子発現は PI3 キナーゼ阻害薬 LY294002 により抑制された。3) MCP-1 遺伝子上流域における C/EBP-<math>\beta</math> の結合は、インスリン処理を行っていない細胞に比し 3 倍(<math>p &lt; 0.05</math>)増加した。siRNA により C/EBP-<math>\beta</math> 遺伝子を抑制すると、インスリン刺激による MCP-1 遺伝子の発現の亢進がみられなかった。4) 高インスリン血症ラットの血管組織においては、PI3K の下流分子である Akt のリン酸化の亢進が認められ、MCP-1、C/EBP-<math>\beta</math> および <math>\delta</math> の遺伝子発現はそれぞれ、3 倍、3.3 倍、3 倍と有意に(<math>p &lt; 0.05</math>)増加した。蛋白発現についても同様の傾向を認めた。5) C/EBP-<math>\beta</math> の遺伝子発現量は高インスリン血症ラットでは血中インスリン濃度と有意に相関した(<math>p &lt; 0.05</math>)。MCP-1 の遺伝子発現量は両群において C/EBP-<math>\beta</math> および <math>\delta</math> の遺伝子発現と強く相関した(MCP-1 vs C/EBP-<math>\beta</math>; control-fed rats, <math>p &lt; 0.01</math>, fructose-fed rats, <math>p &lt; 0.05</math>; MCP-1 vs C/EBP-<math>\delta</math>; control-fed rats, <math>p &lt; 0.05</math>, fructose-fed rats, <math>p &lt; 0.05</math>)。6) 大動脈の MCP-1 遺伝子上流域における C/EBP-<math>\beta</math> の結合は 4.3 倍(<math>p &lt; 0.05</math>)に増加した。7) 心筋組織の MCP-1、C/EBP-<math>\beta</math> および <math>\delta</math> の遺伝子発現はそれぞれ、1.47 倍、1.44 倍、1.57 倍と有意に(<math>p &lt; 0.05</math>)増加し、血管組織と同様の傾向が確認された。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

【考察】本研究において高インスリン血症ラットの心血管組織では C/EBP- $\beta$ 、 $\delta$  の遺伝子発現の増加が示された。さらにこのことが MCP-1 遺伝子の発現に大きく寄与している可能性が示唆された。C/EBP は炎症性遺伝子のひとつであり NF- $\kappa$ B のような他の炎症性遺伝子の関与を否定するものではないが、高インスリン血症動物の血管組織では C/EBP の発現を介して MCP-1 が増加し、動脈硬化の発症、進展に関与するという可能性が示唆される。

【結論】高インスリン血症動物の心血管組織では、C/EBP- $\beta$  及び  $\delta$  の発現が慢性的な高インスリン血症により増加し、さらにこの機構を介して MCP-1 の発現が誘導た。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	541	氏名	佐藤喜純
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>本研究は、高インスリン状態において動脈硬化に関与する炎症性サイトカイン MCP-1 の発現が亢進しているか否か、およびその機序を検討したものである。インスリンにて刺激されたラット培養血管平滑筋細胞および高果糖食負荷により作製された高インスリン血症ラットの大動脈の血管平滑筋において、動脈硬化に関与する炎症性サイトカイン MCP-1 の増加が認められた。この増加はインスリンの下流シグナルである PI3kinase を介しており、さらに転写因子 C/EBP を介して増加していることが示された。</p> <p>本論文は高インスリン血症動物の血管壁において、炎症性サイトカイン MCP-1 が転写因子 C/EBP を介して亢進することを明らかにし、高インスリン血症による動脈硬化発症機序の理解に寄与するものである。よって博士 (医学) の学位を授与するに値すると評価された。</p> <p>なお、本学位授与申請者は 2007 年 1 月 31 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け合格と認められた。</p>			
(平成19年2月8日)			