

# 論 文 要 旨

## **Apolipoprotein E Regulates Primary Cultured Human Mesangial Cell Proliferation**

アポリポ蛋白Eは初代ヒトメサンギウム  
細胞の増殖を調節する

張 翼翔

### 【序論および目的】

The role of apolipoprotein (apo) E in kidney disease is still unclear. Animal studies have been performed, but it is doubtful if the conclusions are applicable to human beings. The objective of this study was to determine how apo E acts on human kidneys using primary cultured normal human mesangial cells (NHMCs) rather than animals used in previous studies.

### 【材料および方法】

Apo E and its isoforms E2, E3 and E4, or combinations with apo B were cocultured with primary NHMCs in serum-free medium. Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System and DNA-Prep Reagent System were used to measure the proliferation and apoptosis of NHMCs, respectively.

### 【結 果】

1. apo E itself increased NHMC proliferation at 24 h of culture, while it inhibited this proliferation after 48 h.
2. At 72 h of culture, apo E alone inhibited NHMC proliferation at concentrations higher than 0.78  $\mu\text{g/ml}$  in concentration-dependent manner.

3. When co-cultured with both apo E and apo B, NHMC proliferation was higher than that with apo E alone and lower than that with apo B alone.
4. At 72 h of culture, apo E2, E3 and E4 inhibited NHMC proliferation at different intensities, with no proliferative effect observed.
5. Neither apo E nor apo B caused NHMC apoptosis.

【結論及び考察】

Apo E regulates primary NHMC proliferation by (1) inhibiting NHMC proliferation or reducing NHMC proliferation induced by apo B, which implies that apo E has a protective effect on the kidney, and (2) increasing the proliferation under certain conditions.

(Nephron Experimental Nephrology Vol.102 No.2 2006年 掲載)

# 論文審査の要旨

報告番号	医研第	632	号	氏名	張翼翔
審査委員	主査	中川 昌之			
	副査	小澤 政之		丸山 征郎	

Apolipoprotein E Regulates Primary Cultured Human Mesangial Cell Proliferation  
 (アポ蛋白Eは初代培養ヒトメサンギウム細胞の増殖を制御する)  
Nephron Exp Nephrol, 102(2)・62-70, 2006

メサンギウム増殖は糸球体疾患の発生機序において重要な役割を持つ。一方、脂質異常は、多くの腎疾患と関係し、その中でアポEは脂質代謝の鍵であり、アポEとアポBの沈着はメサンギウム病変を促進ことが報告されている。一方、アポE欠損マウスではメサンギウム細胞の増殖がみられ、アポEはLDLによって誘発されるメサンギウム細胞増殖を抑制するとの報告もある。このようにメサンギウム細胞増殖に及ぼすアポEの役割を理解することは大変重要と考えられるが、その詳細は明らかにされていない。

本研究は、Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System と DNA-Prep Reagent System を用いて、初代培養正常ヒトメサンギウム細胞 (NHMC) の増殖とアポトーシスに及ぼすアポEとそのアイソフォーム、さらにアポBの影響を初めて調べたものである。

その結果、本研究では以下の知見が明らかにされた。

- (1) 72時間の培養で、アポBはNHMC増殖を促進したが、アポEは濃度依存的にNHMC増殖を抑制した。アポE2、E3とE4はNHMC増殖を抑制した。
- (2) 高濃度のアポEは24時間培養でNHMC増殖を促進したが、48時間後には増殖を抑制した。アポBは、全ての濃度で、また培養時間に関わらずNHMC増殖を促進した。
- (3) NHMCに対するアポBの増殖促進効果は、アポEの増殖抑制効果より強かった。また、低濃度のアポBによる増殖促進効果はアポEによって抑制された。
- (4) アポE・アポBいずれも、NHMCのアポトーシスを誘導しなかった。

以上の結果から、アポEは、(1)NHMC増殖抑制、(2)アポBによるNHMC増殖の抑制、(3)ある状況下におけるNHMC増殖、によりNHMC増殖を調節していることが示唆された。

本研究は、アポEのメサンギウム増殖性疾患における保護効果について新たな証拠を提供した。将来の臨床治療においてアポE投与やアポE遺伝子治療の可能性が期待される。

また、アポB濃度を制御することの重要性も示唆した。

よって本研究は学位論文として十分な評価を有すると判定した。

## 試験（最終試験）の結果の要旨

報告番号	医研第 632 号	氏名	張 翼翔
審査委員	主 査	中川 昌之	
	副 査	小澤 政之	丸山 征郎

主査および副査の3名は、平成18年8月9日、学位請求者 張翼翔君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) メサンジウム細胞の培養が FCS 無添加でされているが、どうして FCS 添加の条件で細胞増殖を評価しないのか？ 細胞増殖には growth factor が必要だと思うが。

(回答) FCS には、いろいろの脂質が含まれており、アポ蛋白も含まれていることから、その影響を除外するために FCS 無添加で行いました。FCS はアポ E やアポ B の添加直前までは添加して培養しています。なお、この条件で細胞の生存には影響がないことを確認しています。

質問2) アポ E がメサンジウム細胞の増殖を抑制する機序はどうか？

アポ E の受容体は、アポ E を細胞内に取り込む受容体で、増殖因子の受容体のようなものではないのに、どうして増殖にかかわるのか？

(回答) アポ E は、筋肉細胞や血管内皮細胞では細胞膜のヘパリン硫酸プロテオグリカンに結合し、細胞内の iNOS を誘導して、サイクリン D1 の発現を抑制して、細胞増殖を抑制することが報告されています。本研究では確認していませんが、メサンジウム細胞でもそのような機序が推定されます。

参考文献：Hui DY. Apolipoprotein E-induced cell signaling in the vessel wall  
Rev Endocr Metab Disord. 2004 Dec;5(4):335-41

質問3) アポ E やアポ B が、アポトーシスや cell cycle に影響せずに細胞増殖を促進したり、抑制したりするのは理解しがたいが、どういう機序を考えているか？

(回答) 本研究では、アポトーシスや cell cycle の測定系がひとつの方法でしか行っていないので、もっと鋭敏な他の測定法で評価すれば positive な結果が得られる可能性があります。

質問4) 実験に用いたアポ E の濃度は、ヒトの血清レベルと比べてどうか？

(回答) アポ E の正常ヒト血清レベルは 3 mg/dl 程度なので、本実験に用いた最高濃度はヒト血清レベルの下限に近い。したがって、用いた濃度はほぼヒトの血清レベルに近い濃度です。

質問5) アポ E のなかでも、アポ E4 は抗酸化作用が弱いことからアルツハイマー病との関連が知られており、そのアイソフォームで作用が異なると考えられている。アポ E2、3、4 のメサンジウム細胞の増殖に対する効果が同じなのはどう考えるか？

(回答) 遺伝子組み換えのアポ E アイソフォームを用いたため体内の天然のものと機能が異なる可能性があります。In vivo と in vitro では結果が異なる可能性もあると考えられます。

質問6) アポ E が添加後 24 時間ではメサンジウム細胞の増殖を促進し、それ以降の 48

時間から96時間では抑制するのはどうしてか？

(回答) この研究では検討されていません。

質問7) アポE添加時のメサンジウム細胞の形態学的変化はみているか？

(回答) 形態学的な変化は見えていません。

質問8) この実験では、アポBはメサンジウム細胞の増殖を促進することから腎疾患を悪化させる可能性が考えられる。抗アポB療法のような腎疾患に対する治療があるか？

(回答) そのような治療法の臨床応用はありません。

質問9) アポEはメサンジウム細胞の増殖を抑制し、アポBは増殖を促進するが、アポEやアポBに対する抗体、あるいはアンタゴニストなどを用いてそれらの作用がどうなるか検討したか？

(回答) それはやっていません。アポE null-miceではメサンジウム細胞やマトリックスの増殖が亢進すると言う報告があることから、アポEはメサンジウム細胞の増殖を抑制していると考えられます。

質問10) どのような増殖因子がメサンジウム細胞の増殖を制御しているかわかっているか？HGFはどうか？

(回答) PDGFはメサンジウム細胞の増殖を促進することが知られています。HGFは腎硬化症モデルに治療効果があることから、メサンジウム細胞の増殖を抑制すると考えられます。

質問11) メサンジウム細胞の増殖に及ぼす影響を調べるのに、なぜHGFのような増殖因子ではなく、まずアポEを用いたのか？

(回答) これまでにアポ蛋白と腎疾患との関連が報告されており、最初にいろいろのアポ蛋白のメサンジウム細胞増殖に及ぼす影響を調べたところ、アポEとアポBに強い作用があることが明らかになったのでアポEとアポBを用いました。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。