

論文の内容の要旨

論文題目: **Cellular and Molecular Mechanisms of Vascular Calcification**

-Essential Role of Apoptosis and its Regulation by HMG-CoA Reductase Inhibitor-

和訳: **血管石灰化の分子機序**

- HMG-CoA 還元酵素阻害剤の石灰化抑制作用におけるアポトーシスの役割-

指導教官 大内尉義 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 孫 輔卿 (ソンボーキョン)

加齢、糖尿病、腎不全の際におこる血管の石灰化は心血管疾患の発生と深い関係があることが知られている。近年、アポトーシスが血管石灰化に関与していることが報告されている。しかしながら、その分子機序は明らかではない。Growth arrest-specific gene 6 (Gas6) ならびにその受容体である Axl は細胞の分化、接着、遊走、増殖、survival を調節する重要な因子として知られている。また Gas6 と Axl は vascular pericyte にも発現しており、骨芽細胞様細胞への分化を抑制することから Gas6-Axl が血管の石灰化にも関与する可能性が示唆されている。細胞培地のリン濃度を上げることによって培養ヒト大動脈血管平滑筋細胞 (HASMC) は石灰化するが、そこには sodium-dependent phosphate cotransporter (NPC) による細胞内へのリンの取り込みとそれに伴う平滑筋細胞から骨芽細胞様細胞へのフェノタイプの変換が重要であることが報告されている。今回、我々はリン刺激による HASMC の石灰化の新たな機序として、アポトーシスの重要性に関して検討し、さらにそれに対する Gas6, Axl の関与を調べた。また、HMG Co-A 還元酵素阻害薬 (スタチン) は血清脂質低下作用以外に、様々な機序によって動脈硬化の進展を予防する作用を有すること (pleiotropic effect) が注目されている。近年、スタチンの

使用者において、大動脈弁の石灰化の出現頻度が低い、もしくは進展が遅延すること、またスタチンの使用者は石灰化を伴う大動脈弁狭窄症の進行が遅延することが報告されている。今回我々は、リン刺激による HASMC の石灰化に対するスタチンの抑制効果についても検討した。

HASMC の石灰化は培地中のリン濃度を上げることにより誘導し、o-cresolphthalein complex 法による Ca 蓄積量の定量、ならびに von Kossa 法による石灰化染色によって評価した。また、リン刺激による HASMC のアポトーシスは露出した histone を DNA との sandwich により検出する ELISA 法で検討した。また、NPC の活性は既報にしたがって Na 依存的な $H_3[^{32}P]O_4$ の取り込みにより測定した。Gas6, Axl の発現と Gas6 の分泌は、immunoblotting と免疫沈降法で確認した。アポトーシス関連因子である Akt, Bcl2, Bad のリン刺激による蛋白レベルの変化は immunoblotting によって検討した。

生理的なリンの濃度 (1.4 mmol/L) に対して、高濃度 (2.6, 3.2 mmol/L) のリンを添加することによって、濃度依存的に、また時間依存的に (3, 6, 10 日) HASMC の石灰化は促進した。また、2.6, 3.2 mmol/L のリンは濃度依存的、時間依存的に HASMC のアポトーシスを増加した。リンにより誘導されたアポトーシスは caspase 依存的であり、caspase の阻害薬である ZVAD.fmk の添加によってアポトーシスも石灰化も有意に抑制された。すなわち、アポトーシスは石灰化の誘導に必要であることが判明した。

リン刺激によるアポトーシス誘導に Gas6-Axl 系が関与していることを検討するため、Gas6, Axl のタンパク発現と Gas6 の分泌を調べた結果、2.6 mmol/L のリン刺激によって Gas6, Axl ともに発現が減少し、Gas6 の培地中への分泌も減少した。次に、recombinant human Gas6 (rhGas6) を外因性に培地に添加すると、アポトーシスも石灰化も濃度依存的に抑制された。また、rhGas6 のアポトーシス、石灰化抑制効果は、受容体である Axl の細胞外ドメイン (Axl-ECD; rhGas6 と結合し、その作用を消去する) の添加によってブロックされることから rhGas6 の効果は Axl を介すると考えられる。Gas6-Axl 系の下流のシグナル分子として phosphatidylinositol 3'-phosphate kinase (PI3K)-Akt pathway が知られている。2.6 mmol/L のリン刺激によってリン酸化 Akt (p-Akt; 活性型 Akt) の発現が減少し、rhGas6 の添加によって p-Akt の発現が非リン刺激状態に戻ることに、また PI3K の阻害薬である wortmannin 添加によって rhGas6 による Akt リン酸化の還元効果ならびに rhGas6 による石灰化抑制効果が消去されることから、リン刺激によって誘導されるアポトーシスは PI3K-Akt 依存的であることが判明した。Bcl2 family はアポトーシスに密接に関わる因子であり、リン刺激によって起こるアポトーシスにおいても Bcl2, Bad のリン酸化が低下することが分かった。rhGas6 の添加はリン刺激による Bcl2 と Bad のリン酸化の低下を還元させることから、Bcl2 family も Gas6-Axl survival 経路に関与していることが示唆された。

もう一つの石灰化の機序として報告されている NPC 活性は、2.6 mmol/L のリン刺激によって上昇し、NPC 特異的阻害薬である phosphonoformic acid (PFA) の同時添加によって抑制され、また、HASMC の石灰化も PFA の濃度に依存して、有意に抑制された。この結果は、リン刺激による細胞の石灰化がアポトーシスのみならず、NPC を介していることを示している。

次に、スタチンによる血管石灰化の抑制効果を検討したところ、水溶性スタチンであるプラバスタチンと、脂溶性スタチンであるアトルバスタチン、フルバスタチンはいずれも濃度依存的に、リン刺激 (2.6 mmol/L) による HASMC の石灰化を有意に抑制した。3種類のスタチンはまた、リン刺激によって誘導されるアポトーシスを抑制し、同時に Gas6, Axl の発現の増加、Akt, Bad のリン酸化を増加することが明らかになった。しかしながら、スタチンは NPC 活性に対して有意な抑制効果は示さなかった。このことから、スタチンによる HASMC の石灰化抑制効果はリンによる Gas6-Axl 系の downregulation を阻止し、Akt, Bad を介してアポトーシスを抑制することによってもたらされると考えられる。

本研究ではヒト血管平滑筋細胞において、リン刺激による石灰化にアポトーシスが重要であり、その分子機序として、Gas6-Axl survival 経路の低下、その下流の PI3K-Akt の活性の低下、Bcl2 family (Bcl2, Bad) のリン酸化の低下、caspase 3 の活性化が関与することを明らかにすることができた。スタチンはリン刺激によっておこる上記の機序を抑えることによって石灰化を抑制すると考えられる。