

[別紙 1]

論文の内容の要旨

Raloxifene の血管内皮細胞アポトーシスに対する抑制作用 およびその作用機序の解析

指導教官：大内 尉義

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

加齢医学専攻

諭 静

閉経前の女性では動脈硬化性疾患の発症頻度は男性に比べ低く明らかな性差が認められるが、閉経後次第に増加し 70 歳前後で性差がほぼ消失する。これらの疫学研究の結果から女性ホルモン、特にエストロゲンが女性に対し有益な役割を演じ、抗動脈硬化作用のあることが示唆され、実際に閉経後女性に対して、女性ホルモン補充療法 (Hormone Replacement Therapy; HRT) が普及してきた。ところが、HERS (Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study) 及び WHI (Women's Health Initiative HRT Study) の報告によると、HRT は、以前報告された乳癌や子宮癌や静脈血栓症などの副作用の増加とともに、心血管イベント抑制作用に否定的な結果が報告され、現在では心血管疾患予防としての HRT の臨床応用に議論のあるところとなった。そこで、その有害事象を最小限に抑えるため、従来の HRT に代わる治療法として組織選択的エストロゲン受容体調節薬 (Selective Estrogen Receptor modulator: SERM) が注目されている。第 2 世代 SERM である raloxifene は、骨や脂質代謝などにはエストロゲンアゴニスト作用、乳腺と子宮にはエストロゲンアンタゴニスト作用を有することが明らかにされ

た。大規模臨床試験 MORE (Multiple Outcomes of raloxifene Evaluation)によれば、raloxifene は乳癌・子宮癌を増やさず、骨吸収を抑制し骨粗鬆症を改善できると同時に、心血管疾患抑制効果についてもエビデンスが示された。

臨床及び基礎研究の結果より、raloxifene にはいくつかの心血管作用をもつことが報告されている。例えば、脂質代謝の改善、降圧作用などの動脈硬化のリスクファクターに対し有益な影響を与える以外にも、血管壁への直接作用を有することが報告されている。Raloxifene が *in vitro* での血管平滑筋細胞の増殖・遊走を抑制すること、*in vivo* でバルーン傷害による内膜肥厚を抑制することなどの平滑筋細胞への作用、raloxifene が eNOS を活性化することにより NO の産生を促進し内皮依存性血管拡張作用を有すること、接着因子発現を抑制するなど内皮細胞への作用が挙げられる。しかしながら、raloxifene の血管内皮細胞アポトーシスに対する抑制作用はまだ報告されていない。

Ross らにより提唱された傷害反応仮説 (response-to-injury hypothesis) では、血管内皮機能障害が動脈硬化発症・進展に重要なプロセスであると位置づけられている。また、血管内皮細胞のアポトーシスは内皮機能障害をおこす他、動脈硬化巣のびらんに関与するため、心血管イベント発症の引き金と言われている。したがって、内皮細胞のアポトーシス抑制が動脈硬化性疾患の有効な予防・治療法になりうる可能性がある。しかしながら、そのメカニズムは必ずしも十分に明らかになっていない。

以上の背景をもとに、本研究では、培養ウシ頸動脈内皮細胞 (BCECs) を用い、 H_2O_2 または $TNF\alpha$ による内皮細胞のアポトーシスに対して、raloxifene が抑制作用を示すかどうか、もし示すとすれば、その機序について検討することを目的とした。まず、(1) raloxifene に血管内皮細胞アポトーシスに対する抑制作用があるかどうか検討した。次に、(2) raloxifene による内皮細胞アポトーシス抑制作用がエストロゲン受容体を介するかどうか検討した。次に、(3) H_2O_2 または $TNF\alpha$ による血管内皮細胞アポトーシスに関与するシグナル伝達経路として、MAPキナーゼファミリー (p38MAPK, JNK, ERK1/2) と PI3K/Akt 経路の役割について検討した。最後に、(4) raloxifene の血管内皮細胞アポトーシス抑制作用を発揮するメカニズムとして、MAPキナーゼファミリー及びPI3K/Akt経路が関与するか、そして、その作用は genomic action か、それとも non-genomic action かを検討した。

方法：ウシ頸動脈より酵素法により得られた内皮細胞 (BCECs)、継体数 6

～9 を用いた。Raloxifene を用いた実験では、dextran-coated charcoal にて処理しステロイドを除去した FBS (DCC-FBS)、および phenol red を除いた M199 を用いた。HUVECs の培養には、EGM2 を用いて行った。アポトーシス誘導実験では、細胞が 70-80%コンフルエントまで培養した後、培養液を除去し、PBS(-)で洗淨してから、血清を含まない phenol red-free M199 に置き換え、増殖を停止させた。H₂O₂ を用いた実験では、血清フリー6 時間後、細胞を 10⁻⁴mol/L H₂O₂ に 1 時間暴露し、再び PBS(-)で 2 回洗淨し、phenol red-free M199 に置き換え、各実験を行った。TNF α 実験では、血清フリー16 時間後、10ng/mL TNF α を含む培養液に置き換え、各実験を行った。

結果：

- (1) コントロール (H₂O₂ または TNF α 非処理) に比べ、DNA の断片化は H₂O₂ または TNF α 添加により濃度依存性に有意に増加した。Caspase-3 の活性化は TNF α により誘導されるが、H₂O₂ によっては誘導されなかった。さらに、caspase-3 の阻害剤 Ac-DEVD-CHD は、H₂O₂ によって誘導したアポトーシスに影響を与えず、TNF α によるアポトーシスを濃度依存性に抑制した。
- (2) H₂O₂ または TNF α で処理した後、同一倍率でとった写真から見ると、コントロールに比べ、内皮細胞の剥離は H₂O₂ または TNF α により著明に促進し、接着細胞数がコントロールの約半数となっていたが、raloxifene の投与下で、H₂O₂ または TNF α による内皮細胞の剥離は抑制された。DNA 断片化を定量してみると、アポトーシスは H₂O₂ 投与で 2.25 倍 (vs control, p<0.01) に増加したが、raloxifene の前投与により濃度依存性に減少し、10⁻⁶mol/L raloxifene で 42% (p<0.01) 抑制した。BCECs と同様、HUVECs の実験でも、H₂O₂ によるアポトーシスに対して、raloxifene が濃度依存性に抑制することが示された。また、TNF α は、アポトーシスを 4 倍 (vs control, p<0.01) に増加したが、raloxifene の前投与によりアポトーシスは濃度依存性に減少し、10⁻⁶mol/L raloxifene で 45% (p<0.01) 抑制した。Raloxifene は TNF α による caspase-3 の活性化を有意に 40%抑制した。
- (3) エストロゲン受容体の内因性リガンドである E2 は raloxifene と同様に、H₂O₂ または TNF α による内皮細胞のアポトーシスを濃度依存性に抑制した。一方、エストロゲン受容体拮抗薬 ICI182780 の前投与を行うと、raloxifene の抗アポトーシス効果は消失した。

- (4) H₂O₂ または TNF α 刺激後、p38MAPK、JNK、ERK1/2 および Akt は早期に活性化（リン酸化）が認められた。対照として用いた p38MAPK、JNK と ERK1/2 の総蛋白レベルには経時的変化が認められなかった。さらに、H₂O₂ または TNF α によるアポトーシスは、p38 阻害薬 SB203580(10⁻⁷mol/L)と JNK 阻害薬 SP600125(10⁻⁷mol/L)で有意に抑制された。一方、ERK 活性化酵素 MEK1 阻害薬 PD98059(10⁻⁵mol/L)、PI3K 阻害薬 wortmannin (10⁻⁷mol/L)で有意に増強された。つまり、H₂O₂ または TNF α による血管内皮細胞のアポトーシスにおいて、p38MAPK と JNK は細胞死シグナルとして、ERK1/2 と PI3K/Akt は生存維持シグナルとして働いており、アポトーシスの伝達経路にそれぞれ異なる役割を演じている。
- (5) Raloxifene は H₂O₂ または TNF α による p38MAPK と JNK 活性化に影響を及ぼさなかった。しかしながら、raloxifene は ERK1/2 の活性化を有意に増強させた。さらに、raloxifene のアポトーシス抑制効果は PD98059(10⁻⁵mol/L) の存在下では消失した。一方、raloxifene は H₂O₂ または TNF α による Akt 活性化に影響を与えなかった。また、wortmannin (10⁻⁷mol/L)の投与下であっても、raloxifene は有意にアポトーシスを抑制した。Raloxifene は対照とした p38MAPK、JNK、ERK および Akt の総蛋白レベルには影響しなかった。
- (6) ERK1/2 は raloxifene の単独投与により早期に活性化され、15 分においてピークとなり、2.5 倍増強した。Actinomycin D の前投与は raloxifene による ERK1/2 の活性化に影響を与えなかった。一方、ICI182780 の投与下では raloxifene による ERK1/2 活性化は認められなかった。Raloxifene による ERK1/2 の活性化作用およびそれによる抗アポトーシス作用は non-genomic action と推測された。

本研究より、我々は初めて raloxifene がエストロゲン受容体を介した non-genomic action を通じて、ERK1/2 の活性化を増強することにより、H₂O₂ または TNF α による血管内皮細胞アポトーシスを用量依存性に抑制することを発見した。本研究において認められた raloxifene の酸化ストレス・炎症性サイトカインからの血管内皮細胞保護作用が、心血管イベント抑制作用の一機序である可能性が示唆された。将来、raloxifene は閉経後女性の心血管疾患の予防・治療戦略になり得る可能性があると考えられる。