

審査の結果の要旨

氏名 喻 静

本研究は、選択的エストロゲン受容体調節薬である raloxifene の血管内皮細胞保護作用を明らかにするため、ウシ頸動脈内皮細胞 (BCECs) を用いて、 H_2O_2 または $TNF\alpha$ による内皮細胞のアポトーシスへの抑制作用およびその作用機序を試してみたものであり、下記の結果を得ている。

- (1) コントロール (H_2O_2 または $TNF\alpha$ 非処理) に比べ、DNA の断片化は H_2O_2 または $TNF\alpha$ 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 $TNF\alpha$ により誘導されるが、 H_2O_2 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、 H_2O_2 によって誘導したアポトーシスに影響を与えず、 $TNF\alpha$ によるアポトーシスを濃度依存性に抑制した。
- (2) H_2O_2 または $TNF\alpha$ 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 H_2O_2 または $TNF\alpha$ 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、 H_2O_2 または $TNF\alpha$ 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 H_2O_2 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^{-6} mol/L raloxifene で 42% ($p<0.01$) 抑制した。BCECs と同様、HUVECs の実験でも、 H_2O_2 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、 $TNF\alpha$ 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^{-6} mol/L raloxifene で 45% ($p<0.01$) 抑制した。Raloxifene は $TNF\alpha$ 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、 H_2O_2 または $TNF\alpha$ 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。

以上、本論文は、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抑制することを明らかにした。本研究はこれまで十分に解明されず、有効な治療法が確立していない閉経後女性の心血管疾患の予防・治療法を考える上で重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。