

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Prevention of Atherosclerosis with Acyclic Retinoid

和訳 非環式レチノイドの抗動脈硬化作用

指導教員 永井 良三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入(進)学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 加田 奈々絵

[背景]

レチノイドは天然あるいは合成のビタミン A 類似化合物で、白血病治療のほかがんの治療や予防薬として研究されている。その生物学的効果はレチノイド受容体であるレチノイン酸受容体 (RAR) とレチノイン X 受容体(RXR)によって仲介される。RAR は all-trans レチノイン酸 (ATRA)と 9-cis-レチノイン酸 (9-cis-RA)、RXR は 9-cis-RA と結合しこれらのレセプターは両者とも α 、 β 、 γ のアイソフォームをもつ。

血管平滑筋細胞では RXR γ を除くすべてのレチノイド受容体が発現しているが、RAR β の発現は非常に低い。血管傷害時には ATRA により血管新生内膜を構成する血管平滑筋細胞の増殖が抑制されることが示されたことから、副作用を減少させるべく、レチノイド受容体サブタイプ選択薬と血管平滑筋細胞の関係について様々な研究がなされてきた。

RAR β に関しての血管平滑筋細胞での役割についてはまだ報告はない。しかし RAR β の発現が食道扁平上皮癌の分化度に関係していること、RAR β の外因性の過剰発現や ATRA による内因性の RAR β 発現が、ヒト肺扁平上皮癌の増殖抑制効果に重要であることが示唆されている。これらのことから RAR β は癌抑制遺伝子であると考えら

れている。

非環式レチノイド (ACR) は in vivo でも in vitro でも肝癌細胞の増殖を抑制することが示され、臨床試験でも経口投与による肝癌再発の抑制が示された合成レチノイドである。またヒトへの投与でも副作用がなく安全性の高いことが報告されている。近年 ACR は、RAR β を優先的に介してその薬物効果をきたすことが報告され、ACR のヒト肝癌細胞の細胞増殖抑制効果はアポトーシスによることが明らかになっている。しかしこれまで ACR の抗動脈硬化作用については研究されてこなかった。

KLF5 は zinc-finger 型転写因子で Krüppel-like factor family の一員である。KLF5 の発現は成体の正常動脈ではほとんどみられないが、血管傷害によりその発現が誘導されることが報告されている。KLF5 は RAR α と結合し、その下流遺伝子である Platelet Derived Growth Factor A (PDGF-A) 遺伝子の転写調節をすることも知られている。

そこで私は ATRA を比較対照として用いて ACR に血管リモデリング抑制効果があるか検討し、ACR の分子学的作用機序に KLF5 が関与しているか検討した。

[方法と結果]

マウス右大腿動脈にカフを留置してカフ傷害モデルを作成し、大豆油 (コントロール)、ACR、ATRA を5週間経口投与した。Elastica van Gieson 染色による ACR 群の新生内膜の形成は、コントロール、ATRA 群と比較して投与量依存性に抑制された。また TUNEL 染色による新生内膜中のアポトーシス陽性細胞率は ACR 群のほうがコントロール群より上昇していたが、ACR 投与量とアポトーシス陽性細胞率の関係は反比例であった。In vivo では培養血管平滑筋細胞に ACR を負荷すると ACR は濃度依存性に血管平滑筋細胞のアポトーシスを誘導し細胞増殖を抑制することが、アポトーシスアッセイによって示された。また血管平滑筋細胞に ACR または ATRA を負荷すると、RT-PCR、ウェスタンブロットいずれのレベルでも ACR は ATRA より早期に血管平滑筋細胞の内因性 RAR β の発現を誘導した。次に血管平滑筋細胞に retinoic acid response element (RARE) をもつプロモーター遺伝子、各 RAR サブタイプと ACR をコ・トランスフェクションすると、ACR 存在下の RARE は RAR β 存在時に最も活性が上昇した。さらに血管平滑筋細胞に RAR β を過剰発現させ外因性の RAR β の発現誘導下の血管平滑筋細胞でアポトーシスアッセイを行った結果、RAR β の発現量依存性に血管平滑筋細胞のアポトーシスが誘導された。In vivo ではカフ傷害モデルの新生内膜でも ACR 群はコントロール群と異なり、新生内膜血管平滑筋細胞で RAR β の発現上昇を認めた。

一方で ACR は KLF5 安定発現細胞の細胞増殖を抑制した。また免疫沈降では、ACR は RAR α に結合すると RAR α と KLF5 の結合を ATRA より減弱させた。同様に蛋白結

合アッセイでも、ACRはRAR α とKLF5-DNA binding domainの結合をATRAより減弱させた。対照的にRT-PCRではATRAと異なりACRは血管平滑筋細胞の内因性のKLF5の発現を減少させなかった。しかしPDGF-Aに対しては、RT-PCRではACRは血管平滑筋細胞の内因性のPDGF-Aの発現をATRAより減少させた。さらにRAR α とKLF5をPDGF-Aプロモーター遺伝子にコ・トランスフェクションし、ACRまたはATRAを負荷したルシフェラーゼアッセイでは、ACRはATRAより低濃度でPDGF-Aプロモーターの活性を抑制した。

[考察]

本研究で私は、in vivo 血管傷害モデルでACRが内膜平滑筋細胞のアポトーシスを促進させることで新生内膜形成を抑制することを示した。よってレチノイドにより血管平滑筋細胞のアポトーシスが誘導されることは、レチノイドの血管平滑筋細胞増殖の制御にとって重要なメカニズムの一つであることが示唆された。また血管平滑筋細胞ではレチノイドによるアポトーシス誘導の作用は血管リモデリング抑制作用に寄与し、その作用を生じるACRは血管平滑筋細胞の増殖抑制に有効であると考えられた。

また本研究からACRがATRAより血管平滑筋細胞増殖抑制効果をもち、ACRがATRAより内因性のRAR β の発現上昇を誘導したことで、RAR β はレチノイドによる細胞増殖抑制効果を修飾していること、RAR β は血管平滑筋細胞の増殖を制御する重要な因子となる可能性が考えられた。このようにRAR β は血管平滑筋細胞増殖を抑制する遺伝子としての働きをもつ可能性があり、血管平滑筋細胞でRAR β の発現を誘導するレチノイド、特に血管平滑筋細胞で優先的にRAR β の発現を介して作用するACRは、RAR β による血管平滑筋細胞のアポトーシスを誘導、促進する薬剤として血管病変抑制に有用な効果をもつと考えられた。

さらにACR投与あるいは外因性に血管平滑筋細胞のRAR β の発現を増強させると容量依存的に血管平滑筋細胞のアポトーシスが促進していたことで、血管平滑筋細胞でもRAR β の発現上昇は血管平滑筋細胞のアポトーシスを誘導し細胞増殖抑制効果をもつことが示唆された。これらのことから血管平滑筋細胞でのRAR β の発現低下は、定常状態では、RAR β の血管平滑筋細胞のアポトーシス誘導効果、およびその作用で生じる血管平滑筋細胞増殖抑制効果を抑制することで細胞は生存するものの、血管傷害時にはRAR β の作用がないため調節不能な血管平滑筋細胞の増殖が生じ、結果として血管平滑筋細胞のフェノタイプの変換が生じるのではないかと考えられた。またこれまでRARはRARリガンドと結合することで活性化が促進されその機能を発しているとされているが、RAR β はリガンド未結合状態でもアポトーシスを誘導するという生物学的効果が生じていることが示唆された。しかしRAR β が血管平滑筋細胞のアポトーシス促進に関与するならばレチノイド投与下の血管平滑筋細胞ではRAR β が発現する

ため、in vivo 血管傷害モデルでは血管中膜に存在する血管平滑筋細胞でもアポトーシスが促進され中膜面積が減少することが予想される。しかしながら ACR 投与下の傷害血管の中膜面積は保たれていた。ではこの差が生じる理由は何であろうか。1 つには、中膜内での血管平滑筋細胞の位置によりレチノイドによる RAR β の発現に差が生じている可能性が考えられた。2 つにはレチノイドにより血管平滑筋細胞の RAR β が発現しアポトーシスが促進される過程で、アポトーシスに拮抗するサイトカインなどの何らかのメディエーターが同時に誘導され両者の作用が相殺されるため、見かけ上は中膜面積が保たれている可能性が考えられた。

一方 KLF5 を介した ACR の効果は、定常状態で結合している RAR α と KLF5-DBD に対し ACR がその結合を解離させることで、KLF5 の下流遺伝子である PDGF-A 遺伝子の内因性の発現、およびその転写を抑制することが示された。ACR は RAR β を優先的に介して作用するものの定常状態では血管平滑筋細胞の内因性の RAR β の発現は極小であることから、ACR は RAR β 低発現下では、RAR α と KLF5 を介して血管リモデリング抑制効果に関与している可能性が示された。しかし血管平滑筋細胞では ACR 投与後 6 時間で RAR β の内因性の発現が誘導されること、ACR が 6 時間以上負荷され RAR β の発現が生じる血管平滑筋細胞では ACR は RAR β を介して作用することから、ACR の RAR α と KLF5 を介した作用機序が ACR の効果発現に必須であるとは言い難いと考えられた。

以上のことから私は RAR β の新規血管傷害改善の作用、すなわち RAR β が血管平滑筋細胞をアポトーシスへ誘導すること、RAR β の早期の発現上昇とその持続をきたす ACR が、傷害血管の内膜平滑筋細胞をアポトーシスに導き新生内膜増殖抑制につながることを示した。このように RAR β は血管リモデリング抑制効果にとって重要であり、RAR β を優先的に介して作用する ACR は抗動脈硬化作用治療薬として優れた薬剤であると考えられた。