

## 論文の内容の要旨

論文題目      Analysis of Signal Transduction Mechanisms Modulated by  
Environmental Stress in Vascular Smooth Muscle Cell  
外界ストレスによる血管平滑筋細胞のシグナル伝達制御機構の解析

氏 名          小西 敦

動脈硬化などの血管病変の病因の一つに、血管平滑筋細胞の増殖、遊走、および生理活性タンパクの産生亢進があげられる。これらの平滑筋細胞の機能的変化は、血管内皮の機能障害とあいまって、病変局所への平滑筋細胞の遊走と増殖をもたらし、血管内腔の閉塞を引き起こすと考えられている。こうした血管平滑筋細胞の形質的な変化は、angiotensin II (AngII)などの血管作動性物質による刺激によってもたらされるが、同時に高血糖や $H_2O_2$ といった外界ストレスによる影響も強く受けることが知られている。またこのことは、高血糖と $H_2O_2$ 産生の亢進が認められる糖尿病患者において、より顕著に血管病変が進展する大きな要因の一つとなっている。したがって、これらの外界ストレスが血管平滑筋細胞のシグナル伝達に及ぼす影響の機構を解明することによって、糖尿病性の血管合併症の進展を抑制する新たなドラッグターゲットを見出すことが期待できる。

本研究は、血管平滑筋の情報伝達経路に対するGlucoseおよび $H_2O_2$ が与える影響を2つの仮説から検討し、糖尿病性血管障害の機構を解明することを目的とした。すなわち第1章においては、高Glucoseが細胞増殖・遊走因子であるAngIIの細胞内シグナルを増強するという仮説を検証し、そのメカニズムがAngII下流シグナルであるEGFRのN-glycosylationの違いに起因するという新たな知見を見出した。また第2章においては、酸化ストレスの一つである $H_2O_2$ がレセプターチロシンキナーゼであるAxlを直接活性化するという仮説のもとに、血管障害モデルにおけるAxlの重要性を明らかにした。

### I. Glucose による EGFR transactivation シグナルの制御

血管平滑筋初代培養細胞は、その応答が Glucose に極めて敏感であることが知られている。事実多くの報告において、細胞の刺激に対する反応性が良いという理由で、高 Glucose( 25 mM 以上, 糖尿病での血中濃度に相当 ) 下の条件で血管平滑筋の生理機能が研究されているが、そ

の原因は明らかではない。一方で動脈硬化病変の進展には AngII が深く関わっており、殊に糖尿病においてその降圧作用とは別に、angiotensin converting enzyme 阻害剤や angiotensin receptor blocker が直接的に血管障害を抑制することが、臨床試験の結果からわかっている。そこで本章では、血管平滑筋における AngII の細胞内シグナル伝達において、Glucose によって制御されるターゲット分子の存在を仮定し、その分子を同定するとともに制御のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 1) Glucose が AngII および EGF の下流シグナルに与える影響

培養血管平滑筋細胞を AngII および EGF で刺激し、経時的に下流シグナルである Akt および ERK-1/2 のリン酸化を調べたところ、刺激依存的に Glucose の影響が現れることを見出した。すなわち EGF 刺激によるシグナル伝達は低 Glucose (5.5 mM, LG), 高 Glucose (27.5 mM, HG) による影響を受けないが、AngII 刺激による Akt, ERK-1/2 の活性化は、HG で強く増強される、あるいは LG で抑制されることが明らかとなった (図 1)。

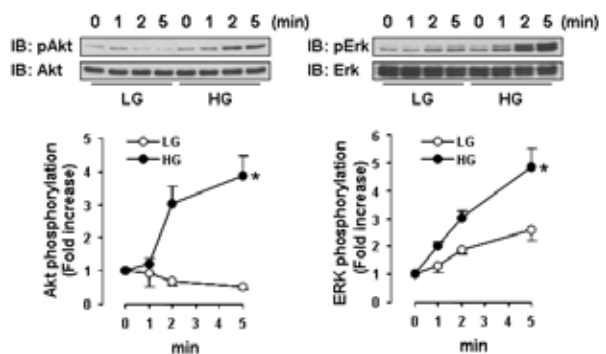


図1 グルコースによるAngII下流シグナル伝達の変化

### 2) Glucose による EGFR 分子種の変化

AngII による Akt, ERK-1/2 のリン酸化は、その 50%以上が EGFR の活性化を介することが知られている。そこで AngII レセプター(AT1R)および EGFR を Western Blot で解析したところ、AT1R には変化がみられなかったが、EGFR では LG で 145 kDa, 170 kDa の 2 分子種、HG で 170 kDa の 1 分子種が発現していることを見出した。分子種の変換は培地中の Glucose 濃度に依存して経時的に変化し、かつ可逆であった。また、EGFR と同様にレセプター型チロシンキナーゼとして知られる PDGFR についても調べたところ、glucose 濃度によって分子量が変化することは無く、EGFR に特有の現象である可能性が示唆された。一方、Peptide N-glycanase F 処理による解析から、HG, LG での分子量の違いは N-glycosylation によるものと考えられた。また細胞内の局在について細胞表面のビオチン化を用いて調べたところ、145 kDa, 170 kDa どちらの EGFR も細胞膜表面に存在しており、未熟な形で細胞内に保持されているのではないことが確認された。

### 3) EGFR 分子種の変化にともなう刺激依存的な自己リン酸化の変化

レセプターリガンドである EGF 以外に、AngII によっても EGFR は自己リン酸化を起こし、活性化することが知られている(transactivation)。そこで Glucose によるリガンド刺激依存的なシグナルのモジュレーションが、EGFR の分子種の変化によるものであるかを確認するために、EGFR のチロシンリン酸化を調べた。前述の Akt, ERK-1/2 の結果と一致して、LG 培地下で主に発現している 145 kDa EGFR は、EGF 刺激によってリン酸化を惹起したが、AngII 刺激では全くリン酸化がみられなかった。これに対して HG 培地下で主に発現している 170 kDa EGFR は EGF, AngII どちらの刺激によっても、チロシンリン酸化を引き起こした(図 2)。

他の GPCR リガンドである Thrombin, Sphingosine-1 phosphate も AngII と同様に 170 kDa EGFR をリン酸化したが、145 kDa EGFR には影響を及ぼさなかった。一方 EGFR のリガンドとして知られる HB-EGF および TGF- $\alpha$  はどちらの EGFR のリン酸化も惹起した。これらのことから、2つの EGFR 分子種は transactivation シグナルの伝達において、異なる機能を有している可能性が考えられた。

以上のことから、血管平滑筋細胞は、培地中の Glucose 濃度に依存して 145 kDa およびの 170 kDa 2種の EGFR isoform を発現すること、またその分子量の違いは N-glycosylation の違いに起因しているが、両者とも細胞膜上に局在して EGF からのシグナルを受けることが明らかとなった。また N-glycosylation の違いは、EGFR の transactivation に明確な影響を及ぼし、170 kDa EGFR のみが GPCR 刺激によって活性化されることがわかった。

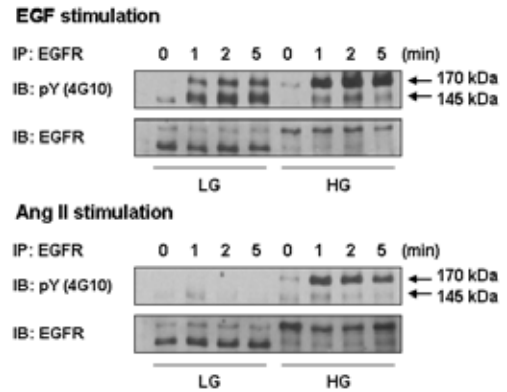


図2 EGF, AngIIによるEGFRのチロシンリン酸化

## II. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるAxlシグナルの活性化

Axlは、血管平滑筋細胞や腎メサンギウム細胞に発現しているレセプター型チロシンキナーゼであり、血管障害モデルや糖尿病性腎症モデルにおいて、その発現の亢進が報告されている。AxlはリガンドであるGas6の結合によって自己リン酸化を引き起こし、細胞増殖、遊走、細胞死抑制などの生理機能を制御する。Gas6の発現も病態において上昇していることが報告されているが、その由来やメカニズムは明らかではない。一方で、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む酸化ストレスの産生が動脈硬化病変の病態局所で亢進しており、その進行に重要であることは数多く報告されており、PDGFRなどのレセプター型チロシンキナーゼの活性化が、そのメカニズムの一つとして提唱されている。

本章では、AxlもPDGFRなどと同様にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によって活性化するという仮説をin vitro, ex vivoの系において検証した。また血管障害モデルにおいてAxlが活性化していることを実証し、その抑制によって血管障害病変を軽減しうることを、動物モデルを用いて明らかにした。

### 1) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるレセプター型チロシンキナーゼAxlの自己リン酸化

培養血管平滑筋細胞をH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で刺激後、経時的にAxlの自己リン酸化を調べたところ、3-5分をピークとした強い活性化が認められた(図3)。この活性化は用量依存的であり、EC<sub>50</sub>はおおよそ500  $\mu$ Mであった。内因性リガンドであるGas6に対して中和的に作用するAxl-FcおよびGas6の転写後修飾を阻害して不活性化するとされるwarfarin処理によって、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による活性化は約50%阻害された。すなわち、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による活性化は一部内因性のGas6の放出を介しており、この部分を阻害することによって活性化をコントロールできる可能性が示唆された。

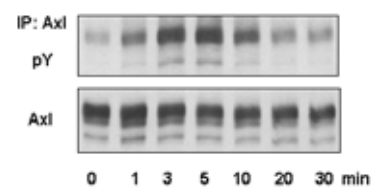


図3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるAxlのチロシンリン酸化

## 2) 摘出血管を用いた Axl リン酸化と下流シグナルへの影響

培養細胞においてみられた $H_2O_2$ によるAxlの活性化が、生体内においても起こりうる現象であることを確認するために、ラットの大動脈を摘出し、*in vitro*で $H_2O_2$ 処理を行い、経時的にAxlのリン酸化を調べた。その結果、培養細胞と同様に5分をピークとするリン酸化が認められた。

## 3) 病態モデルにおける Axl リン酸化とその意義

血管障害モデルの一つであるラット頸動脈 Balloon 傷害モデルにおいて、Axl の発現が増加することが知られている。またこのモデルにおいては、酸化ストレスの亢進が重要なメカニズムであり、酸化ストレス産生を阻害することで血管病変、すなわち新生内膜の肥厚を抑制することが報告されている。同モデルにおいて Axl の活性化がみられるかどうか、またその活性化が *in vitro* と同様に warfarin 投与によって抑制されるかどうかを調べた。Balloon による傷害後 7 日目のラット頸動脈において、Axl の発現亢進と同時にリン酸化の亢進が認められた。またこのリン酸化の亢進は、warfarin 投与によって有意に抑制された。

さらに、血管障害における Axl の役割を明らかにするために、Axl<sup>-/-</sup>マウスを用いた動物病態モデル(大腿動脈 cuff 傷害モデル)の検討を行った。マウスの大腿動脈に cuff をかぶせることで障害を与え、14 日後に血管組織の増殖を調べたところ、Axl<sup>+/+</sup>マウスに比べ、<sup>-/-</sup>マウスでは 80% の内膜肥厚が抑制されていることがわかった(図 4)。

以上の結果から、血管平滑筋

細胞上の Axl は、*in vitro* および *in vivo* の系において  $H_2O_2$  刺激によって用量依存的かつ時間依存的に活性化することが明らかとなった。さらに *in vivo* 血管障害モデルの病態局所において Axl は活性化しており、Axl 分子を除去した系においては、血管病変の進展が抑制されることが判明した。すなわち、血管障害後の血管平滑筋の増殖・遊走における Axl の発現およびリン酸化の亢進は、病態の進展に極めて重要であり、Axl のリン酸化をコントロールすることで動脈硬化などの血管病変の進展を抑制することができると考えられる。

本研究によって血管平滑筋の情報伝達経路において、EGFR および Axl のシグナル伝達が Glucose、 $H_2O_2$  という糖尿病における外界ストレスの影響を強く受けること、およびこれらの伝達機構を制御することによって、血管平滑筋の増殖・遊走を抑制しうる可能性が示唆された。よって本研究は、糖尿病性血管障害の進展を阻止する治療法の確立に糸口を与えるものとして、有用と考えられる。

