

審査の結果の要旨

氏 名 小西 敦

「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」と題する本研究では、糖尿病性血管病変の分子機構を、血管平滑筋細胞に焦点を絞って追求した結果が述べられている。グルコース及び過酸化水素が、血管平滑筋の生存と機能に影響する分子機構を、それぞれレセプター分子である EGFR と Axl に注目して解析した。これらの結果が Chapter 1 及び 2 であり、General Introduction と General Discussion がその前後に述べられている。

General Introduction では、背景となる事実が述べられている。要約すると、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、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ことが述べられている。さらに、平滑筋細胞の機能的変化は、高血糖や過酸化水素などの外界ストレスによる影響も強く受け、両者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ことが、簡潔に述べられている。

第 1 章においては、高グルコース状態が細胞増殖・遊走因子である Angiotensin II の細胞内シグナルを増強するという仮説を検証することを目標に研究が行われ、そのメカニズムが Angiotensin II 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ことが述べられている。

血管平滑筋初代培養細胞は、その応答が培地中のグルコースに極めて敏感であることが知られていたため、血管平滑筋における Angiotensin II の細胞内シグナル伝達において、グルコース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。培養血管平滑筋細胞を Angiotensin II 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、EGF 刺激によるシグナル伝達は低グルコース(5.5 mM)、高グルコース(27.5 mM)による影響を受けないが、Angiotensin II 刺激による Akt と ERK-1/2 の活性化は、高グルコース状態で強く増強される、あるいは低グルコースで抑制されることが明らかにされた。Angiotensin II レセプター

および EGFR を Western Blotting で解析したところ、Angiotensin II レセプターには変化がみられなかったが、EGFR では低グルコースで 145 kDa、170 kDa の 2 分子種、高グルコースで 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グルコース濃度に依存して経時的に変化し、かつ可逆であり、EGFR に特異的な変化であった。Peptide N-glycanase F 処理による解析から、分子量の違いは N-glycosylation によるものと判明した。低グルコース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、Angiotensin II 刺激では全くリン酸化がみられなかった。これに対して高グルコース下で主に発現している 170 kDa EGFR は EGF、Angiotensin II 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。他の GPCR リガンドである Thrombin, Sphingosine-1 phosphate も Angiotensin II 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- α はどちらの EGFR のリン酸化も惹起した。これらのことから、N-glycosylation の異なる 2 つの EGFR 分子種は transactivation において、異なる機能を有していることが明かとなった。本研究は、細胞外のグルコース濃度によってレセプター型チロシンキナーゼ分子の N-glycosylation が制御されその結果が transactivation に大きな影響を与えるという、レセプターの機能調節における新たなパラダイムを提案する発見である。

第 2 章においては、学位申請者は過酸化水素が血管平滑筋細胞に発現しているレセプターチロシンキナーゼである Ax1 を直接活性化するという仮説をたてた。Ax1 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ことが知られていたため、Ax1 が過酸化水素によって活性化すれば、平滑筋細胞のストレス応答におけるこのメカニズムの重要性を検証できると考えた。培養血管平滑筋細胞を過酸化水素で刺激後、経時的に Ax1 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。この活性化は用量依存的であり、過酸化水素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。

培養細胞においてみられた過酸化水素による Ax1 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 で過酸化水素処理を行い、経時的に Ax1 のリン酸化を調べた結果、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。さらに、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、Ax1 の活性化がみら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、Ax1 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 の役割は明らかでなかったため、Axl^{-/-}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。Axl^{+/+}マウスに比べ、^{-/-}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。すなわち、*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。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、病態形成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可能性がある。

本研究によって血管平滑筋細胞において、EGFR および Axl のシグナル伝達がグルコース及び過酸化水素という糖尿病において亢進してい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・遊走を抑制する可能性が示された。本研究は、血管平滑筋のシグナル生物学、糖鎖生物学として重要であると共に、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、創薬的な見地からも高く評価されると考えられる。よって、本研究を行なった小西 敦は博士（薬学）の学位を受けるにふさわしいと判断した。