

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 高血圧自然発症ラット血管平滑筋細胞のN-型糖鎖修飾に関する研究

指導教官 小俣政男 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

平成15年3月単位修得済退学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 建石 綾子

[研究の背景および目的]

高血圧は、心臓病（狭心症、心筋梗塞）、脳卒中（脳出血、脳梗塞）及び心不全や腎障害などの動脈硬化性疾患の危険因子として重要であるが、その成因は遺伝、食塩摂取、肥満など多因子によると考えられ、未だ明らかでない。高血圧の動物モデルとして高血圧自然発症ラット（SHR）が見いだされており、大動脈及び主要分岐動脈の血管内膜は、高血圧発症前から肥厚している。この血管内膜肥厚は、中膜由来の平滑筋細胞が遊走して増殖すると共に、細胞外基質を分泌して形成されると考えられている。SHR 及び対照の Wistar-Kyoto ラット（WKY）の大動脈から血管平滑筋細胞の初代培養株を樹立すると、SHR 由来の細胞は増殖がより速く、かつ細胞飽和密度も高いことが報告されており、細胞増殖の制御機構に何らかの変化が起こっていることが予想される。一方、細胞の増殖分化においては細胞表面のタンパク質に結合した N-型糖鎖が関与しており、特に癌細胞では N-型糖鎖の高分岐化が細胞増殖の異常や転移に深く関わっていることが知られている。本研究では SHR の血管平滑筋細胞を用い、細胞膜タンパク質の N-型糖鎖を解析し、増殖活性との相関を検討した。

[方法]

まず SHR 及び WKY から外植片法で血管平滑筋細胞の初代培養細胞を確立し、増殖曲線を作成して増殖活性を明らかにした。次に細胞膜タンパク質をアセトン沈殿で精製し、ウェスタンブロットの手法で SDS-PAGE 後 PVDF 膜に転写し、抗体の代わりにペルオキシ

ダーゼまたはビオチン標識した種々のレクチンと反応させ、糖鎖修飾を解析した。さらに、糖鎖は臓器特異的に発現する糖転移酵素により決定され、その酵素は遺伝子発現により調節されるので、細胞から poly (A)+RNA を調製し、糖鎖の高分岐化に関与する N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GlcNAcT V) と β -1,4-ガラクトース転移酵素 I-VI (β -1,4-GalT I-VI) の遺伝子発現をノーザンブロット法で解析した。

[結果]

ラット血管より調整した初代培養が平滑筋細胞であることは、飽和時の hills and valleys の形態と抗 α -平滑筋アクチン抗体の染色により同定した。細胞増殖曲線を描くと、細胞の倍化時間は WKY で 21.8 hr, SHR で 18.5 hr であり、飽和細胞数は、WKY で $16.5 \times 10^4/\text{cm}^2$, SHR で $29.4 \times 10^4/\text{cm}^2$ であった。

細胞膜タンパク質糖鎖の解析では、CBB による膜タンパク質の染色では高分子量のタンパク質で若干の相違が見られたが、Con A, RCA-I, L-PHA, SNA などのレクチンとの結合が複数のタンパク質バンドで増大していた。SHR は WKY に比較して、Con A の結合性が増大していたことから膜タンパク質の N-型糖鎖の付加が亢進していると考えられ、RCA-I, L-PHA, SNA との結合性の増大から、複合型糖鎖の枝分かれが亢進 (高分岐化) して末端のガラクトースやシアル酸の結合が増加していると考えられた。また N-型糖鎖をタンパク質から切り出す N-グリコシダーゼ F で処理した後に各レクチンを反応させると、バンドのほとんどは検出されず、レクチンと結合した糖鎖はアスパラギン (Asn) に結合した N-型糖鎖であることが判明した。次に、これらの糖鎖変化が SHR 由来の他の組織細胞でも起きているかどうかを解析するため、血清糖タンパク質や脳・腎臓・肝臓の細胞膜糖タンパク質を調製し、その糖鎖修飾をレクチンブロット法で解析したが、これらにおいては対照と有意な差は見られなかった。

N-型糖鎖の高分岐化に関与する遺伝子発現の解析では、SHR 由来の細胞で GlcNAcT V と β -1,4-GalT II の遺伝子発現が、WKY 由来の細胞に比して有意に増大し、 β -1,4-GalT V は減少していることが判明した。

[考察]

細胞膜タンパク質に結合した糖鎖は、細胞の接着や情報伝達に関与し、細胞の増殖分化とも深く関わっていることが明らかとなってきた。SHR 由来の血管平滑筋細胞の細胞増殖速度及び飽和細胞密度は、WKY を対照として各々約 1.2 倍, 1.8 倍であった。既存の報告でも同様の結果であり、SHR の血管平滑筋細胞の細胞増殖制御機構の変化が示唆された。レ

クチンプロットによる解析では N-型糖鎖の高分岐化が見られ、これは癌細胞と同様の変化であり、遺伝子レベルでもこれを裏付ける GlcNAcT V の発現増大が見られた。この糖鎖の相違が、WKY と SHR 由来の血管平滑筋細胞の増殖活性の差と関係していると考えられる。

糖鎖と細胞増殖の関係として研究が進んでいるものに、カドヘリンなどの細胞接着因子上にある糖鎖や、EGF や TGF- β などの細胞増殖因子の受容体上にある糖鎖がある。GlcNAcT Vにより N-カドヘリン上の N-型高分岐糖鎖及びポリ-N-アセチルラクトサミン構造が増加すると、カドヘリンと複合体を作る β -カテニンのリン酸化を誘導して細胞接着が低下、さらに遊離した β カテニンが転写因子 Tcf と結合して、細胞周期を促進する遺伝子(cyclin D1, c-myc など) の発現を誘導するという。増殖因子受容体に糖鎖が関与する例としては、受容体の膜への輸送やリガンドとの結合、二量体形成、エンドサイトーシスに影響を及ぼす例が報告されている。ガレクチン3は、GlcNAcT V などにより増加するポリ-N-アセチルラクトサミン構造に高い親和性を持つタンパク質であるが、EGF 受容体や TGF- β 受容体上の N-型糖鎖が変化するとこれらの受容体を架橋して除去を遅延させ、結果として細胞表面でこれらの受容体が増加し、増殖因子への感受性が高まる。

血管平滑筋細胞の増殖にどのように N-型糖鎖が関与しているかの直接的な証拠は得られていないが、先の報告などを考え合わせると、高分岐糖鎖がカドヘリンなどの細胞接着分子の機能を変化させたり、細胞表面の増殖因子受容体タンパクを増加させるといった機序が推定される。

しかし、糖鎖末端にガラクトースを転移する GalT に関しては、癌細胞で見られる遺伝子変化と異なり、癌化とは異なる糖鎖の生合成経路であることが判明した。ガラクトースは分岐した後の糖鎖が伸びていく土台となる糖であり、そのガラクトースの付加の順番や位置が異なることで、タンパク質の形状が変化し、機能が異なるといったことが予想される。これは SHR 由来の細胞で増殖が増大しているとはいえ、癌細胞とは質的に異なり、その増殖には制限があることと関係しているかもしれない。この末端のガラクトースが細胞増殖の制御に重要である可能性もあるが、基質特異性の解明と共に今後の研究課題である。

本研究で明らかになった血管平滑筋細胞の膜タンパク質における糖鎖修飾の変化は、初めての報告である。糖鎖変化は臓器特異的に発現する糖転移酵素の作用により決定されるが、それが血管平滑筋細胞に起こった時、その増殖に変化をもたらす、内膜肥厚を誘導し、高血圧に関与する可能性があることが本研究により示唆された。こうした糖鎖修飾の変化が、実際にどのように関与するのか、また人の高血圧においても認められるのか、今後さらに研究していく必要がある。