

## 論文の内容の要旨

論文題目 低酸素刺激による生体応答の機構

氏名 高橋理恵

### 第1章 緒言

心疾患および脳血管疾患は、共に、血液の循環が絶たれ、細胞が虚血あるいは低酸素状態に陥ることで発症する。低酸素状態による影響を細胞レベルで検討することは、それらの疾患の予後治療の向上に貢献する可能性があり、重要な研究課題である。これまでに、長時間（1時間以上）の低酸素状態への応答を細胞レベルで検討した研究は数多く報告されている。長時間の低酸素刺激は、細胞周期の停止や細胞死を誘導するが、その一方で、12時間以上の低酸素刺激の継続により、血管増殖因子（vascular endothelial growth factor: VEGF）の発現が誘導されるなど、細胞増殖や生存に向かうシグナルが伝達されていることも明らかにされてきた。また、低酸素刺激による細胞周期の停止や細胞死、VEGFの発現誘導を引き起こす細胞内シグナル伝達経路についても明らかにされている。しかし、短時間（1時間未満）の低酸素刺激の影響を検討した研究はほとんど行われていない。以上のことより、本研究は、短時間（15分間）の低酸素刺激が細胞に及ぼす影響を明らかにすることを目的として検討を行った。

## 第 2 章 低酸素刺激が心筋細胞の細胞死および細胞増殖に及ぼす影響

短時間（15 分間）の低酸素刺激がラット心筋由来株化細胞（H9c2 細胞）の細胞死や細胞増殖に及ぼす影響を明らかにし、長時間（3, 6 時間）の刺激との相違点を明確にすることを目的として検討を行った。

低酸素条件下（<2.5% O<sub>2</sub>）で、「低酸素無血清培養液（<0.1% O<sub>2</sub>）」を添加し、15 分後、3, 6 時間後に細胞数および生存率を測定した結果、長時間の低酸素刺激により、細胞数および生存率が、刺激前（0 時間）と比較して有意に減少した（Figure 2A）。また、細胞形態の変化から、長時間の低酸素刺激により apoptosis が誘導されたことが確認されたが、15 分間の刺激後には、刺激前と比較して有意な変化は認められなかった。

細胞増殖への影響を検討するために、低酸素刺激後に 24 時間培養し、細胞数を測定した（Figure 2B）。その結果、長時間（3, 6 時間）の低酸素刺激により、刺激を与えていない群（0 時間）と比較して、細胞数が有意に減少していたが、15 分間の低酸素刺激群は、細胞数が有意に増加していた（Figure 2C）。

以上のことより、15 分間の低酸素刺激は、細胞死を誘導せず、細胞増殖を促進することが明らかとなった。

## 第 3 章

### 低酸素刺激が心筋細胞の細胞内シグナル伝達経路に及ぼす影響

第 2 章で 15 分間の低酸素刺激が H9c2 細胞の細胞増殖を促進することが明らかとなったため、その作用に至る細胞内シグナル伝達経路を明らかにすることを目的として、ウェスタンブロッティング法を用いて検討した。

その結果、MEK および ERK のリン酸化レベルが normoxic control と比較して有意に促進されていた（Figure 3A）。MEK 阻害剤である PD98059 を低酸素刺激時に添加したところ、ERK のリン酸化促進作用が抑制された。また、GSK-3 $\beta$  のリン酸化レベルも有意に増加していたが、GSK-3 $\beta$  のリン酸化を制御していると考えられている Akt のリン酸化レベルには変化が認められなかった（Figure

3B)。Akt のリン酸化を制御している PI3K の阻害剤である LY294002 を低酸素刺激時に添加したところ、Akt のリン酸化は抑制されたが、GSK-3 $\beta$  のリン酸化レベルに LY294002 添加の影響は認められなかった。このことより、GSK-3 $\beta$  のリン酸化には PI3K/Akt 経路が関与していないことが示唆された。また、G1/S 期細胞周期制御シグナルの変化を検討したところ、p27 タンパク質発現レベルが有意に減少し、CDK2 および Rb のリン酸化レベルが有意に増加していた

(Figure 3C)。さらに、MEK/ERK 経路が p27 の発現量を制御しているとの報告がなされていたことから、PD98059 を低酸素刺激時に添加したところ、p27 の発現減少作用が抑制され、Rb のリン酸化増加作用も抑制されていた。以上のことより、15 分間の低酸素刺激は MEK/ERK 経路を活性化させ、細胞周期の進行を促進することが示唆された。

第 2 章において、長時間 (3, 6 時間) の低酸素刺激は apoptosis を生じさせることが明らかとなった。そのため、apoptosis の実行役である caspase-3 前駆体の発現量を検討したところ、15 分間の刺激後では刺激前と比較して変化が認められなかったのに対し (Figure 3D)、長時間の刺激後には前駆体の発現量が減少し、caspase-3 が活性化していると考えられた。また、6 時間の刺激後には、apoptosis 特有の現象である DNA の断片化も確認された (Figure 3E)。長時間の刺激後には、p-38, JNK のリン酸化増加も確認された (Figure 3F)。

#### 第 4 章 低酸素刺激による細胞増殖促進作用に対する阻害剤の影響

第 3 章において確認された MEK/ERK 経路の活性化が、第 2 章で示した細胞増殖作用の機構であることを確認するため、低酸素刺激時に MEK 阻害剤である PD98059 を添加し、細胞増殖に及ぼす影響を検討した。

阻害剤は低酸素刺激時のみ添加し、刺激後は阻害剤を除去して培養した (Figure 4A)。その結果、PD98059 添加により、低酸素刺激による細胞増殖作用が有意に抑制された (Figure 4B)。従って、15 分間の低酸素刺激が MEK/ERK 経路の活性化を介して細胞増殖を促進していることが確認された。

## 第 5 章 低酸素刺激が血管内皮細胞に及ぼす影響

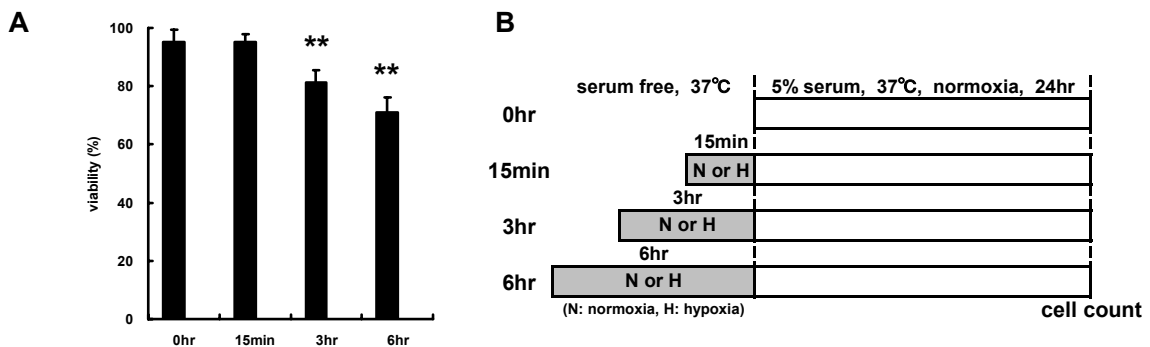
第 2 章および第 3 章において、15 分間の低酸素刺激がラット心筋由来株化細胞の細胞増殖を促進することが明らかにされた。血管内皮細胞においても同様の作用が認められれば、低酸素刺激により血管新生が促進されることとなる。よって、第 5 章では、15 分間の低酸素刺激がウシ肺動脈由来血管内皮細胞 (CPAE 細胞) に及ぼす影響を明らかにすることを目的として検討した。

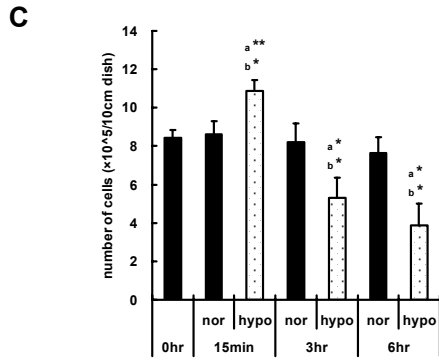
第 2, 3 章と同様に低酸素刺激を与え、ウェスタンブロッティング法を用いて検討したが、G1/S 期細胞周期制御タンパク質および MEK/ERK 経路、Akt, GSK-3 $\beta$  のリン酸化レベルに変化は認められなかった (Figure 5A, B)。従って、15 分間の低酸素刺激は、血管内皮細胞には影響を与えないと考えられた。

## 第 6 章 総括

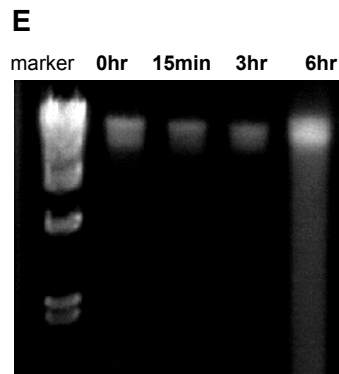
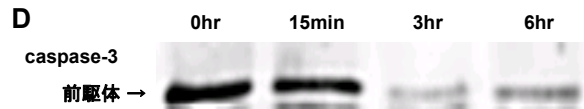
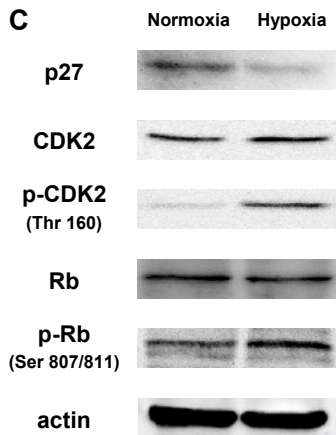
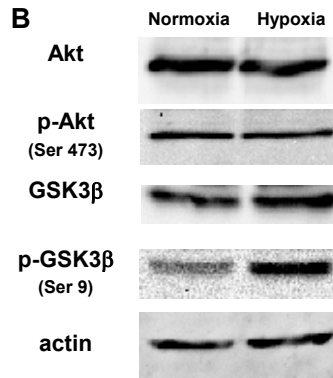
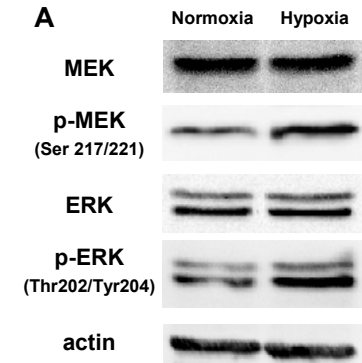
ラット心筋由来株化細胞において、15 分間の低酸素刺激は MEK/ERK 経路の活性化を介して G1/S 期細胞周期制御タンパク質の発現およびリン酸化を制御し、細胞増殖を促進することが明らかとなった。一方、長時間 (3, 6 時間) の低酸素刺激は p38, JNK の活性化を促進し、caspase-3 の活性化を介して apoptosis を誘導することも明らかとなった。しかし、15 分間の低酸素刺激は血管内皮細胞には影響を与えなかった。

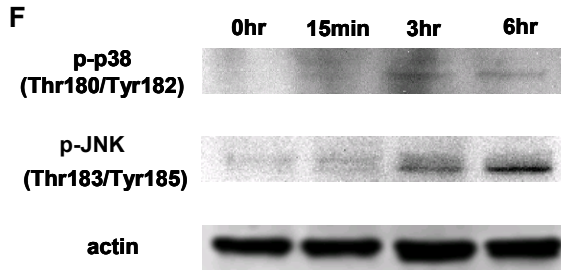
Figure 2





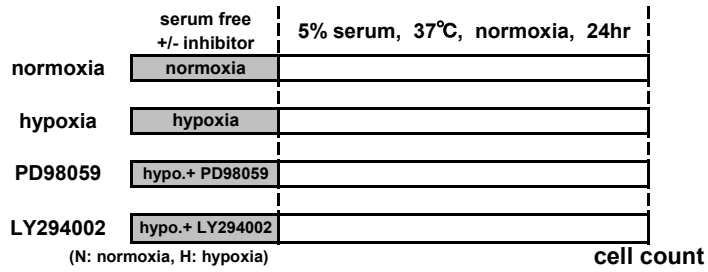
**Figure 3**



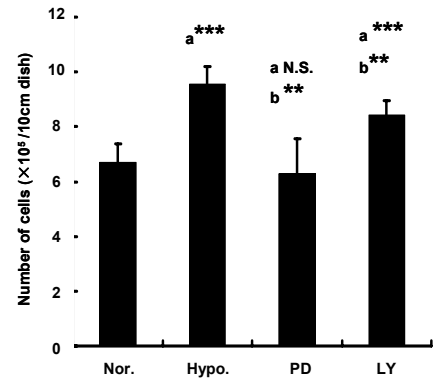


**Figure 4**

**A**

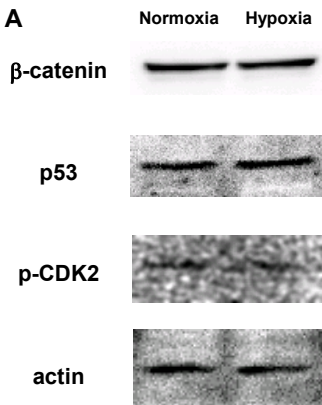


**B**



**Figure 5**

**A**



**B**

