

論文の内容の要旨

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞における植物フラボノイド,イカリンによるアンドロゲン受容体を介した一酸化窒素産生機構の解析

指導教官 大内 尉義 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 小泉 英樹

[背景] 植物フラボノイドであるイカリンは冠動脈拡張、心筋機能不全軽減、性功能改善、骨芽細胞増殖刺激等に効果があり、PDE5 阻害作用(バイアグラと共通の作用)や一酸化窒素(NO)産生の促進等、テストステロン様作用もある。テストステロンは骨密度、筋力、愛欲等の制御の他に、冠動脈疾患を予防する。血清テストステロン低値は男性では虚血性心疾患の危険因子となり、ホルモン補充療法(HRT)の適応となる。HRTは男性では前立腺癌や心血管障害、女性では乳癌や子宮癌や静脈血栓症等の副作用が問題視され、この有害事象を抑える為、HRTの代替療法が模索されてきた。そこでステロイド骨格のないイカリンのテストステロン様作用は、副作用を考えずにアンドロゲン低下症や冠動脈疾患などの管理において、まさに代替医療の名に相応しい治療になり得る可能性がある。

NOは恒常性維持や生命現象の制御に深く関わり、血管拡張、血小板凝集抑制、抗炎症、平滑筋増殖抑制などの作用がある。NOは、神経型、内皮型、誘導型の三種のNOSアイソフォームから産生され、特に内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)を介する血管内皮細胞からのNO放出は、血管の修復や新生に重要な役割を担う。

これまで、イカリンのPI3-K/Akt系やMEK/ERK1/2系の活性化に関連したNOSの刺激やNO産生促進作用が報告されているが、血管内皮細胞におけるそれらの作用機序は解明されていない。又、血管内皮細胞におけるエストロゲン受容体(ER)を介したNO産生刺激につき種々の細胞株で報告されているが、以前我々の

研究班は「血管内皮細胞におけるジンセノサイド Rb-1(ステロイド様作用を持つハーブの一つ)による PI3-K/Akt 系を介した eNOS 活性化にアンドロゲン受容体 (AR) が関与する」と報告している。本研究では ER の他、この AR とイカリンによる eNOS の活性化との関連についても着目し検討を重ねた。

ステロイド骨格を持たない天然の植物性フラボノイドで、副作用を考えずに且つステロイド様効果が得られる効率的な薬剤として将来汎用される可能性を秘めているイカリンの作用機序を明らかにすべく、eNOS の活性化や NO 産生刺激に関するイカリンの効果を評価し、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) におけるシグナル伝達や、ステロイドホルモン受容体との関連について解析することを研究目的とした。

[方法] HUVEC(継代数 5~9)を、10%FBS 含有培養液を用いて $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ で播き、コンフルエントになるまで培養後ステロイド除去した FBS 及び血清を含まない培養液で 6 時間培養し増殖を停止させた。阻害剤を用いた実験では、イカリンにて刺激する 1 時間前に阻害剤を添加した。コントロールを含め、イカリン、PD98059、wortmannin、L-NAME、ニルタマイドには溶媒に DMSO(0.001 %)を使用した。eNOS、Akt、ERK1/2 のリン酸化や阻害剤を用いたリン酸化反応や siRNA トランスフェクションの評価をウエスタン・ブロットにて行った。各種薬剤で処理後の HUVEC を lysis buffer に溶解し蛋白回収した。全てのサンプルは SDS-PAGE を行い、メンブレンにトランスファーし免疫ブロット解析した。siRNA の実験では、HUVEC を抗生剤を含まない培養液で 40-50%コンフルエントになるまで培養した。培養液を捨てトランスフェクション液 1ml を注入し、トランスフェクション用試薬を用いて細胞をトランスフェクションした。2 時間培養後に培養液 3ml を加え、更に 24 時間培養後に HBSS で洗浄し、6 時間スタベーションした。トランスフェクション効果は、抗 AR や抗 ER の抗体を用いたウエスタン・ブロットで評価した。細胞内 NO 産生の測定は、NO の間接的定量法の一つである 2,3-ジアミノナフタレンキットを用いた蛍光法により、 NO_2^- を測定することで評価した。イカリンと AR の結合の有無は、核内受容体蛍光偏光アッセイキットを用いて評価した。

[結果] ①. イカリンは血管内皮細胞において NO 産生を増加させたが、この増加は NOS 阻害剤で有意に抑制された。これは、イカリンによる NO 産生の増加は NOS 活性の上昇によって媒介されることを示唆している。イカリンによる急速な eNOS のリン酸化は刺激後 5 分より起き、60 分で最大となった。このリン酸化は、濃度依存性であった。②. イカリンによる Akt のリン酸化は刺激後 5 分から生じ、30 分で最大となった。ERK1/2 のリン酸化は刺激後 5 分から生じ、15 分で最大と

なった。このイカリンによる Akt 及び ERK1/2 のリン酸化は濃度依存性であった。

イカリンによる eNOS のリン酸化は、PI3-K 阻害剤・wortmannin で有意に抑制され、MEK (ERK1/2 の上流キナーゼ) 阻害剤・PD98059 でも部分的に抑制された。

NO 産生測定でも、ほぼ同様の傾向で抑制された。これらは、イカリンは主に PI3-K/Akt 系を介し eNOS のリン酸化や NO 産生増加を誘導するが、一部 MEK/ERK1/2 系も関与していることを示唆している。更にイカリンによる Akt のリン酸化は、wortmannin で完全に抑制された一方、PD98059 でも部分的に抑制され、又、イカリンによる ERK1/2 のリン酸化は、PD98059 で完全に抑制されたのみならず、wortmannin でも部分的に抑制された。従って、PI3-K/Akt 系と MEK/ERK1/2 系との間に、クロストークの存在が示唆された。③. イカリンによる eNOS、Akt、ERK1/2 のリン酸化は AR 阻害剤のニルタマイドで抑制されたが、ER 阻害剤の ICI182780 では抑制されなかった。NO 産生測定でもニルタマイドで NO 産生が著明に減少したが、ICI182780 では有意な変化はなかった。次に、AR の遺伝子発現の抑制を siRNA 法にて検討した。AR-siRNA でトランスフェクションされた細胞において、AR の発現は有意に減弱した。イカリンによる eNOS のリン酸化は、AR の発現抑制により有意に減弱したが、ER α -siRNA では、有意な変化はなかった。更にイカリンによる eNOS のリン酸化亢進が、核内遺伝子の転写を介するゲノム作用によるのか、転写を介さない非ゲノム作用によるのかを検討した。eNOS の活性化は転写活性阻害剤の一つであるアクチノマイシン D で抑制されなかった。従って、イカリンによる AR を介する eNOS の活性化は非ゲノム作用によると推察できる。④. イカリンと核内 AR との結合はみられなかった。当結果と、イカリンによる eNOS の活性化がアクチノマイシン D で抑制されないことを考慮し、イカリンによる AR を介する eNOS の活性化のシグナルは、genomic な作用を経由せず、何らかの情報伝達因子が媒介することによって、リガンド非依存的にシグナルが伝達されて行くものと考えた。そこで代表的なセカンドメッセンジャーの cAMP がこの経路を媒介する可能性につき着目した。イカリンによる eNOS の活性化は PKA 阻害剤の H-89 により抑制された。この結果から、イカリンによる eNOS の活性化に cAMP/PKA 系が関与することも判明したが、cAMP がどの部位に作用しているかは未解明である。

[考察] 血管内皮細胞において、イカリンが AR を介する eNOS の活性化により NO 産生を刺激することを明らかにした。

イカリンによる急速な NO 産生の増加は NOS 阻害剤で抑制された。イカリンによる eNOS のリン酸化は刺激後 5 分でみられ、60 分で最大となった。この結果は、血管内皮細胞における NO 産生の急性作用は、非ゲノム作用を介したイカリンによる eNOS のリン酸化及び活性化に帰することを示唆する。イカリンは血管内皮

細胞において、Akt や ERK1/2 のリン酸化を亢進させた。又、イカリンによって誘導された eNOS のリン酸化は、PI3-K/Akt 及び MEK の阻害剤により抑制された。これらの結果より、PI3-K/Akt 系及び MEK/ERK1/2 系を介した活性は、血管内皮細胞におけるイカリンによる eNOS のリン酸化に関与することが示唆された。

本研究で、イカリンによる eNOS のリン酸化が AR 受容体阻害剤や AR mRNA のノックダウンにより抑制されるという結果を得たが、イカリンと核内 AR の結合はみられなかった。又、イカリンによる eNOS の活性化はアクチノマイシン D で抑制されなかった。従って、イカリンの eNOS 活性化作用は、リガンド非依存的に AR を活性化するシグナル伝達経路による非ゲノム作用であると考えられる。

これらを踏まえて、イカリンによるリガンド非依存的な AR を介する eNOS の活性化は、いかなる経路でシグナル伝達が行われているか問題提起し、代表的セカンドメッセンジャーの cAMP の関与につき検討した。イカリン及びジンセノサイド Rb-1 による eNOS の活性化が PKA 阻害剤により抑制されたが、細胞応答を媒介する cAMP が直接 AR 自体を刺激するのか、または他の二次的な経路で、cAMP により ERK1/2 等が活性化し eNOS の活性化へと繋げているのか等、cAMP がどの部位に作用するのかは未解明である。しかしながら、アンドロゲン様作用を持つイカリン及びジンセノサイド Rb-1 による eNOS の活性化に cAMP/PKA 系が関与するという結果は、一般的に植物性アンドロゲンが、cAMP/PKA 系を介してリガンド非依存的に AR を刺激し機能している可能性を想像させ、これは、シグナル伝達系の始めの段階において、重要な鍵を握っていると推察される。又、イカリンによる eNOS の活性化は、非転写レベルにおいて AR に特異的なことが判明したが、どの様な環境下で AR を特異的に介するのかにつき考察を加えた。エストロゲンでは、膜蛋白に結合して数分で生じる迅速な細胞反応も知られ、この反応は遺伝子の転写を介さない非ゲノム作用で、これには膜受容体の存在が大きいとされる。AR においては、細胞膜 AR の存在に関する報告はされているものの、上記のような非ゲノム作用と膜型受容体との関連については未解明で、より複雑なシグナル伝達ネットワークの存在が予想される。イカリンによる eNOS の活性化における AR の特異的な関与には、ER において生じる、細胞膜のオーファン受容体を介し、エストロゲン依存性に他の分子と複合体を形成して行っているシグナル伝達の様なものも存在する可能性もある。ステロイド骨格を持たないイカリンが、AR を介する eNOS の活性化により NO 産生を亢進させるという本研究結果は、将来的に、植物性アンドロゲンの作用解明に向けた分子生物学レベルでの実験的解析へのきっかけとなり、各種疾患におけるイカリンによる薬理的な活性のメカニズムの更なる理解への手掛かりとなるであろう。