

審査の結果の要旨

氏名 小泉 英樹

イカリンは、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あり、近い将来、副作用をあまり考えることなく、且つステロイド様効果が得られる効率的な薬剤として汎用される可能性がある。本研究は、このイカリンの作用機序を明らかにすべく、eNOS の活性化や NO の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経路や、ステロイドホルモン受容体との関連などについて解析したものであり、下記の結果を得ている。

①. イカリンは血管内皮細胞において NO の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する。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。又、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 系も関与することを示唆する。更にイカリンによる Akt のリン酸化は、wortmannin にて完全に抑制された一方で、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 産生刺激の実験でも、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 法で検討した。AR-siRNA にてトランスフェクションされた細胞では、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ものか、転写を介さない非ゲノム作用によるものかを検討した。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。この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 にて抑制されなかったことを考慮すると、イカリンによる AR を介する eNOS の活性化のシグナルは、genomic な作用を経由せずに、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着目した。イカリンによる eNOS の活性化は PKA 阻害剤の H-89 で抑制された。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。しかしながら、アンドロゲン様作用を持つイカリンによる 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。

以上、本論文は、血管内皮細胞において、ステロイド骨格のないイカリンが、AR を介する eNOS の活性化により NO の産生を刺激し、これには、PI3K/Akt 経路や MEK/ERK1/2 経路及び cAMP/PKA 経路が関与していることを明らかにした。

本研究で得られた結果は、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な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学的な活性メカニズムの解明に関し、重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。