

学位論文題名

Epiregulin as a major autocrine/paracrine factor released from the ERK-and p38MAPK-activated vascular smooth muscle cells

(血管平滑筋細胞脱分化因子としてのエピレグリンの同定とその発現およびシグナル解析)

学位論文内容の要旨

I. 背景

今日の成人疾患の多くを占める虚血性心疾患や脳血管疾患は、その基礎疾患として動脈硬化に起因することが知られている。この動脈硬化は血管内皮細胞の障害が引き金となるが、さらに続いて中膜平滑筋細胞が分化型から脱分化型へと形質転換し、増殖・遊走すると共に細胞外基質、増殖因子やサイトカインを分泌して最終的に内膜肥厚をきたす。これは、経皮的冠動脈インターベンション後の再狭窄病変の形成においても同様と考えられている。このように血管平滑筋細胞の形質転換は、血管病変形成の鍵となる重要な現象である。

血管平滑筋細胞の形質転換を誘起する因子(脱分化因子)は現在多数知られており、これら脱分化因子の下流のシグナル伝達系を解析することで形質転換のメカニズムを明らかにしようとする研究が数多くなされている。しかし、これらの研究は血清存在下で増殖・継代した培養血管平滑筋細胞(脱分化型平滑筋細胞)を用いているため、分化型平滑筋細胞から脱分化型平滑筋細胞への形質転換の分子機構を的確に解析することが不可能であった。そこで、申請者は分化型形質を維持可能な血管平滑筋細胞の初代培養系を確立し、これを用いて形質転換の分子機構の解析を進めた。この過程で、分化型平滑筋細胞に強制的に ERK と p38MAPK を活性化させると、ヘパリン非結合性のタンパク質因子を分泌し、周囲の分化型平滑筋細胞を脱分化させることを見出した。この分泌因子による平滑筋細胞の脱分化は、EGF 受容体チロシンキナーゼの特異的阻害剤(AG1478)で著明に抑制されるため、EGF ファミリーの増殖因子であることが示唆された。

II. 目的

本研究では、上記の分泌性血管平滑筋細胞脱分化因子を同定し、この因子による平滑筋細胞脱分化の分子機構を明らかにすること、さらに動脈硬化巣やバルーン傷害モデルなどのリモデリングを受けた血管組織と正常血管組織におけるこの因子の発現を比較し、本因子と動脈硬化症の発症・進展の関わりを検討することを目的とした。

III. 方法

ラット大動脈由来の血管平滑筋細胞をラミニン上で IGF-1 の存在下に培養を行う分化型血管平滑筋細胞の初代培養系を用いて以下の解析を行った。培養血管平滑筋細胞の形質の評価は形態、収縮能、および RT-PCR による平滑筋細胞分子マーカーの mRNA の発現を指標にした。MEK1(ERK kinase)および MKK6(p38MAPK kinase)の active form のトランスフェクションにより両 MAPK を強制的に活性化させた血管平滑筋細胞の培養上清をヘパリン-アフィニティーおよび

High Q カラムクロマトグラフィーで分画し、各々の分画の脱分化能およびシグナル伝達系を解析した。エピレグリンの発現は抗エピレグリン抗体および RT-PCR により解析した。さらに、ヒト動脈硬化巣およびラットのバルーン傷害モデルにおけるエピレグリンの発現を免疫染色法により検討した。

IV. 結 果

ERK と p38MAPK を強制的に活性化させた血管平滑筋細胞の培養上清(CM1)は著明な平滑筋細胞脱分化能を有し、ERK と p38MAPK の両 MAPK 系および PKB(Akt)の活性化が認められた。CM1 をヘパリン-アフィニティーで分画すると脱分化活性は非結合分画にのみ認められた。さらに、このヘパリン非結合分画を High Q カラムクロマトグラフィーで分画したところ、0.3M NaCl で溶出した分画(E3)が脱分化活性を示した。E3 による血管平滑筋細胞の脱分化は、AG1478 の添加または ERK 阻害剤(PD98059)、p38MAPK 阻害剤(SB203580)の両者の添加により抑制された。また、E3 による両 MAPK 系の活性化もこれらの阻害剤により抑制された。このことから、E3 に含まれる脱分化因子は EGF 受容体を介して両 MAPK 系を活性化させて血管平滑筋細胞の脱分化を誘起することが示唆された。High Q カラムクロマトグラフィーにおける脱分化因子の溶出パターンは EGF ファミリーの増殖因子であるエピレグリンと類似するため、CM1 および E3 を抗エピレグリン抗体を用いて免疫沈降法を行ったところ、エピレグリンが検出された。さらに、抗エピレグリン中和抗体の添加で E3 による血管平滑筋細胞の脱分化は抑制された。以上により、ERK と p38MAPK の活性化を受けた血管平滑筋細胞の培養上清に含まれる脱分化誘導因子はエピレグリンであることが同定された。また、分化型血管平滑筋細胞をエピレグリンで刺激すると、ERK、p38MAPK と共に PKB(Akt)が活性化された。

血管平滑筋細胞の脱分化因子である不飽和 LPA または PDGF-BB の刺激を受けた分化型血管平滑筋細胞は、短時間(30 分以内)でエピレグリン mRNA の発現を誘起し、この発現は 24 時間以上持続して見られた。また、これら脱分化因子で誘導されるエピレグリンの発現は、PD98059 と SB203580 の両者を添加することで完全に抑制されたが、各々単独では完全には抑制されなかった。さらに、ヒト動脈硬化症におけるエピレグリンの発現を RT-PCR により検討したところ、動脈硬化巣ではエピレグリンが発現していたのに対し正常血管では見られなかった。抗エピレグリン抗体を用いた免疫組織染色の結果、動脈硬化の初期病巣(形質転換を起こした中膜平滑筋層)にエピレグリンの発現が認められた。また、ラットバルーン傷害モデルでのエピレグリン発現の検討では、1 日目に血管内腔に発現し、2 日目には中膜内側で発現し、やがて 7 日目に新生内膜に拡がっていたが、21 日目には消失していた。

V. 考 察

本研究で ERK および p38MAPK を強制的に活性化させた血管平滑筋細胞が分泌する脱分化因子がエピレグリンであることを同定した。さらに、不飽和 LPA または PDGF-BB の刺激を受けた分化型血管平滑筋細胞からも両 MAPK 系依存性にエピレグリンが生成・分泌される。これら培養系での解析結果から、ERK と p38MAPK の協調的活性化により脱分化誘導を受けた血管平滑筋細胞は迅速にエピレグリンの発現・分泌を誘起し、分泌されたエピレグリンがさらに自己・傍分泌的に近隣の分化型血管平滑筋細胞の脱分化を促進することが示唆された。また、本研究により初めて動脈硬化巣でのエピレグリンの発現を明らかにした。動脈硬化巣でのエピレグリンの発現は形質転換を起こした中膜平滑筋層に限定されることから、エピレグリンは血管平滑筋細胞の増殖・遊走よりも、むしろ血管平滑筋細胞の形質転換の極早期に関与している可能性が高い。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 三 輪 聡 一
副 査 教 授 北 畠 顕

学 位 論 文 題 名

Epiregulin as a major autocrine/paracrine factor released from the ERK-and p38MAPK-activated vascular smooth muscle cells

(血管平滑筋細胞脱分化因子としてのエピレグリンの同定と
その発現およびシグナル解析)

血管中膜平滑筋細胞が分化型から脱分化型へと形質転換する現象は血管病変形成にとって極めて重要である。申請者は、分化型形質を維持可能な血管平滑筋細胞の初代培養系を確立し、これを用いて形質転換の分子機構の解析を進めた。この過程で、分化型平滑筋細胞に強制的に ERK と p38MAPK を活性化させると、ヘパリン非結合性のタンパク質因子を分泌し、周囲の分化型平滑筋細胞を脱分化させることを見出した。この分泌因子による平滑筋細胞の脱分化は、EGF 受容体チロシンキナーゼの特異的阻害剤 (AG1478) で著明に抑制されるため、EGF ファミリーの増殖因子であることが示唆された。そこで、この分泌因子を同定し、この因子による平滑筋細胞脱分化の分子機構を明らかにし、さらに動脈硬化巣やバルーン傷害モデルなどにおけるこの因子の発現を検討し、本因子と動脈硬化症の発症・進展の関わりを検討した。分化型血管平滑筋細胞に ERK と p38MAPK を強制的に活性化させた血管平滑筋細胞の培養上清 (CM1) は著明な平滑筋細胞脱分化能を有し、ERK と p38MAPK の両 MAPK 系および PKB (Akt) の活性化が認められた。CM1 をヘパリン-アフィニティーで分画すると脱分化活性は非結合分画にのみ認められた。さらに、このヘパリン非結合分画を High Q カラムクロマトグラフィーで分画したところ、0.3M NaCl で溶出した分画 (E3) が脱分化活性を示した。E3 による血管平滑筋細胞の脱分化は、AG1478 の添加または ERK 阻害剤 (PD98059)、p38MAPK 阻害剤 (SB203580) の両者の添加により抑制された。また、E3 による両 MAPK 系の活性化もこれらの阻害剤により抑制された。このことから、E3 に含まれる脱分化因子は EGF 受容体を介して両 MAPK 系を活性化させて血管平滑筋細胞の脱分化を誘起することが示唆された。High Q カラムクロマトグラフィーにおける脱分化因子の溶出パタ

ーンは EGF ファミリーの増殖因子であるエピレグリンと類似するため、CM1 および E3 を抗エピレグリン抗体を用いて免疫沈降法を行ったところ、エピレグリンが検出された。さらに、抗エピレグリン中和抗体の添加で E3 による血管平滑筋細胞の脱分化は抑制された。以上により、ERK と p38MAPK の活性化を受けた血管平滑筋細胞の培養上清に含まれる脱分化誘導因子はエピレグリンであることが同定された。また、分化型血管平滑筋細胞をエピレグリンで刺激すると、ERK、p38MAPK と共に PKB (Akt) が活性化された。血管平滑筋細胞の脱分化因子である不飽和 LPA または PDGF-BB の刺激を受けた分化型血管平滑筋細胞は、短時間 (30 分以内) でエピレグリン mRNA の発現を誘起し、この発現は 24 時間以上持続して見られた。また、これら脱分化因子で誘導されるエピレグリンの発現は、PD98059 と SB203580 の両者を添加することで完全に抑制されたが、各々単独では完全には抑制されなかった。さらに、ヒト動脈硬化症におけるエピレグリンの発現を RT-PCR により検討したところ、動脈硬化巣ではエピレグリンが発現していたのに対し正常血管では見られなかった。抗エピレグリン抗体を用いた免疫組織染色の結果、動脈硬化の初期病巣 (形質転換を起こした中膜平滑筋層) にエピレグリンの発現が認められた。また、ラットバルーン傷害モデルでのエピレグリン発現の検討では、1 日目に血管内腔に発現し、2 日目には中膜内側で発現し、やがて 7 日目に新生内膜に拡がっていたが、21 日目には消失していた。本研究で、脱分化誘導を受けた血管平滑筋細胞は ERK と p38MAPK の活性化により迅速にエピレグリンの発現・分泌を誘起し、分泌されたエピレグリンがさらに自己・傍分泌的に近隣の分化型血管平滑筋細胞の脱分化を促進することが示唆された。また、エピレグリンは血管平滑筋細胞の形質転換の極早期に関与している可能性が高いことが示唆された。

口頭発表に際し、副査の三輪教授からエピレグリン単独での形質転換への寄与、他の増殖因子との協調作用について質問があった。次いで副査の北畠教授よりエピレグリンの受容体、および臨床応用についての質問があった。最後に主査の長嶋教授からエピレグリンの血管修復に関するプロセスの解釈、および平滑筋細胞の分化維持培養系の手技について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果に基づいて、あるいは文献的知識により、概ね適切に回答し得た。

この論文は、血管平滑筋細胞の形質転換におけるエピレグリンの発現およびシグナル伝達系を明らかにしたものとして意義のあるものと評価された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。