

血管平滑筋増殖抑制に対するラパマイシンの 作用機序の検討

—細胞周期抑制と cyclin-dependent kinase inhibitor(CKI) の関係—

学位論文内容の要旨

背景：静止期にある正常血管中膜平滑筋細胞が増殖型の Phenotype に変化する際には、細胞外からの増殖刺激が平滑筋細胞の核内に伝達され、G0 からの逸脱、G1-S 期への進行が促される。G1-S 移行には cdk inhibitor である p27Kip1 の分解促進が重要なステップであるが、我々の研究からは p27Kip1 分解は p57Kip2 の発現量により規定されていることが示されている。すなわち、増殖刺激が核内に伝達されることにより p57Kip2 の蛋白分解が促進され、その結果 p27kip1 をリン酸化する酵素活性が上昇し、p27kip1 の核外への汲み出しと蛋白分解が進行することが示唆されている。薬剤溶出ステントに用いられているラパマイシンの平滑筋細胞増殖抑制の詳細な機序は未だ明らかではないが、FK506 結合蛋白 (FKBP12) および mTOR (mammalian target of rapamycin) と複合体を形成し、mTOR による未知の蛋白リン酸化酵素の活性化を抑制し、p27Kip1 の分解を抑制するとされている。その一方で p27Kip1 のノックアウトマウスにおいても、ラパマイシンは新生内膜の増生を抑制することから、ラパマイシンの作用点が p27Kip1 であることを疑問視する報告もある。本研究では培養血管平滑筋にラパマイシンを添加した際の p57Kip2、p27Kip1 の変化、p27Kip1 の分解に作用する蛋白の変化、p27Kip1 の細胞内局在の変化を検討し、ラパマイシンの平滑筋細胞増殖抑制機構の分子機構について考察した。

方法：胎児ラット大動脈由来血管平滑筋細胞 A10 (ATCC) を使用した。培地を DMEM/0.5% FBS に交換して 60 時間培養し G0/G1 期に同調させた後、DMEM/10% FBS に交換し血清刺激を加えた。刺激前および刺激開始 8,12,16,20,24 時間後に DMEM/10% FBS/³H チミジン 10⁴Ci/ml に交換し 37°C 5% CO₂ の条件下で 90 分培養し ³H の取り込みを行い、DNA の合成の指標とした。次にラパマイシンを 1,3,10,30,100,300nmol/l の各濃度で添加し、同様の方法で ³H チミジン取り込みを測定した。次に Western blot 法による p57Kip2、p27Kip1、Jab1、CRM1 の蛋白検出を行ない、それぞれに対するラパマイシンの効果を検討した。次に p27Kip1 の細胞内局在の変化を観察する目的で、緑色蛍光蛋白 (EGFP) 標識 p27Kip1 (p27Kip1-EGFP と EGFP-p27Kip1) を培養平滑筋細胞に一過性発現させ、血清刺激およびラパマイシンの効果を検討した。精製プラスミドを A10 細胞に導入し、蛍光顕微鏡による観察を行った。

結果：A10 細胞における細胞周期同調後の ³H チミジン取り込みを経時的に解析した結果、血清添加による増殖刺激を加えて、12 時間後より ³H チミジン取り込みの増加が見られ、16 時間後に最大となった。20 時間後、24 時間後と取り込みは減少していった。ラパマイシン各濃度における ³H チミジン取り込み

検討したでは、1nmol/l のラバマイシンを添加した群より高濃度の群で、コントロール群と比し有意に³H チミジン取り込みを抑制した。Western blot 法による蛋白に対するラバマイシンの影響を検討では p27Kip1 蛋白は血清除去による G0/G1 静止期では増加し、血清刺激によりコントロール群では 8 時間後から血清刺激開始時に比して有意な減少を認め、20 時間後まで低い発現量が維持された。一方ラバマイシン添加群では p27Kip1 蛋白の減少は抑制されていた。p57Kip2 蛋白は血清除去による G0/G1 静止期では増加し、血清刺激によりコントロール群では 4 時間後から血清刺激開始時に比して有意な減少を認め、16 時間後まで低い発現量が維持された後、再度増加することが確認された。ラバマイシン添加群では p57Kip2 蛋白の減少は p27Kip1 蛋白同様に抑制されていた。Jab1 蛋白および CRM1 蛋白は血清刺激 20 時間までコントロール群、ラバマイシン添加群ともに有意差を認めなかった。p27Kip1 の細胞内局在に対するラバマイシンの影響を検討では、p27Kip1-EGFP と EGFP-p27Kip1 のそれぞれを発現するプラスミドを細胞内へ取り込ませ観察したところ、コントロール群では細胞質への移行が認められたが、ラバマイシン添加群では細胞質の蛍光発光は認められず、核内にプラスミドが留まっていることが確認された。

考察：ラバマイシンは一定濃度で A10 細胞の細胞周期を止め、細胞増殖を抑制することが示された。諸家の報告によると、ラバマイシンは p27Kip1 の分解を抑制し細胞増殖を抑制するとされている。しかし p27Kip1 ノックアウトマウスにおいても同様の効果があるとの報告もある。我々の結果ではラバマイシンは p27Kip1 ばかりでなく、p57Kip2 の蛋白分解も抑制することが示されており、mTOR が連関する蛋白リン酸化酵素は p57Kip2 も標的としている可能性が考えられる。我々はすでに p57Kip2 の強制発現モデルにおいて、p27Kip1 の血清刺激による蛋白減少が抑制されることを確認しており、血清刺激により p27Kip1 蛋白の減少に先立ち p57Kip2 蛋白の減少が認められたことを考え合わせると、ラバマイシンは p57Kip2 を介して p27Kip1 に働いている可能性がある。p57Kip2 のノックアウトマウスは胎生致死あるいは生後まもなく死亡する。一方、p27Kip1 のノックアウトマウスは正常に発生し、成長するが、最終的に正常マウスよりも体重が増加し、6~12 ヶ月まで生存する。p27Kip1 は様々な処理により誘導され、細胞周期の停止を起こすが、p27Kip1 ノックアウトマウスにおいてもこれらの処理による細胞周期の停止すると報告されている。これらの遺伝子改変動物モデルも、p57Kip2 が p27Kip1 の作用を補完的に行なっているという我々の仮説を支持するものであると考えられる。p27Kip1 が CKI として機能をもつためには、核内に局在することが必要である。p27Kip1 の核外移行に Jab1 と CRM1 が深く関わっていると考えられている。今回の我々の検討では Jab1、CRM1 ともにラバマイシンの添加によって変化をきたすことはなく、コントロール群と有意差を認めなかった。このことから p27Kip1 蛋白の減少には、G1 早期の S10 リン酸化を制御しているリン酸化酵素 (kinase interacting stathmin) の活性調節が重要であると考えられる。

結語：ラバマイシンは胎児ラット大動脈由来の血管平滑筋細胞の細胞周期を止めることによって増殖を抑制した。ラバマイシンは p27Kip1 蛋白と p57Kip2 蛋白の両方の減少を抑制していること、p27Kip1 の核外移行を抑制していることが明らかとなった。ラバマイシンと p57Kip2 の関係についての報告は他になく、今までの我々の知見と合わせて、p57Kip21 が p27Kip1 に対し補完的な役割を果たしている可能性も示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 頭
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 川 口 秀 明

学 位 論 文 題 名

血管平滑筋増殖抑制に対するラパマイシンの 作用機序の検討

—細胞周期抑制と cyclin-dependent kinase inhibitor(CKI) の関係—

静止期にある血管平滑筋細胞が増殖型の Phenotype に変化する際には、増殖刺激が核内に伝達され、G0 からの逸脱、G1-S 期への進行が促される。G1-S 移行には p27Kip1 の分解促進が重要なステップである。ラパマイシンは平滑筋細胞増殖抑制薬として最近されているが、その機序は未だ明らかではない。過去の報告では cyclin-dependent kinase inhibitor である p27Kip1 の分解を抑制するとされている。その一方で p27Kip1 のノックアウトマウスにおいても、ラパマイシンは新生内膜の増生を抑制することから、ラパマイシンの作用点が p27Kip1 であることを疑問視する報告もある。本研究では培養血管平滑筋にラパマイシンを添加した際の p57Kip2、p27Kip1 の変化、p27Kip1 の分解に作用する蛋白の変化、p27Kip1 の細胞内局在の変化を検討し、ラパマイシンの平滑筋細胞増殖抑制機構の分子機構について考察した。

胎児ラット大動脈由来血管平滑筋細胞 A10 (ATCC) を使用した。培地を低血清培地に交換して 60 時間培養し G0/G1 期に同調させた後、血清刺激を加えた。刺激前および刺激開始後 4 時間毎に ³H チミジンの取り込みを行ない、DNA の合成の指標とした。次にラパマイシンを 1,3,10,30,100,300nmol/l の各濃度で添加し、³H チミジン取り込みを測定した。次に Western blot 法による p57Kip2、p27Kip1、Jab1、CRM1 の蛋白検出を行ない、それぞれに対するラパマイシンの効果を検討した。次に p27Kip1 の細胞内局在の変化を観察する目的で、緑色蛍光蛋白 (EGFP) 標識 p27Kip1 を培養平滑筋細胞に一過性発現させ、血清刺激およびラパマイシンの効果を検討した。

A10 細胞における細胞周期同調後の ³H チミジン取り込みを経時的に解析した結果、血清刺激を加えて、12 時間後より取り込みの増加が見られ、16 時間後に最大となった。ラパマ

イシン各濃度における ^3H チミジン取り込み検討したでは、 1nmol/l のラバマイシンを添加した群より高濃度の群で、DNA 合成は抑制された。Western blot 法による蛋白に対するラバマイシンの影響を検討では p27Kip1 蛋白は血清除去による G0/G1 静止期では増加し、血清刺激によりコントロール群では 8 時間後から血清刺激開始時に比して有意な減少を認めたが、ラバマイシン添加群では p27Kip1 蛋白の減少は抑制されていた。p57Kip2 蛋白は血清除去による G0/G1 静止期では増加し、血清刺激によりコントロール群では 4 時間後から血清刺激開始時に比して有意な減少を認めたが、ラバマイシン添加群では p57Kip2 蛋白の減少は p27Kip1 蛋白同様に抑制されていた。Jab1 蛋白および CRM1 蛋白は血清刺激 20 時間までコントロール群、ラバマイシン添加群ともに有意差を認めなかった。p27Kip1 の細胞内局在に対するラバマイシンの影響を検討では、コントロール群では細胞質への移行が認められたが、ラバマイシン添加群では核内にプラスミドが留まっていることが確認された。

ラバマイシンは一定濃度で A10 細胞の細胞周期を止め、細胞増殖を抑制することが示された。今回の結果ではラバマイシンは p27Kip1 ばかりでなく、p57Kip2 の蛋白分解も抑制することが示されており、mTOR が連関する蛋白リン酸化酵素は p57Kip2 も標的としている可能性が考えられる。p27Kip1 の核外移行に Jab1 と CRM1 が深く関わっていると考えられているが、今回の検討では Jab1、CRM1 とともにラバマイシンの添加によって変化をきたすことはなく、コントロール群と有意差を認めなかった。このことから p27Kip1 蛋白の減少には、G1 早期の S10 リン酸化を制御しているリン酸化酵素の活性調節が重要であると考えられる。

ラバマイシンは胎児ラット大動脈由来の血管平滑筋細胞の細胞周期を止めることによって増殖を抑制した。ラバマイシンは p27Kip1 蛋白と p57Kip2 蛋白の両方の減少を抑制していること、p27Kip1 の核外移行を抑制していることが明らかとなった。ラバマイシンと p57Kip2 の関係についての報告は他になく、今まで知見と合わせて、p57Kip21 が p27Kip1 に対し補完的な役割を果たしている可能性も示唆された。

口頭発表に際し、川口教授から p27Kip1 分解のメカニズムと、内皮細胞の細胞周期についての質問がなされた。次いで長嶋教授から p27Kip1 が核内に留まる理由とその核内での分解および p57Kip2 との関係について質問がなされた。最後に北畠教授から薬物溶出ステントの臨床的意義とラバマイシンと心肥大についての関係について質問がなされた。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、概ね妥当な回答を行った。

この論文は、BMIPP の心筋集積に及ぼす虚血後経過時間の影響を明らかにしたものとして意義のあるものと評価され、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。