

## [課程-2]

### 審査の結果の要旨

氏名 清水 峻志

本研究は低酸素負荷に伴う小胞体ストレスが、肺動脈性肺高血圧症(Pulmonary artery hypertension, PAH)の原因である肺血管リモデリングに果たす役割を、成人マウスから単離した培養肺動脈平滑筋細胞(Pulmonary artery smooth muscle cell, PASMC)および、慢性低酸素とVEGF受容体拮抗薬で誘導されるマウス PAH モデルを用いて検討したものである。この研究により次のことが示された。

1. 培養肺動脈平滑筋 (PASMC) で培地条件を検討したところ、低酸素(O<sub>2</sub> 4% 48 時間)下では、培地にタンパク質を添加しないと細胞の増殖が生じなかった。このことより細胞外にタンパク質が存在することが PASMC の増殖に重要であることが示唆された。
2. 蛍光標識アルブミンを添加した培地で PASMC を低酸素下で培養すると上記のように細胞増殖が誘導されるが、この際、標識アルブミンが細胞内小胞体へ取り込まれていることを示した。これは clathrin inhibitor (エンドサイトーシス阻害剤)で抑制された。このことよりエンドサイトーシスによって細胞内にタンパクが取り込まれ、小胞体に蓄積することが示された。
3. 小胞体ストレス下流である PERK-eIF2 シグナル経路の ATF4(Activating transcription factor 4)、CHOP(CCAAT /Enhancer-Binding Protein Homologous Protein)、c-MYC(V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral)の遺伝子発現レベルは、タンパク質を含む培地で低酸素下に培養し増殖を誘導した PASMC では全て上昇していたが、これらは clathrin inhibitor で抑制された。以上から、エンドサイトーシスによって取り込まれた細胞外タンパク質が小胞体に集積することによって、小胞体ストレス反応の一つである PERK-eIF2 シグナルが亢進することを示唆している。
4. タンパク質を含む培地で低酸素下に培養し増殖を誘導した PASMC では細胞内に Stress granules (SGs) という mRNA-タンパク質複合体の形成を認めた。この系において PERK 経路を薬理的に阻害すると SGs の形成は認められず、細胞増殖も抑制された。一方で SGs の分解を阻害する harmine を加えることにより、細胞増殖はさらに亢進した。以上より、SGs と細胞増殖が関連していることが示された。

5. マウス PAH モデルにおいて、PERK inhibitor を投与すると、肺動脈の PERK signaling が抑制され、肺動脈中膜における細胞増殖を抑制し、肺血管リモデリングの改善が認められた。観血的カテーテル検査及び経胸壁エコー検査による生理学的評価でも右心室圧の低下と、右心不の改善が認められた。

以上、本論文は、低酸素暴露によって肺動脈平滑筋が増殖する機序として、エンドサイトシス、小胞体ストレス、特にその下流 PERK-eIF2 シグナルの重要性を明らかにしたものである。さらに PERK inhibitor が平滑筋増殖抑制に作用する PAH 治療薬として有望な候補であることを示した。本研究は肺動脈性肺高血圧の分子病態理解と、新規治療に貢献するものであり、学位授与に値するものと考えられる。