

# 博士論文

肺動脈高血圧症における分子病態の解明に関して

清水 峻志

博士学位論文

論文題目      肺動脈高血圧症における分子病態の解明に関して

所属            東京大学大学院医学系研究科    内科学専攻(医学博士課程)

器官病態内科学講座    循環器内科学

指導教官      小室一成    教授

申請者        清水峻志

平成 27(2015)年 11 月 13 日

## 目次

1. 要旨	6
2. 序文	12
2-1. 肺動脈高血圧症 (Pulmonary artery hypertension, PAH) の概観	12
2-1-1. PAH の定義	12
2-1-2. PAH の分類	12
2-1-3. PAH の疫学と予後及び治療	13
2-1-4. PAH の病態	13
2-2. 小胞体ストレス及びそれに伴う小胞体ストレス応答反応 (unfolded protein response:UPR) の概観	15
2-2-1. 小胞体ストレスと UPR	15
2-2-2. PERK と UPR	16
2-2-3. PERK 下流シグナル	17
2-2-4. PERK/eIF2 $\alpha$ シグナルによる stress granules (SGs) の発現	18
2-3. PAH における肺血管リモデリング (肺動脈中膜肥大) に関する先行研究	18
2-3-1. 肺血管リモデリング (肺動脈中膜肥大) と小胞体ストレスに関する先行研究	18
2-3-2. 遺伝性 PAH におけるプロテオーム解析に関する先行研究	19
2-3-3. 癌細胞増殖における細胞外タンパク質のエンドサイトーシスによる細胞内取り込みに関する先行研究	19
2-3-4. 先行研究では未解明な問題点	20
3. 目的	21
3-1. PERK signaling と細胞増殖	22
3-2. 低酸素負荷と小胞体ストレス	23
4. 方法	24
4-1. 動物	24
4-2. マウス肺高血圧モデル (低酸素負荷+SU5416)	24
4-3. PERK inhibitor (gsk2606414) 投与	24
4-4. 右室圧測定	25
4-5. 経胸壁エコー	25
4-6. 末梢肺動脈中膜肥大の測定	25
4-7. 右室心筋肥大測定	25
4-8. 肺動脈平滑筋細胞 (Pulmonary artery smooth muscle cell, PASMC) の単離	25
4-9. PASMC における fluorescein isothiocyanate (FITC)-albumin の取り込	

み	26
4-10. 低酸素下における clathrin-mediated endocytosis と UPR の関連	26
4-11. 蛍光免疫染色	27
4-12. wheat-germ agglutinin (WGA) 染色による右室心筋細胞断面積測定	27
4-13. リアルタイム Polymerase Chain Reaction (PCR) による mRNA 定量	28
4-14. タンパク質抽出とウエスタンブロッティング	28
4-15. 統計解析	29
5. 結果	30
5-1. In Vitro における UPR と PASMC の増殖に関する検討	30
5-1-1. 低酸素負荷による PASMC 増殖には細胞外タンパク質が必要である	30
5-1-2. 低酸素下における FITC-albumin の取り込みと PASMC の増殖	31
5-1-3. PASMC 内に取り込まれた FITC-albumin の小胞体への集積	32
5-1-4. 細胞外アルブミンが無いと小胞体ストレスは抑制される	33
5-2. PERK/eIF2 $\alpha$ シグナルと PASMC の増殖	34
5-2-1. 低酸素負荷による、ストレスグラニュール (SGs) の形成	35
5-2-2. Harmine による PASMC 増殖の亢進	36
5-2-3. SGs と UPR	37
5-3. マウス PAH モデルにおける PERK inhibitor 及び Harmine の作用	38
5-3-1. PERK inhibitor は右室圧を軽減することによって右心不全を改善する	38
5-3-2. Harmine HCl は明らかな右心不全増悪を来さない	46
5-3-3. PERK inhibitor は肺血管リモデリングを改善する	46
5-3-4. PERK inhibitor は UPR target genes の発現を抑える	48
6. 考察	51
6-1. 本研究を通じて分かった事実	51
6-2. 本研究の独自性	53
6-2-1. PAH において小胞体ストレスが起きる機序の解明	53
6-2-2. 小胞体ストレスによって惹起される PERK signaling が PASMC の増殖に関与していることを解明	54
6-3. 本研究の限界と今後の展望	55
6-3-1. In Vivo 実験における endocytosis と小胞体ストレスの関連に関して検討を行っていない	55
6-3-2. PERK をノックアウトした In Vitro 及び In Vivo 実験を行っていない	56
6-3-3. SGs が PASMC を増殖させる機序が解明されていない	56

6-3-4. 異なる PAH モデルにおける PERK inhibitor の有効性に関して検討されていない . . . . .	58
6-3-5. まとめ—PAH 病態と癌病態との比較 . . . . .	58
7. 引用文献 . . . . .	60
8. 謝辞 . . . . .	70

## 1. 要旨

肺動脈高血圧症 (pulmonary artery hypertension, PAH) は肺血管リモデリングに伴う肺動脈血管抵抗の増大によって平均肺動脈圧が 25mmHg 以上に持続的に上昇した病態であり、病態の進行に伴い、右心不全など他臓器の不全を来す予後不良な疾患である。2010 年時点において日本に難病登録されている PAH の患者は 1500 人弱であり、20 代～50 代と比較的若者に多い。1980 年代までは、5 年生存率が約 30%であったが、1990 年代以降、プロスタグランジン製剤、エンドセリン受容体拮抗薬、ホスホジエステラーゼ 5 阻害薬などの血管拡張薬が使用されるようになり、現在では 5 年生存率は約 65%と改善した。しかしながら PAH の年齢分布は若年層に多く、長期予後の改善という点においては未だに不十分である。肺血管リモデリングは内皮障害に伴う血管攣縮と肺動脈平滑筋細胞増殖に伴う肺動脈中膜肥大が主要な病態であると考えられている。現在 PAH 治療に使用されている血管拡張薬は血管攣縮を改善することで長期的なリモデリング改善を期待するというものであるため、肺動脈平滑筋細胞増殖に伴う肺動脈中膜肥大を直接のターゲットにした新規治療薬が求められている。

PAH の肺血管リモデリング (肺動脈中膜肥大) に関与すると考えられているメカニズムの一つに、小胞体ストレス及びそれに伴う小胞体ストレス応答反応 (unfolded protein response: UPR) がある。小胞体は細胞内小器官であり、酸

化ストレスや細胞内カルシウム調節異常などによって、その内腔に折りたたみ不全タンパクが蓄積する（小胞体ストレス）。この際、細胞はUPRという防御システムを活性化させる。これは小胞体膜上の3つのストレスセンサー[IRE1(Inositol-Requiring Enzyme 1)、PERK(PKR-like endoplasmic reticulum kinase)、ATF6(Activating transcription factor 6)]が異常タンパクの蓄積を感知し細胞質、核内にシグナルを伝えることによってタンパクの翻訳抑制や修復、分解を誘導するという機構である。これまでの報告では、タンパク折り畳みを改善するケミカルシャペロン(4-phenylbutylate, PBA)が、小胞体ストレスを改善して肺動脈平滑筋細胞の増殖を抑制し、マウス PAH モデルのフェノタイプを改善することが示されている。しかしながら、肺高血圧病態における小胞体ストレスの役割について、その詳細な分子メカニズムは未だに解明されていない。そこで本研究では以下の2点について解明することを目的にした。

①In Vitro, In Vivo とともに低酸素負荷を与えることによって肺動脈平滑筋増殖、血管リモデリングが誘導されることは知られているが、何故、低酸素負荷によって小胞体ストレスが生じるのか。

②小胞体ストレス及びUPRによって肺血管リモデリング(特に肺動脈平滑筋細胞の増殖)が何故起きるのか。UPRの下流シグナルの中には細胞増殖及び細胞死を誘導する様々なシグナルが含まれているが、どのシグナルが病態に重要であるのか。

遺伝性(Bone morphogenetic protein receptor type II)肺高血圧症患者由来の肺動脈平滑筋細胞を用いた実験でのプロテオーム解析によると、遺伝性肺高血圧症患者由来の肺動脈平滑筋細胞では健常人由来の肺動脈平滑筋細胞に比べて、タンパク合成に関わる eukaryotic initiator factor(eIF) 2 シグナリング及びエンドサイトーシスに関わる clathrin-mediated endocytosis シグナリングが亢進していることが報告されている。一方、PAH と同様に細胞増殖をきたす癌細胞では、細胞外タンパクを endocytosis によって取り込むことが細胞の増殖に重要であることが近年報告されている。

そこで、これらの先行研究の内容から、以下の2つの仮説を立てた。

(Ⅰ)低酸素負荷によって肺動脈平滑筋細胞に小胞体ストレスが加わる機序としてエンドサイトーシスが関与する。

(Ⅱ)小胞体ストレスセンサーの一つである PERK と、その下流にある eIF2 シグナリングが肺動脈平滑筋細胞の細胞増殖に関与する。

これらの仮説を成人マウスから単離した肺動脈平滑筋培養細胞(In Vitro) , マウス特発性 PAH モデル[低酸素(O<sub>2</sub> 8.5%) 負荷+SU5416(VEGFR II inhibitor)投与 4 週間] (In Vivo)にエンドサイトーシス阻害剤(Pitstop2) 及び PERK inhibitor(gsk2606414)を用いて検証した。In Vitro では細胞外タンパク質を含まない Insulin-Transferrin-Selenite(ITS)- Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 培地で培養した肺動脈平滑筋細胞に低酸素負荷(O<sub>2</sub> 4% 48 時間)を



かけたところ、細胞増殖は認められなかった。

しかし、これに細胞外タンパク質として bovine serum albumin を負荷した培地で同様に低酸素負荷を加えると、細胞増殖が認められた。以上から肺動脈平滑筋細胞においても癌細胞同様に細胞外タンパク質をエンドサイトーシスによって細胞内に取り込むことが細胞増殖に重要であると考えられた。

蛍光標識した fluorescein isothiocyanate (FITC)-albumin を ITS-DMEM に加え、低酸素負荷したところ、FITC-albumin の細胞内への取り込み、さらには小胞体内への集積が確認できた。

次に分子レベルで、小胞体ストレス下流の PERK-eIF2 シグナルのマーカである 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 (mRNA) を qRT-PCR で調べた。ITS-DMEM に bovine serum albumin を加えないで低酸素負荷をした場合にはこれらの mRNA の発現は増加しなかったが、ITS-DMEM に bovine serum albumin を加えて低酸素負荷をした場合にはこれらの mRNA の発現が亢進した。後者条件 (低酸素+アルブミン) に、エンドサイトーシス阻害剤を加えると、細胞外タンパク質 (FITC-アルブミン) の肺動脈平滑筋細胞内への取り込みの減少、及び小胞体への FITC-アルブミンの集積は認められず、前述のマーカ遺伝子の発現亢進も認められなかった。

次に PERK-eIF2 シグナリングの役割について検討した。前述の低酸素+アルブミ

ンで誘導される細胞増殖は PERK inhibitor で抑制され、PERK-eIF2 シグナリングが細胞増殖に重要であることが示された。

癌細胞では PERK-eIF2 シグナリングが活性化すると Stress granules (SGs) という mRNA とタンパク質の複合体を形成して細胞増殖に作用することが報告されているが、本研究でも培養肺動脈平滑筋細胞に、低酸素負荷を加えると、同様に SGs が形成されることが確認された。これは、PERK inhibitor 投与下では認められず、肺動脈平滑筋細胞においても PERK、SGs が細胞増殖の鍵であることが示唆された。

これら一連の In Vitro の実験より、以下のような分子機序が考えられた。

(i) エンドサイトーシスによる細胞外タンパク質の肺動脈平滑筋細胞内への取り込まれ、さらに小胞体内に集積することによって小胞体ストレスが生じる。

(ii) 小胞体ストレスによって誘導される UPR の内、PERK signaling 活性化が肺血管リモデリング(肺動脈中膜肥大)に重要である。

最後に In Vivo において慢性低酸素と VEGF 受容体拮抗薬で誘導されるマウス PAH モデルに PERK inhibitor を投与すると、肺動脈平滑筋細胞の 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。

4 週間の PERK inhibitor の連日投与による明らかな副作用も認められず、PERK

inhibitor は平滑筋増殖抑制に作用する有望な新規 PAH 治療薬候補であると考えられた。

## 2. 序文

### 2-1. 肺動脈高血圧症 (Pulmonary artery hypertension, PAH) の概観

#### 2-1-1. PAH の定義

PAH とは、安静時に右心カテーテル検査を用いて実測した肺動脈平均圧が 25mmHg 以上の病態と定義される。

#### 2-1-2. PAH の分類

2013 年に発表されたニース分類(肺高血圧症を原因に基づいて分類したもので、WHO I ～V 群に分類)において、PAH は肺高血圧症 WHO I 群に分類された。WHO I 群はさらに以下のように分類された(1)。

- I -1. 特発性 PAH (idiopathic PAH, IPAH)
- I -2. 遺伝性 PAH (heritable PAH, HPAH)
- I -3. 薬物や中毒に伴う PAH
- I -4. 結合組織病などの疾患に伴う PAH
- I ' 肺静脈閉塞性疾患及び肺毛細血管腫症
- I ' ' 新生児遷延性肺高血圧症。

I 群の PAH の中で最も有病率が高いのが IPAH (その他の原因を否定した除外診断) (39.2%) である。IPAH の 3 年生存率は約 60% (2) と予後不良な疾患である。

とりわけ、男性、右心不全を伴う場合、運動機能が低下している場合には予後が不良である (3)。

今回マウス IPAH モデルを使用し、IPAH の分子病態に関して研究を行った。

### 2-1-3. PAH の疫学と予後及び治療

PAH の有病率及び発病率は、それぞれ 15 人/100 万人、2.4 人/100 万人/年と報告されている(4)。2010 年時点において日本に難病登録されている PAH の患者は 1500 人弱であり、年齢分布は 20 代～50 代と比較的若者に多い。

1980 年代まで、PAH の 5 年生存率は約 30%であった(5)。1990 年代以降、プロスタグランジン製剤、エンドセリン受容体拮抗薬、ホスホジエステラーゼ(PDE)5 阻害薬などの血管拡張薬が使用されるようになり、現在では 5 年生存率は約 65%と改善した。内科的治療で病態の改善に難渋する患者には肺移植も行われるようになってきたが、移植後の 5 年生存率は約 50%に過ぎない。

PAH の年齢分布は若年層に多く、長期予後の改善という点においては未だに不十分である。そのため、PAH(肺血管リモデリング)の病態により則した新規治療薬が求められている。

### 2-1-4. PAH の病態

PAH の病因である肺血管リモデリングの病理学的評価は 1958 年に提唱された Heath-Edwards 分類に準じている(5)。肺小動脈中膜筋層の肥厚(I)、肺小動脈の内膜細胞増殖による内腔狭小化(II)、内膜の細胞増殖及び線維化による内腔狭小化(III)、叢状変化(IV)に分類され、病態の増悪に伴って進行する。しかしニース分類 I 群 PAH 全般において、上記分類が病態の進行と共に変化するかは

分かっていない。病態に関して未解明な点が多いが、以下のように病態は進行すると考えられている(6)。

①低酸素などによるストレスにより肺動脈内皮細胞が傷害され、血管の攣縮が惹起される。また、一部の肺動脈内皮細胞に細胞死(apoptosis)が生じ、内膜の機能不全(バリア機能の喪失、血管構造恒常性の崩壊)が生じる(6)。

②血管内腔から血液成分(免疫細胞、アルブミンなど)が中膜及び外膜に浸潤する(7)。

③血液成分の浸潤に伴う刺激により内膜、中膜、外膜それぞれにおいて細胞増殖シグナルが亢進し、血管リモデリングが生じる(6)。

④血管リモデリングによって肺血管抵抗の上昇、肺動脈圧の上昇、右心不全が誘発される(6)。

このような肺血管リモデリングの中心となる病態は内皮障害に伴う血管攣縮と肺動脈平滑筋細胞(pulmonary artery smooth muscle cell, PASMC)増殖に伴う肺動脈中膜肥大である。血管攣縮を改善する血管拡張薬(エンドセリン受容体拮抗薬、PDE5 阻害薬、プロスタグランジン製剤等)は既に臨床で使用されているが、PASMC 増殖を抑制する治療薬に関しては臨床で使用されてるものはほとんど無く、新規治療薬が望まれている。PDGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬である imatinib、nilotinib、dasatinib や、EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬である gefitinib、erlotinib や、マルチキナーゼ阻害薬である sorafenib、sunitinib

が動物実験レベルで肺血管リモデリングを改善することが報告された(5)。しかしながら、imatinib の無作為比較試験等では有効性が証明されず(8)、臨床応用までには到っていない。

PASMC の細胞増殖を引き起こす病態として、炎症、代謝異常、酸化ストレス、感染、低酸素など様々な要因が知られている。これらに共通する分子病態として小胞体ストレスが関与していることが示唆されており(9)、本研究はこのメカニズムに注目した。

## 2-2. 小胞体ストレス及びそれに伴う小胞体ストレス応答反応(unfolded protein response:UPR)の概観

### 2-2-1. 小胞体ストレスと UPR

小胞体は細胞内小器官であり、酸化ストレスや細胞内カルシウム調節異常などによって、その内腔に折りたたみ不全タンパク(unfolded protein)が蓄積する(小胞体ストレス)。小胞体ストレスが加わると細胞は unfolded protein response (UPR) という防御システムを活性化させる(図 1)。これは小胞体膜上のストレスセンサー[IRE1(Inositol-Requiring Enzyme 1)、PERK(PKR-like endoplasmic reticulum kinase)、ATF6(Activating transcription factor 6)]が異常タンパク質の蓄積を感知し細胞質、核内にシグナルを伝えることによってタンパクの翻訳抑制や修復、分解を誘導するという機構である(10)。

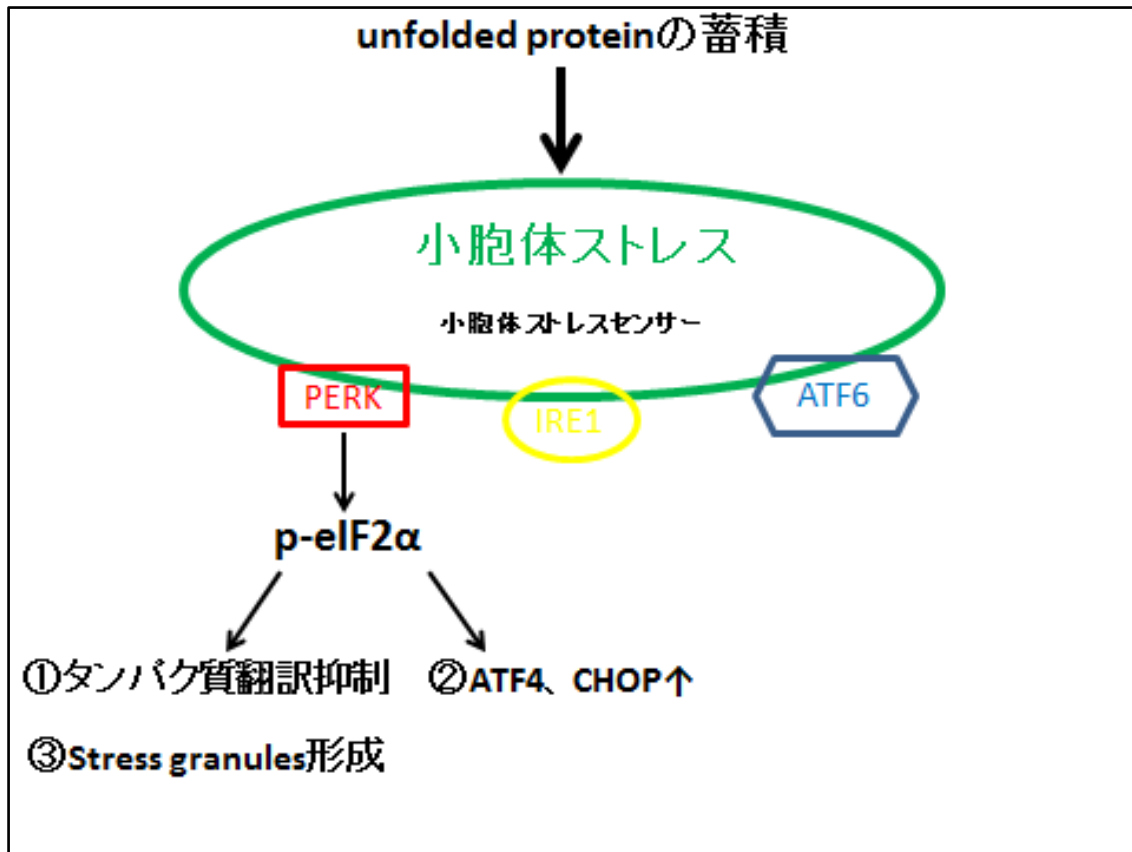


図1. 小胞体ストレスと unfolded protein responds (UPR) 及び PERK シグナリングの関係性  
小胞体は細胞内小器官であり、酸化ストレスや細胞内カルシウム調節異常などによって、その内腔に折りたたみ不全タンパク (unfolded protein) が蓄積する (小胞体ストレス)。小胞体ストレスが加わると細胞は unfolded protein response (UPR) という防御システムを活性化させる。これは小胞体膜上のストレスセンサー [IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme 1)、PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase)、ATF6 (Activating transcription factor 6)] が異常タンパク質の蓄積を感知し細胞質、核内にシグナルを伝えることによってタンパクの翻訳抑制や修復、分解を誘導するという機構である。

小胞体ストレスを感知した PERK は eIF2 $\alpha$  をリン酸化する。リン酸化された eIF2 $\alpha$  は以下のように作用する。

①タンパク質翻訳抑制、②ATF4、CHOP などの mRNA 発現の亢進、③Stress granules (SGs) の形成

## 2-2-2. PERK と UPR

UPR を誘導する上記ストレスセンサーのうち、PERK の活性化が特に重要であると

と考えられている。UPR の多くはこのシグナルによって制御をうけていること



(11)、PERK の下流 signal は細胞増殖を惹起すること (12)、が報告されている。

また PERK inhibitor (gsk2606414) は癌研究分野において細胞増殖を抑制する新たな薬剤として注目されている (13)。

### 2-2-3. PERK 下流シグナル

小胞体内に unfolded protein が蓄積すると、小胞体内で PERK と結合している Binding immunoglobulin protein (BiP) が分離する。そして PERK は二量体を形成し、自己リン酸化 (Thr980) が起きる。その後 PERK は eukaryotic initiator factor (eIF)  $2\alpha$  をリン酸化 (Ser51) する (14)。eIF2 はタンパク質翻訳開始因子の一部を構成し、40S リボソームサブユニットに tRNA が結合し、43S 複合体になるのを媒介している (15)。タンパク質翻訳が開始するには 43S 複合体に messenger ribonucleic acid (mRNA) が結合し、48S 複合体が形成される必要がある (16)。eIF2  $\alpha$  がリン酸化されると、40S と tRNA の結合を媒介できなくなり、タンパク質翻訳が始まらない。しかしながら、5' UTR (Five prime untranslated region) に upstream open reading frames (uORFs) を持つ mRNA (ATF4 など) の転写は亢進する (17)。ATF4 (Activating transcription factor 4) の下流シグナルは CHOP (CCAAT/Enhancer-Binding Protein Homologous Protein) などの転写を直接制御するだけでなく、小胞体ストレスの別のセンサーである ATF6 の下流シグナル (11) や細胞増殖に関わる c-MYC (V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral

Oncogene Homolog)なども制御している(18)。

#### 2-2-4. PERK/eIF2 $\alpha$ シグナルによる stress granules(SGs)の発現

SGsとは細胞質基質内に集積する粒状の構造物で、タンパク質翻訳開始因子(eIF2、eIF4など)、リボソームの40Sサブユニット、タンパク質翻訳が行われていないmRNA、G3BP1[GTPase Activating Protein (SH3 Domain) Binding Protein 1]などのRNA binding proteinsから構成されている(19)。SGsは主にeIF2 $\alpha$ のリン酸化(Ser51)が起点となって生じる(20)。

SGsはReceptor For Activated C Kinase 1(RACK1)(21)、angiogenin(22)、mammalian target of rapamycin complex 1(mTORC1)(23)などと相互作用し、細胞増殖を亢進することが報告されている。

#### 2-3. PAHにおける肺血管リモデリング(肺動脈中膜肥大)に関する先行研究

##### 2-3-1. 肺血管リモデリング(肺動脈中膜肥大)と小胞体ストレスに関する先行研究

PAHの原因として、炎症、低酸素、Bone morphogenetic protein receptor type II(BMPRII)変異などによるTGF $\beta$ シグナリングの異常などが知られている(24, 25, 26)。これらの原因に共通する分子学的機序として、小胞体ストレスが関与していることが示唆されている(27, 28)。最近小胞体ストレスを軽減するケミカル

シャペロン (4-phenylbutylate, PBA) が肺血管リモデリングを抑制するという論文 (29) が発表された。すなわちマウス PAH モデル及びラット PAH モデルに、それぞれ PBA を経口投与 (500mg/kg/day) すると、肺動脈圧、肺血管リモデリングの改善が認められた。また In vitro で単離肺動脈平滑筋に低酸素負荷 (4% O<sub>2</sub>, 48h) をかけると、小胞体ストレスがかかり、細胞増殖シグナルが亢進した。しかしながら、2mM PBA を加えると、細胞増殖シグナルは抑制された。これらの結果から低酸素負荷が小胞体ストレスを引き起こすこと、小胞体ストレスが細胞増殖シグナルを亢進させること、PBA は小胞体ストレスを軽減させることによって、細胞増殖シグナルを抑制することが示唆される。

#### 2-3-2. 遺伝性 PAH におけるプロテオーム解析に関する先行研究

また別の報告では、遺伝性 (BMPRII 変異) 肺高血圧症患者由来の肺動脈平滑筋細胞と健常人由来の肺動脈平滑筋細胞を網羅的なプロテオーム解析を行った (30)。前者ではタンパク質合成及びエンドサイトーシスに関わるタンパク質の発現が亢進していた。分子シグナルではタンパク質合成に関わる eIF2 シグナリング、及びエンドサイトーシスに関わる clathrin-mediated endocytosis シグナリング、caveolar-mediated endocytosis シグナリングが亢進していた。

#### 2-3-3. 癌細胞増殖における細胞外タンパク質のエンドサイトーシスによる細胞内取り込みに関する先行研究

細胞増殖を抑制する抗癌剤(imatinib など)を動物(マウスあるいはラット)PAHモデルに投与すると、PAHの病態が改善することが複数の論文で報告されており(5)、PAHにおけるPASMCの分子病態(細胞増殖などに関する)は癌細胞の分子病態に酷似していると考えられている。

癌細胞では血流、酸素、栄養の乏しい環境下において、細胞外タンパク質をendocytosisによって取り込むことによって細胞増殖することが近年報告された(31)。

#### 2-3-4. 先行研究では未解明な問題点

肺血管リモデリング(肺動脈中膜肥大)と小胞体ストレスに関する先行研究では、①低酸素負荷によって何故小胞体ストレスが生じるのか、②小胞体ストレス及びUPRによって肺血管リモデリング(特にPASMCの増殖)が何故起きるのか十分に検証されなかった。

遺伝性PAHにおけるプロテオーム解析に関する先行研究では、亢進している分子シグナルがPAHの病態にどのように関わるか不明であった。

癌細胞増殖における細胞外タンパク質のエンドサイトーシスに関する先行研究では、同様のエンドサイトーシスが低酸素下のPASMCでも起きているのか、起きている場合、細胞増殖とどのように関与しているのか不明であった。

### 3. 目的

PAH の原因である肺血管リモデリングの主な機序として、内皮障害に伴う血管攣縮と PASMC の増殖に伴う中膜肥大がある。既存の PAH の治療薬は前者(血管攣縮)の改善を目的とした血管拡張薬が大半であり、後者(中膜肥大)の改善を目的とした新規治療薬が望まれている。上記の先行研究では低酸素負荷が小胞体ストレスを亢進すること、小胞体ストレスが PASMC の増殖を誘導することを示したが、それぞれの機序は明らかになっていない。本研究では下記の内容を明らかにすることを目的とした(図 2)。

- ①低酸素負荷において肺動脈平滑筋に小胞体ストレスが加わる機序(図 2 ①)。
- ②小胞体ストレス反応によって活性化される PERK シグナリングによって肺動脈平滑筋細胞の増殖が誘導される機序(図 2②)。

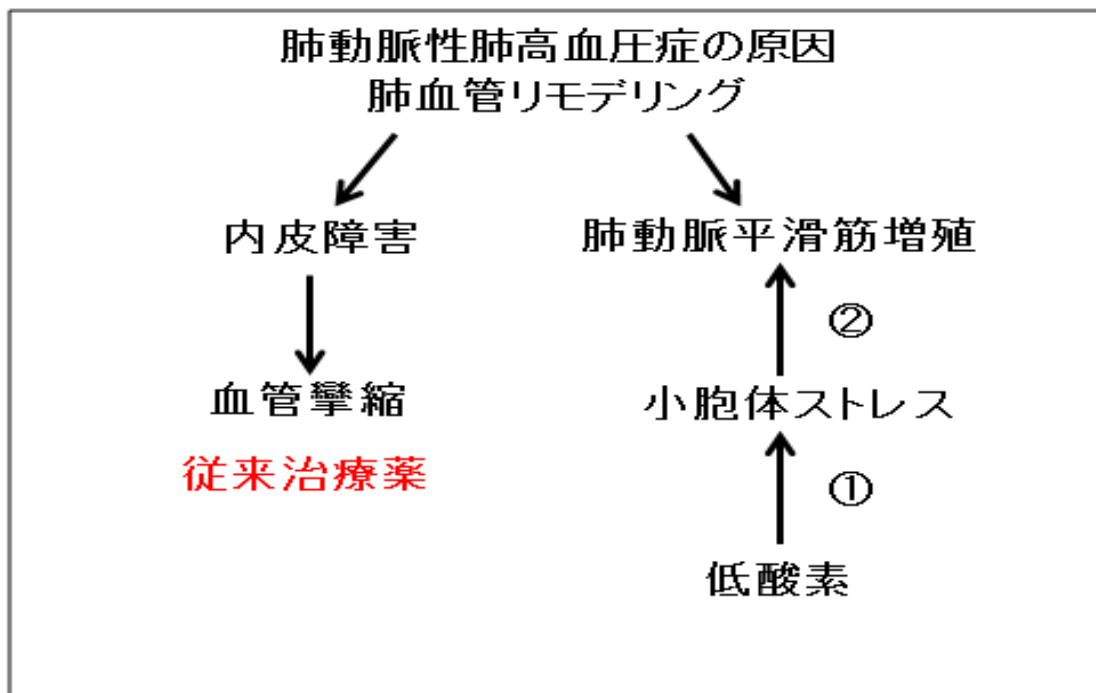


図 2. 本研究の目的

①低酸素負荷において肺動脈平滑筋に小胞体ストレスが加わる機序、及び②小胞体ストレス反応によって活性化される PERK シグナリングによって肺動脈平滑筋細胞の増殖が誘導される機序、の解明を本研究の目的とした。

### 3-1. 低酸素負荷と小胞体ストレス

低酸素負荷によって小胞体ストレスが引き起こされることは癌領域などで報告されているが、その詳細な分子機序に関しては明らかになっていない。前述の先行研究(29)の In vitro 実験においては、FBS(fetal bovine serum)を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)培地において PASM C に低酸素負荷を行い、小胞体ストレスを誘導している。FBS はウシの胎児の血液から調製された血清であり、細胞増殖を亢進する成長因子やアルブミンなどのタンパク質を多く含んでいる。ごく最近、細胞増殖に必要なタンパク質、塩基の原料として、

細胞外タンパク質の endocytosis による細胞内取り込みが重要であることが報告された(31)。

以上の内容を踏まえ、低酸素下では endocytosis が、小胞体ストレス誘導及び細胞増殖に関与しているという仮説を立て、その検証を行った。すなわち In Vitro 実験においては低酸素負荷条件は先行研究と同じ条件 (normoxia or 4%O<sub>2</sub> 48h) とし、培地条件に関しては成長因子やタンパク質を含まない Insulin-Transferrin-Selenite(ITS)- DMEM 培地を基本培地とし、それに bovine serum albumin(BSA)を加えた場合に小胞体ストレス及び細胞増殖に関してどのような差異が生じるか実験を行った。

### 3-2. PERK signaling と細胞増殖

PERK の下流に位置する反応経路が細胞増殖を惹起すること (12)は癌等の研究領域では既に報告されているが、低酸素負荷下の PASM C において PERK シグナリングが細胞増殖にどの様に作用するかは不明である。

本研究では In Vitro において、低酸素下の PASM C に PERK inhibitor (gsk2606414) を投与の有無によって、細胞増殖がどのような影響を受けるか検証した。また In Vivo 実験系において、マウス肺高血圧モデルに PERK inhibitor を投与して、対照群と比較検討を行った。病態評価の内容として、生理学的評価(観血的心カテーテル検査、経胸壁エコー検査)、病理学的評価(肺動脈、心臓)、生化学的評価(タンパク質、mRNA)を行った。

## 4. 方法

### 4-1. 動物

全ての動物実験は東京大学動物実験委員会の承認の下行われた(動物実験計画書 医-P14-035)。

雄の C57BL/6 マウスは日本クレアから購入し、生後 7-9 週で実験に使用した。

### 4-2. マウス肺高血圧モデル(低酸素負荷+SU5416)

マウスは normoxia 又は hypoxia (O<sub>2</sub> 8.5%) 室 (Biospherix, New York, NY) +SU5416 (VEGFR2 inhibitor, 20mg/kg/week i.p.) 投与にランダムに割り付けし、4 週間観察した (32)。低酸素室は薬剤投与時及びケージ交換時に開放した。1 群当たり n=10-11 匹で実験を行った。

### 4-3. PERK inhibitor (gsk2606414) 及び harmine hydrochloride (DYRK3 inhibitor, SGs の分解を阻害) 投与 (In Vivo)

In Vivo 実験において、PERK inhibitor 投与群には gsk2606414 (Medkoo, catalog #406393) は 2mg/kg/回 i.p. を朝晩 1 日 2 回行った (13)。また Harmine 投与群には harmine hydrochloride (10mg/kg/日) (東京化成) i.p. を行った。Vehicle control マウスには生食 i.p. を行った。PERK inhibitor 及び harmine hydrochloride の投与は、低酸素負荷と SU5416 投与と同時に 4 週間行った。



#### 4-4. 右室圧測定

麻酔(イソフルラン 0.8%)下に開胸したマウスの右室へ four-electrode pressure-volume catheter SPR-839 (Millar Instruments)を挿入し、カテーテル先端の微圧計で右室圧を測定した。

#### 4-5. 経胸壁エコー

経胸壁エコーは VEV02100 (Visualsonics, Toronto, Canada)を用いて、右室機能(RVFAC, TAPSE, PAAT など)の測定を行った(33)。

#### 4-6. 末梢肺動脈中膜肥大の測定

マウス肺のパラフィン切片(厚さ 4mm)を作成してに H&E 染色を行い、その病理組織像から、末梢肺動脈(外径 30~100  $\mu$ m)の%MWT(percent medial wall thickness)を計算した。計算式は以下の通り。

$$[2 \times (1 - \text{肺動脈内径} / \text{肺動脈外径})] \times 100\% \quad (29)$$

#### 4-7. 右室心筋肥大測定

体外に取り出した心臓を右室(right ventricle, RV)と左室+中隔(left ventricle+Septum, LV+S)に分け、RV/LV+Sの重量比(Fulton index)を求めた。

#### 4-8. 肺動脈平滑筋細胞(Pulmonary artery smooth muscle cell, PASMC)の単離

PASMCはC57BL/6マウスの肺動脈からHardingらの方法により単離した(14)。単

離した PASC 10%FBS-DMEM で培養し、Confluence になったら継代を行い、継代 2~6 回目のものを In Vitro 実験に使用した。Confluence になった PASC の培地は ITS-DMEM あるいは ITS-DMEM+3%BSA に変更した後、37°C、normoxia ( $O_2$  21%) 又は hypoxia ( $O_2$  4%) にて 48 時間観察し細胞を回収した。薬物は低酸素負荷開始前にそれぞれ投与した。

4-9. PASC における fluorescein isothiocyanate (FITC)-albumin の取り込み  
単離した PASC を 96well plate で培養した。Confluence になったら、0.5% w/v FITC-albumin を投与した。その後遮光下で normoxia ( $O_2$  21%) 又は hypoxia ( $O_2$  4%) にて 48 時間観察し細胞を回収した。PBS で 2 回洗浄後、plate reader (485nm/535nm) で relative fluorescence unit (RFU) を評価した。また BCA 法により各 well 内にある細胞ホモジネートのタンパク質濃度を測定し、RFU/mg protein を計算した。

4-10. 低酸素下における clathrin-mediated endocytosis と UPR の関連  
アルブミンなどの細胞外タンパク質を細胞内へ取り込む分子機序として、clathrin-mediated endocytosis が中心的な役割を果たしている (34)。我々は clathrin-mediated endocytosis 特異的阻害薬である Pitstop2 (30  $\mu$  M, abcam) (35) を用いて、低酸素下における clathrin-mediated endocytosis による細胞外タンパク質の細胞内への取り込みの有無が小胞体ストレス及び UPR とどのよう

に関連するか評価を行った。

#### 4-11. 蛍光免疫染色

PASMC の細胞免疫染色にはメタノール/アセトン混合液(1:1、-20℃)による固定を行い、一次抗体(anti-G3BP1 rabbit antibody(1:50, Santa cruz, CA)、anti- $\alpha$  SMA mouse antibody(1:500, Santa cruz, CA)、anti-Ki67 rabbit antibody(1:50, Abcam, Cambridge, UK))によるインキュベーション(常温、3時間)を行った。PBS 洗浄後 2 次抗体(anti-rabbit Alexa Fluor(1:500, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France)、anti-mouse Alexa Fluor(1:500, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France))でインキュベーション(常温、1時間)を行った。核染色は Hoechst を使用した。

肺のパラフィン切片の組織免疫染色に関しても脱パラフィン後、上記同様に一次・二次抗体を反応させ、核染色には DAPI (Vector Lab) を使用した。

画像撮影は蛍光顕微鏡(FSX100、Olympus Life Science)を用いて行った。

#### 4-12. wheat-germ agglutinin (WGA) 染色による右室心筋細胞断面積測定

パラフィン切片上の心臓に tetramethyl rhodamine isothiocyanate-conjugated WGA で心筋細胞膜を染色した。右室心筋細胞の染色像を撮影後、Image J を用いて断面積を測定した。

#### 4-13. リアルタイム Polymerase Chain Reaction(PCR)による mRNA 定量

組織片又は細胞ペレットからの total RNA 抽出は TRI reagent(コスモバイオ)を用いた。High capacity RNA-to-cDNA Kit(Life Technologies, #4387406)で cDNA を得た後、下記遺伝子のプライマー及び THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(TOYOBO, #QPS-201)を用いて、LightCycler480(Roche Applied Science)によるリアルタイム PCR を行った。

ATF4: Forward atgatggcttggccagt, Reverse ccattttctccaacatccaatc

CHOP: Forward gcgacagagccagaataaca, Reverse tcaggtgtggtggtgtatgaa

c-MYC: Forward ttcctttgggcgttgaaac, Reverse gctgtacggagtcgtagtcg

GAPDH: Forward catggccttccgtgttcta, Reverse cctgcttcaccttcttgat

#### 4-14. タンパク質抽出とウエスタンブロッティング

肺動脈及び PASC は 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)を添加した cell lysis buffer(cell signaling technology, #9803)に溶解し homogenize した。得られたタンパクライセートは、BCA 法によりタンパク質濃度を測定した。1 レーンあたり、50-120  $\mu$ g のタンパクライセートを loading し、5-20%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い分離した。分離後、PVDF 膜に転写した。スキムミルク (5%) でブロッッキング(常温、1 時間)後、一次抗体[anti PERK antibody(1:200, Santa cruz)、anti p-PERK(Thr980) antibody(1:100, cell signaling technology)、anti eukaryotic eIF2 $\alpha$  antibody(1:1000, cell signaling

technology)、anti p-eIF2 $\alpha$  (Ser51) antibody(1:1000, cell signaling antibody)]によるインキュベーションを行った(4°C overnight)。TBS-T で洗浄後、二次抗体(anti rabbit IgG 抗体(1:1000 cell signaling technology))でインキュベーション(常温、1 時間)を行い、さらに TBS-T で十分に洗浄後、ECL (GE healthcare)で化学発光させ、X 線 film に現像した。

#### 4-15. 統計解析

SPSS を用いて以下の統計解析を行った。

分散解析は一元配置分散分析(one-way analysis of variance、パラメトリックな場合)又は Kruskal-Wallis 法(ノンパラメトリックな場合)を用いた。事後解析(post hoc analysis)には Bonferroni test(パラメトリック及びノンパラメトリック共に)を用いた。二群間の解析は un-paired t-test によって行った。

p<0.05 を有意差ありとした。

## 5. 結果

### 5-1. In Vitro における UPR と PASM C の増殖に関する検討

成人マウスから単離した PASM C を用いて、低酸素負荷条件において細胞外タンパク質が PASM C の増殖及び UPR にどのような影響を及ぼすか検討した。

#### 5-1-1. 低酸素下における PASM C の増殖には細胞外タンパク質が必要である

癌細胞は血流、酸素、栄養の乏しい環境下において、細胞外タンパク質を endocytosis によって取り込むことによって増殖する (31)。低酸素下で PASM C の増殖にも同様のメカニズムが作用するか否かに関して、3% bovine serum albumin (Alb) を細胞外から投与することによって検証した。本研究では、培地として ITS-DMEM (以下 ITS) 及び ITS+3% Alb の 2 種類を用いた。図 3 の通り、Hypoxia+ITS 群 ( $7.8 \pm 2.4\%$ ) では Normoxia+ITS 群 ( $2.8 \pm 1.3\%$ ) に比べて Ki67 (細胞増殖のマーカー) 陽性細胞率は上昇しなかったが、Hypoxia+ITS+3% Alb 群 ( $18.3 \pm 3.2\%$ ) では有意 ( $p < 0.05$ ) に上昇した。Hypoxia+ITS+3% Alb+clathrin inhibitor 群 ( $11.4 \pm 2.6\%$ ) では、Hypoxia+ITS+3% Alb 群に比べて、Ki67 陽性細胞率は有意に低下した。

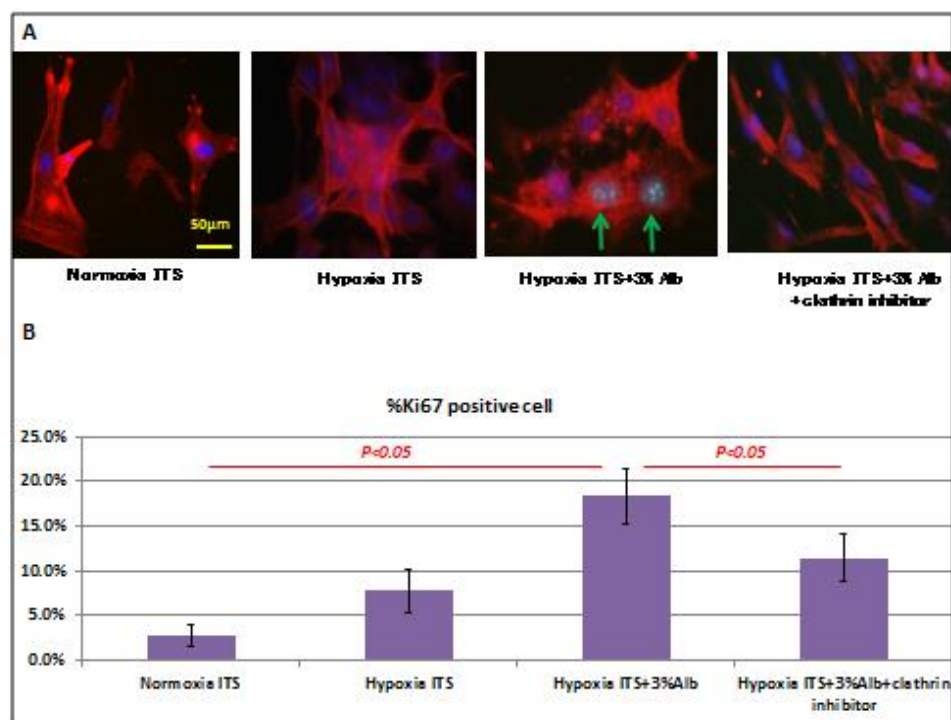


図 3. 低酸素負荷及びアルブミン投与における PASM の増殖

A αSMA を赤色に、核を青色に染色し、各群を蛍光顕微鏡で観察した。

Hypoxia (02 4% 48 時間) だけでは Ki67 (緑) 陽性細胞は出現せず、Hypoxia+3%Albumin 投与にて Ki67 陽性細胞 (矢印) は出現する。

clathrin inhibitor 30 μM 投与にて Ki67 陽性細胞の出現は抑制される。

#### 5-1-2. 低酸素下における FITC-albumin の取り込みと PASM の増殖

前述の 3% Alb を FITC 標識アルブミン (FITC-Alb) に変更して同様の実験を行い、細胞外タンパク質の PASM 内への取り込みを検証した。Normoxia ITS+3%FITC-Alb 群及び Hypoxia ITS+3%FITC-Alb 群における FITC-Alb の取り込みを plate reader を用いて評価した (図 4)。Hypoxia ITS+3%FITC-Alb 群では Normoxia ITS+3%FITC-Alb 群に比べて有意に取り込みが増大した ( $1.0 \pm 0.4$  versus  $2.3 \pm 0.2$  RFU/mg protein)。Hypoxia ITS+3%FITC-Alb+clathrin inhibitor 群 ( $1.1 \pm 0.2$

RFU/mg protein) では Hypoxia ITS+3%FITC-Alb 群に比べて FITC-Alb の取り込みは有意に減弱した。

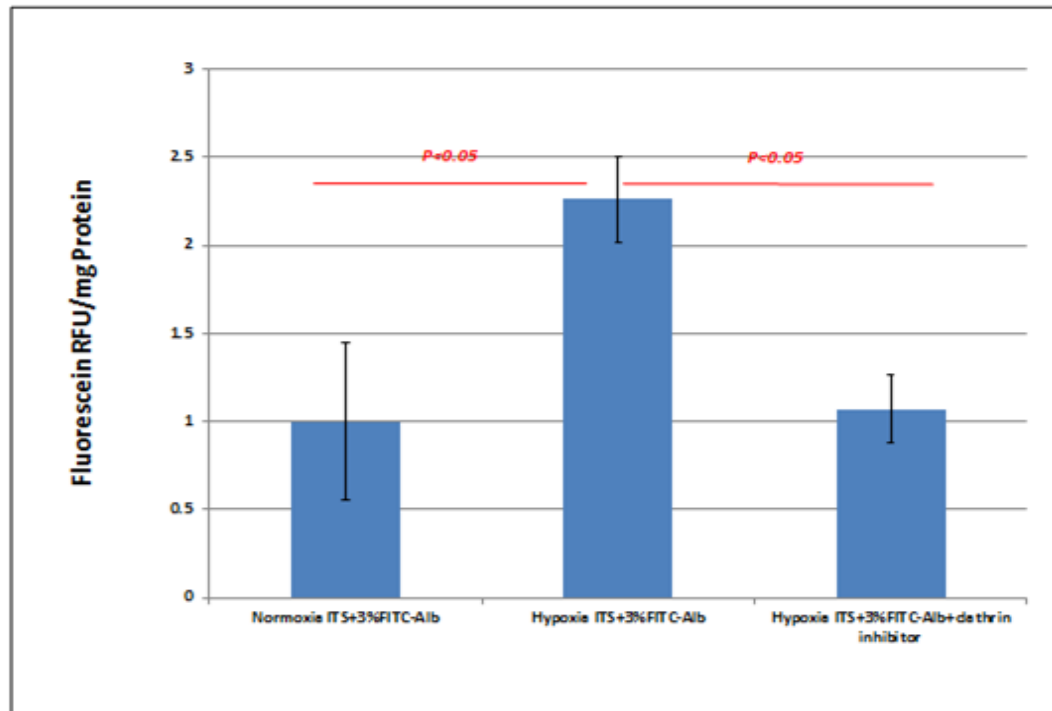


図 4. PASMC の FITC-albumin の取り込み

Hypoxia ITS+3%FITC-Alb 群では Normoxia ITS+3%FITC-Alb 群に比べて有意に取り込みが増大した ( $1.0 \pm 0.4$  versus  $2.3 \pm 0.2$  RFU/mg protein)。Hypoxia ITS+3%FITC-Alb+clathrin inhibitor 群 ( $1.1 \pm 0.2$  RFU/mg protein) では Hypoxia ITS+3%FITC-Alb 群に比べて FITC-Alb の取り込みは有意に減弱した。

n=8 well/群

### 5-1-3. PASMC 内に取り込まれた FITC-Alb の小胞体への集積

endocytosis によって細胞内に取り込まれた FITC-Alb (緑色) が小胞体内外のごとくに集積するのかを検証した。

小胞体の I 型膜タンパク質の一つである Calnexin (赤色) を小胞体のマーカーとして用いた。細胞内に取り込まれた FITC-Alb は Hypoxia+ITS+3%FITC-Alb では



主に小胞体内に集積するが、Normoxia ITS+3%FITC-Alb 及び Hypoxia ITS+3%FITC-Alb+clathrin inhibitor においては小胞体への集積を認めなかった(図5)。

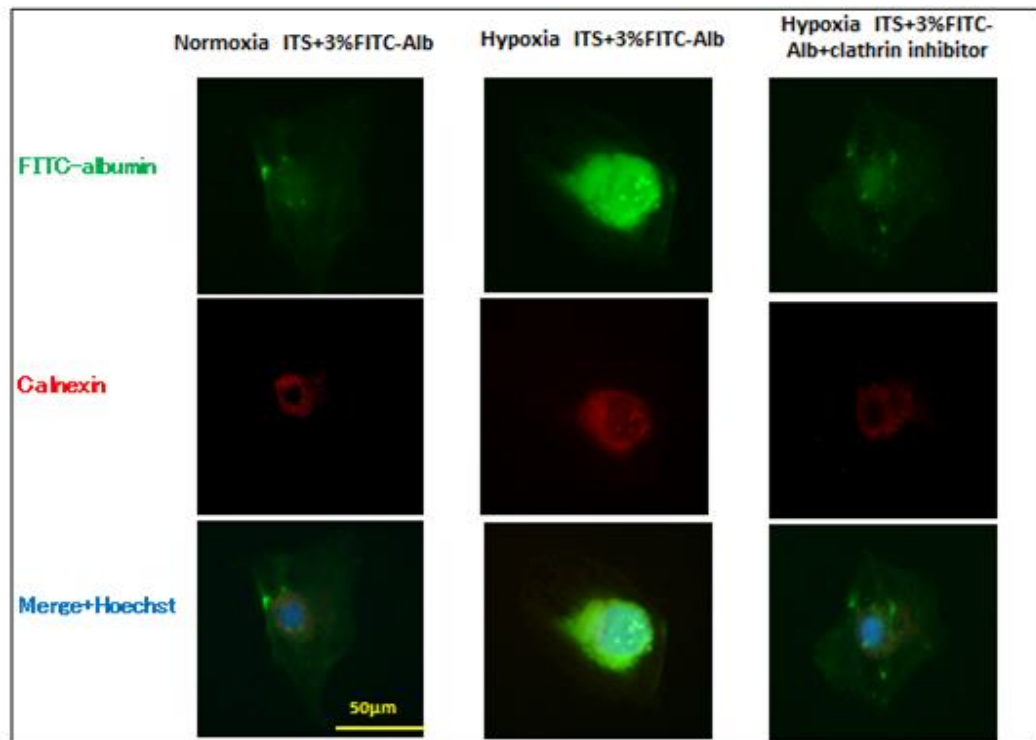


図5. 細胞内に取り込まれた FITC-albumin の小胞体への集積

小胞体の膜上に存在する Calnexin(赤)を小胞体のマーカーとして用いて、FITC-albumin の小胞体への集積を評価した。

Hypoxia ITS+3%FITC-Alb では小胞体への集積を認めたが、Normoxia ITS+3%FITC-Alb 及び Hypoxia ITS+3%FITC-Alb+clathrin inhibitor では小胞体への集積を認めなかった。

#### 5-1-4. 細胞外アルブミンが無いと小胞体ストレスは抑制される

各条件における PERK/eIF2 $\alpha$  シグナルの下流にある ATF4、CHOP の発現、及び UPR target gene で細胞増殖を引き起こす遺伝子として知られている c-MYC の発現を qRT-PCR で評価した(図6)。Normoxia ITS 群と Hypoxia+ITS 群を比較すると、ATF4/CHOP/c-MYC の発現に有意は有意に減弱している。しかしながら、Hypoxia+

ITS+3% Alb 群では、どちらの群と比較しても、ATF 4 /CHOP/c-MYC の増大を有意に認めた。また Hypoxia+ITS+3% Alb 群と Hypoxia+ITS+3% Alb+clathrin inhibitor 群を比較すると、clathrin inhibitor は ATF 4 /CHOP/c-MYC の発現を有意に減弱させた。

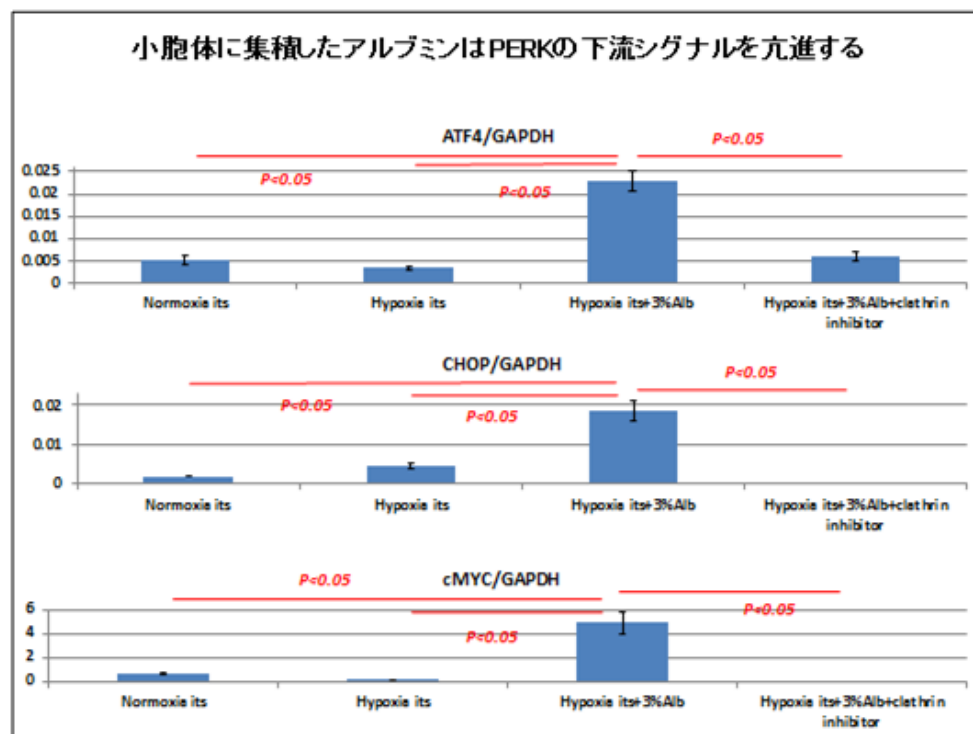


図 6. In Vitro における UPR target genes の発現 (n=3/群)

Hypoxia ITS 群では Normoxia 群に比べて、ATF4/CHOP/c-MYC の発現は変わらなかった。Hypoxia ITS+3%Alb 群では Normoxia 群及び Hypoxia ITS 群に比べて、ATF4/CHOP/c-MYC の発現は有意に増大していた。Hypoxia ITS+3%Alb+clathrin inhibitor 群では Hypoxia ITS+3%Alb 群に比べて、ATF4/CHOP/c-MYC の発現は有意に低下していた。

## 5-2. PERK シグナルと PASMC の増殖

次に PERK シグナルが PASMC の増殖を誘導する機序に関して検討した。以

降では培地として 10%FBS-DMEM を使用した。

### 5-2-1. 低酸素負荷によるストレスグラニュール(SGs)の形成

Normoxia 群では SGs は殆ど認められないが、Hypoxia 群では SGs 形成を認めた (図 7、8)。次に SGs の分解を抑制する Harmine (23) を  $10\ \mu\text{M}$  投与したところ、Hypoxia 群に比べて %SGs positive cell が有意に増加した ( $42.1 \pm 5.2$  versus  $23.8 \pm 2.8\%$ ) (図 8)。逆に、PERK inhibitor (PERKI) ( $9.2 \pm 2.8\%$ ) を投与したところ、SGs の発現は有意に低下した。

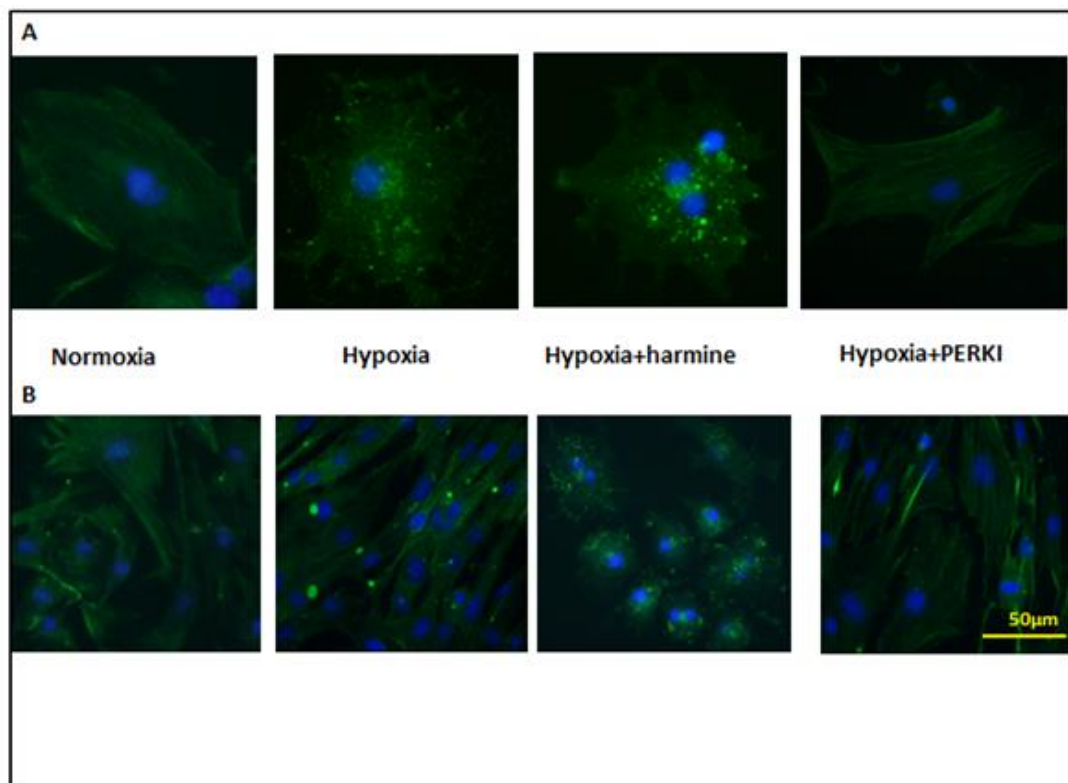


図 7. PASMC における stress granules (SGs) の発現

SGs のマーカーである、RNA binding protein の 1 つである G3BP1 (緑) で蛍光染色を行った。Normoxia では細胞質基質に一様に分布している G3BP1 が、Hypoxia 及び Hypoxia+harmine では粒状の集積 (SGs) を認めた。Hypoxia+PERKI では SGs の消失を認めた。

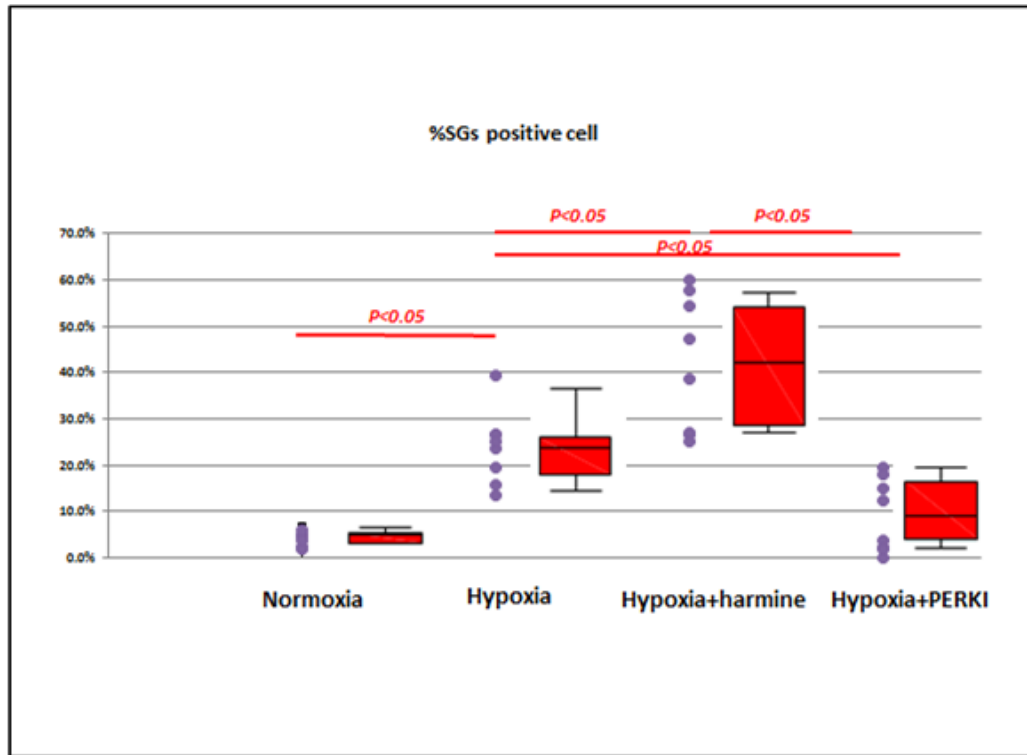


図 8. SGs 陽性細胞率

図 7B の通り、1 視野あたりの SGs 陽性細胞率を評価した (n=5 視野/群)。

Hypoxia では、Normoxia に比べて SGs の発現が有意に増加している。

Hypoxia+harmine では、Hypoxia に比べて発現が有意に増加している。

Hypoxia+PERKI では、Hypoxia に比べて発現が有意に低下している。

#### 5-2-2. Harmine による PASMC 増殖の亢進

膵臓  $\beta$  細胞において Harmine は細胞増殖を亢進する (36)。低酸素下の PASMC に

Harmine を投与することによって細胞増殖が亢進するか否かを検討した。

Hypoxia+Harmine 群では Hypoxia 群に比べて、細胞増殖のマーカーである Ki67

陽性細胞の割合が有意に増加した ( $36.4 \pm 2.4$  versus  $23.7 \pm 2.0$  %) (図 9)。また

Hypoxia+PERKI 群では Hypoxia 群に比べて、細胞増殖のマーカーである Ki67 陽

性細胞の割合が有意に減少した ( $14.1 \pm 1.8$  versus  $23.7 \pm 2.0$  %)。

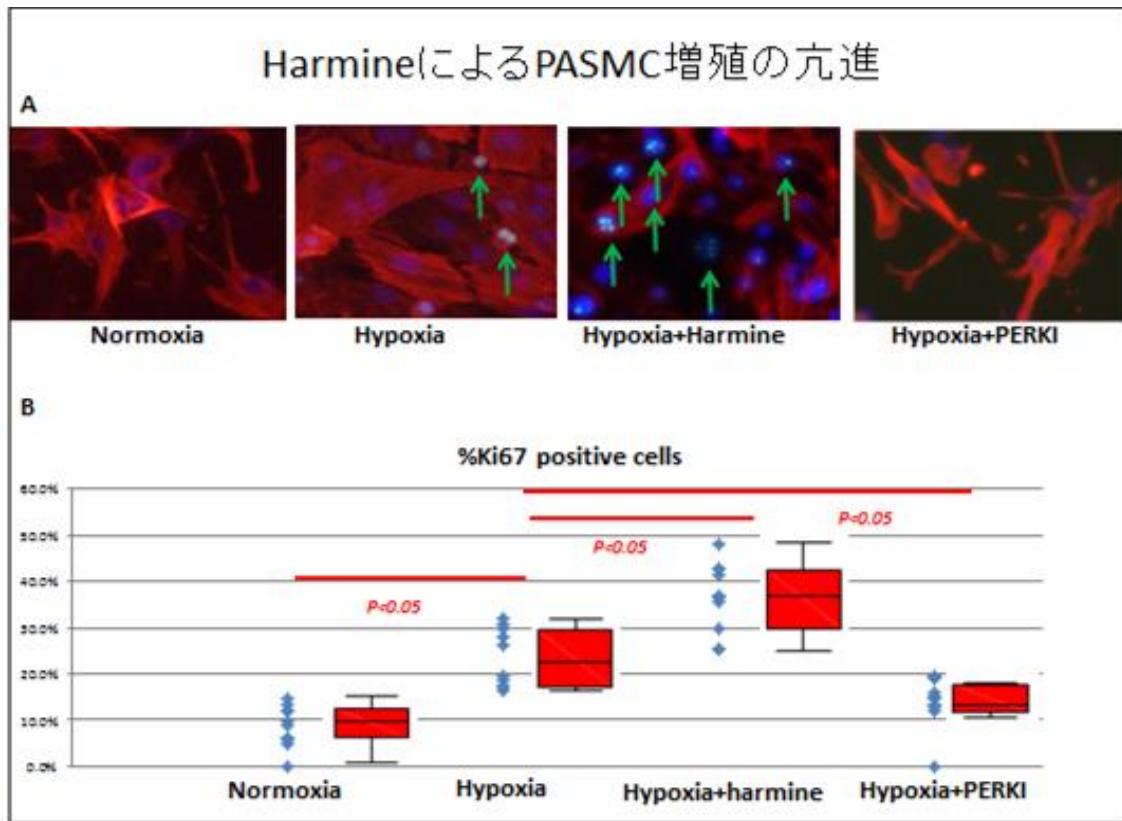


図 9. Harimine による PASC 増殖の亢進

以下では10%FBS培地を用いて、1視野あたりのKi67陽性細胞(矢印)の発現率を調べた(n=10視野/群)。

Hypoxia では、Normoxia に比べて Ki67 陽性細胞の発現が有意に増加している。

Hypoxia+harimine では、Hypoxia に比べて発現が有意に増加している。

Hypoxia+PERKI では、Hypoxia に比べて発現が有意に低下している。

### 5-2-3. SGs と UPR

各条件における PERK シグナルの下流にある ATF4 の発現、c-MYC の発現を qRT-PCR

で評価した(図 10)。Hypoxia+Harimine 群では Hypoxia 群に比べて、c-MYC の発現

が有意に亢進したが、ATF4 の発現に有意差を認めなかった。これらの結果から

Harimine による SGs の形成は c-MYC の発現亢進に関与しているが、ATF4 の発現

には関与していないことが示唆される。

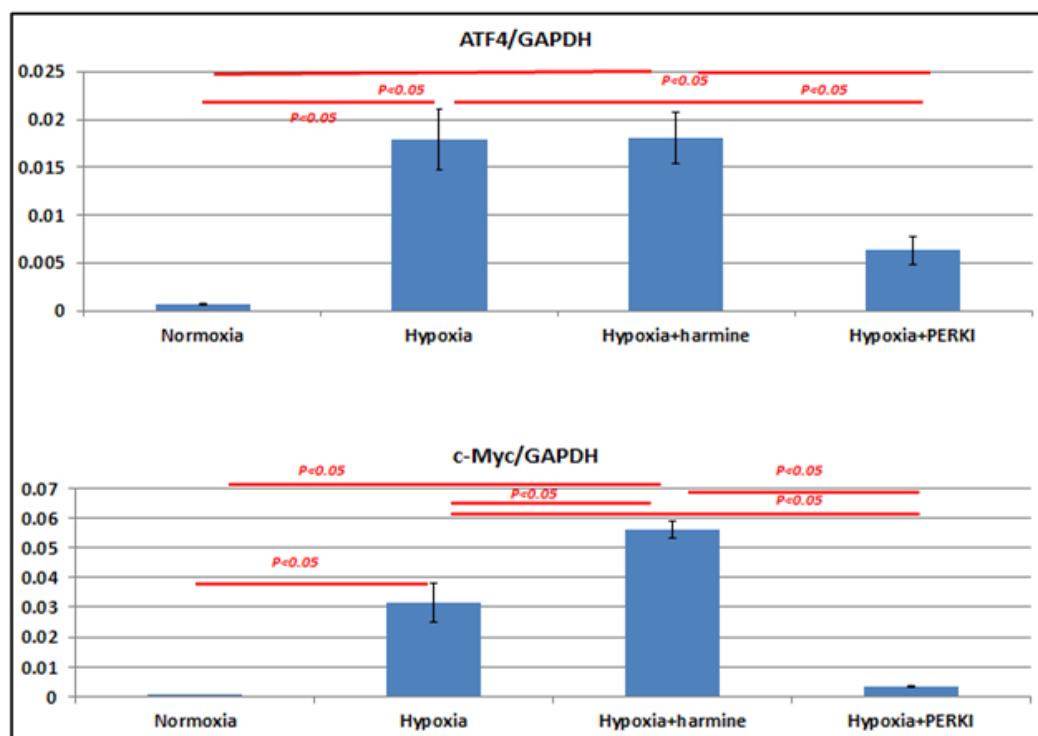


図 10. FBS 培地における UPR target genes の発現 (n=3/群)

Hypoxia+harmine では、Hypoxia に比べて、ATF4 の発現の亢進を認めなかったが、c-MYC の発現の亢進を認めた。

### 5-3. マウス PAH モデルにおける PERK inhibitor 及び Harmine の作用

Harmine 及び PERK inhibitor が PAH の病態に In Vivo でどのように作用するか確かめるために、normoxia, Hypoxia+SU5416, Hypoxia+harmine hydrochloride, Hypoxia+SU5416+PERKI の各群を比較検討した。

#### 5-3-1. PERK inhibitor は右室圧を軽減して右心不全を改善する

Hypoxia+SU5416+PERKI 群は Hypoxia+SU5416 群に比べて、右室収縮期圧(right ventricle systolic pressure, RVSP)の低下( $66.9 \pm 4.7$  versus  $47.3 \pm 3.2$  mmHg)、及び平均右室圧(mean right ventricle pressure, mean RVP)の低下( $28.5 \pm 2.3$

versus  $19.3 \pm 1.7$  mmHg) の低下を有意 ( $p < 0.05$ ) に認めた (図 11)。

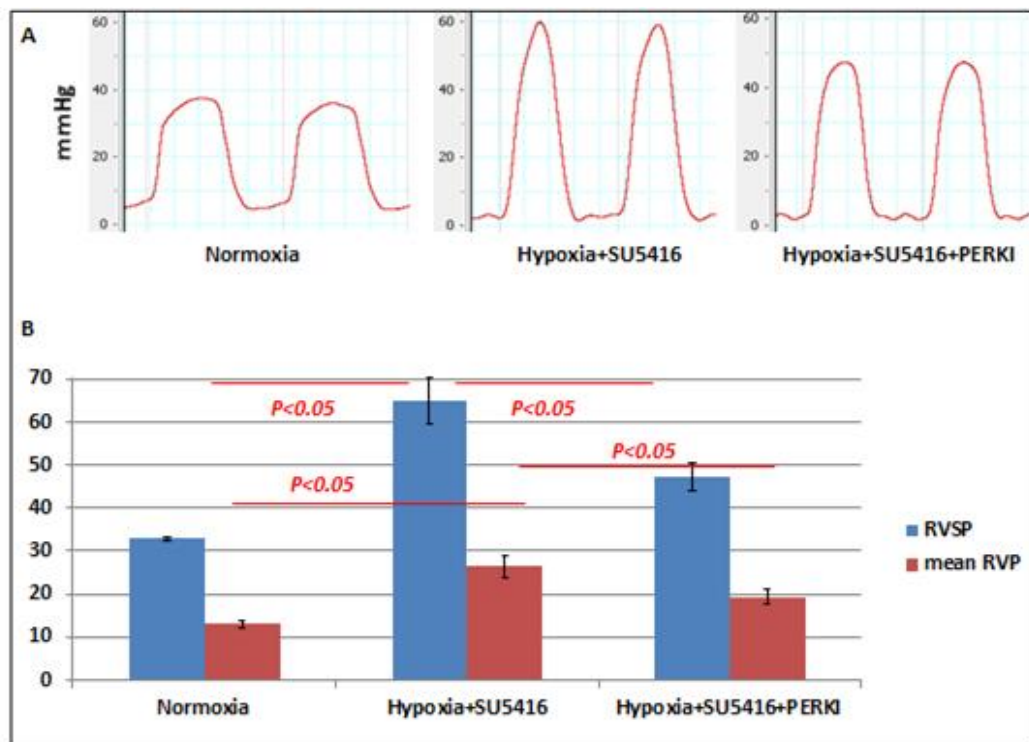


図 11. カテーテルによる右室内圧の測定 ( $n=4 \sim 7$ /群)

右室収縮期圧 (RVSP) 及び右室平均圧 (mean RVP) を測定した。

Hypoxia+SU5416 (VEGF inhibitor) 群では、Normoxia 群に比べて RVSP 及び mean RVP 共に有意に上昇していた。

Hypoxia+SU5416+PERKI 群では、Hypoxia+SU5416 群に比べて RVSP 及び mean RVP 共に有意に低下していた。

経胸壁エコーにおいて Hypoxia+SU5416+PERKI 群は Hypoxia+SU5416 群に比べて、右室面積変化率 (right ventricle fractional area change, %RVFAC) の改善 ( $48.7 \pm 2.6$  versus  $34.6 \pm 2.2$  %) (図 12、13)、収縮期三尖弁輪部移動距離 (tricuspid annular plane systolic excursion, TAPSE) の改善 ( $0.95 \pm 0.04$  versus  $0.78 \pm 0.03$  mm) (図 14、16) を有意 ( $p < 0.05$ ) に認めた。肺動脈加速時間 (pulmonary artery acceleration time, PAAT) に関しては有意差を認めなかった ( $16.8 \pm 1.5$



versus  $10.0 \pm 1.4$  ms) (図 15、16)。

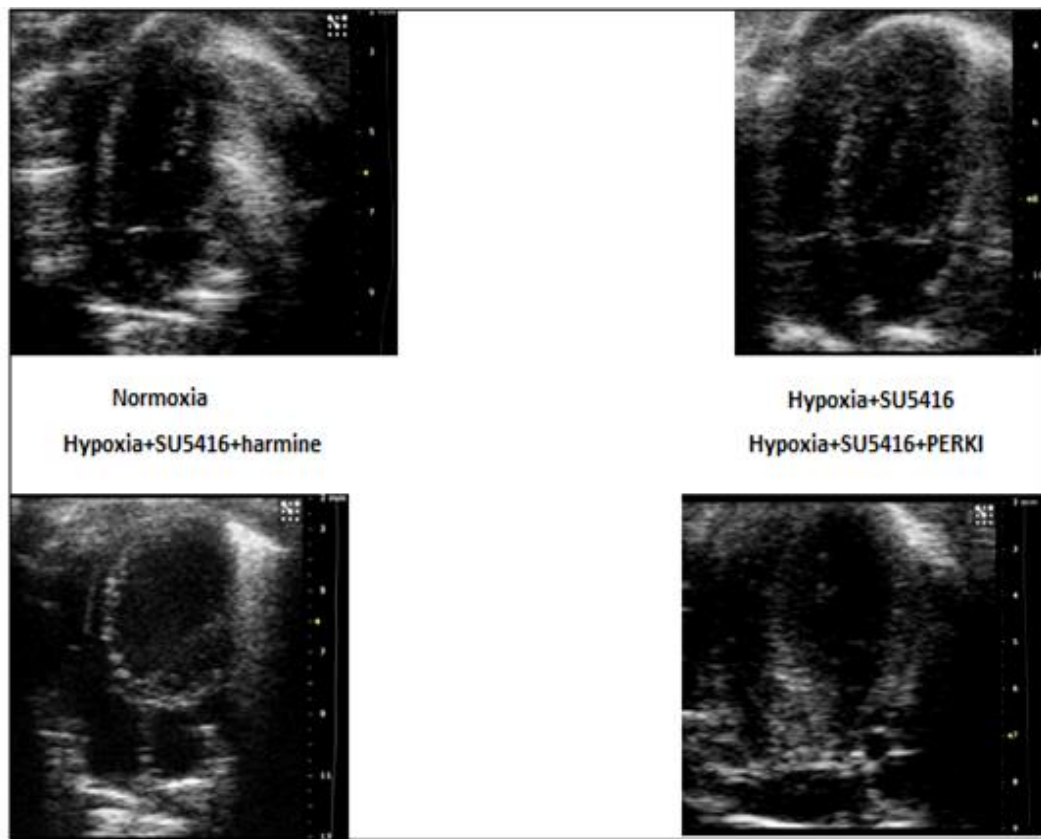


図 12. 経胸壁エコーによる右心機能評価(2D-echo)

Hypoxia+SU5416 では Normoxia に比べて、右室及び右房の拡大、右室面積変化率(right ventricle fractional area change, %RVFAC)の低下を認めた。

Hypoxia+SU5416+harmine は Hypoxia+SU5416 に比べて%RVFAC の低下を認めた。

Hypoxia+SU5416+PERKI では Hypoxia+SU5416 に比べて、右室及び右房の縮小、%RVFAC の改善を認めた。



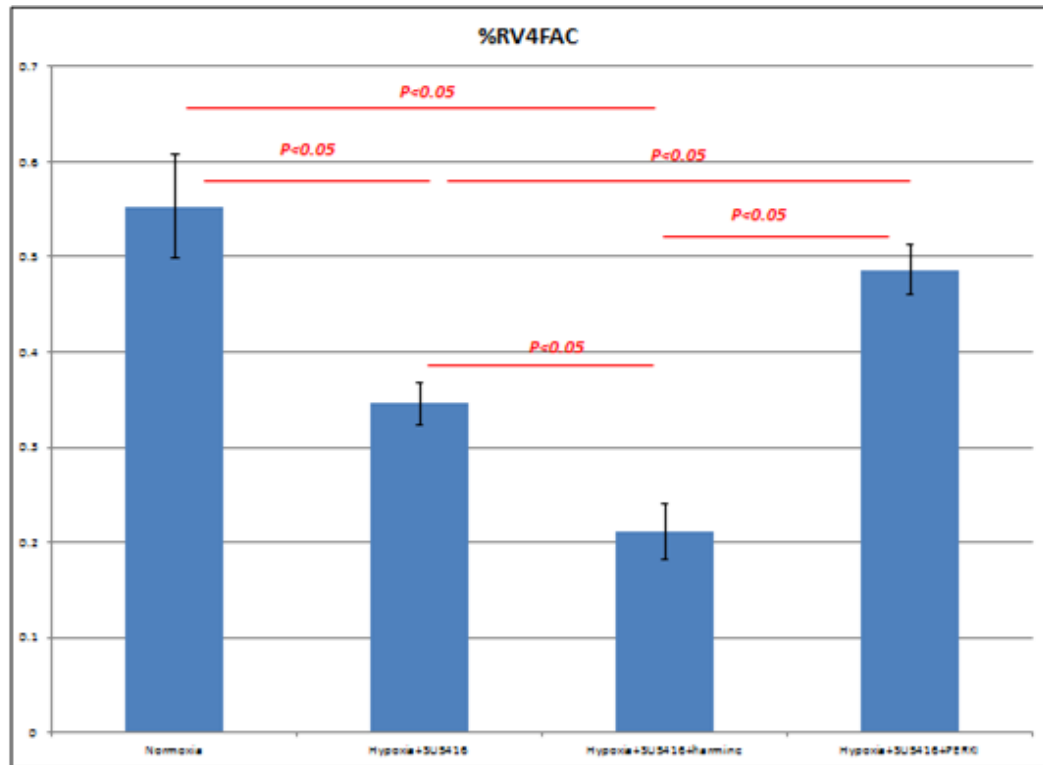


図 13. 右心機能評価 (%RVFAC n=9-10/群)

Hypoxia+SU5416 群は Normoxia 群に比べて%RVFAC の有意な低下を認めた。

Hypoxia+SU5416+harmine 群は Hypoxia+SU5416 群に比べて%RVFAC の有意な低下を認めた。

Hypoxia+SU5416+PERKI 群は Hypoxia+SU5416 群に比べて%RVFAC の有意な改善を認めた。

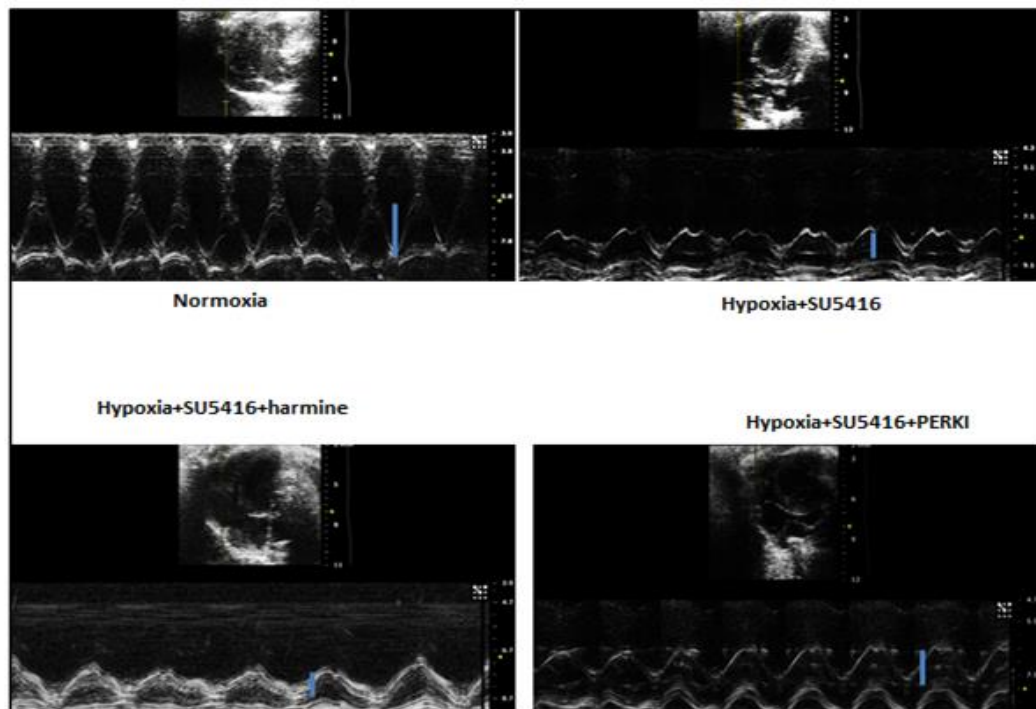


図 14. 収縮期三尖弁輪部移動距離 (tricuspid annular plane systolic excursion, TAPSE) (M-mode)

Hypoxia+SU5416 では Normoxia に比べて、TAPSE の減少を認めた。

Hypoxia+SU5416+harmine は Hypoxia+SU5416 に比べて TAPSE の減少を認めた。

Hypoxia+SU5416+PERKI では Hypoxia+SU5416 に比べて、TAPSE の改善を認めた。

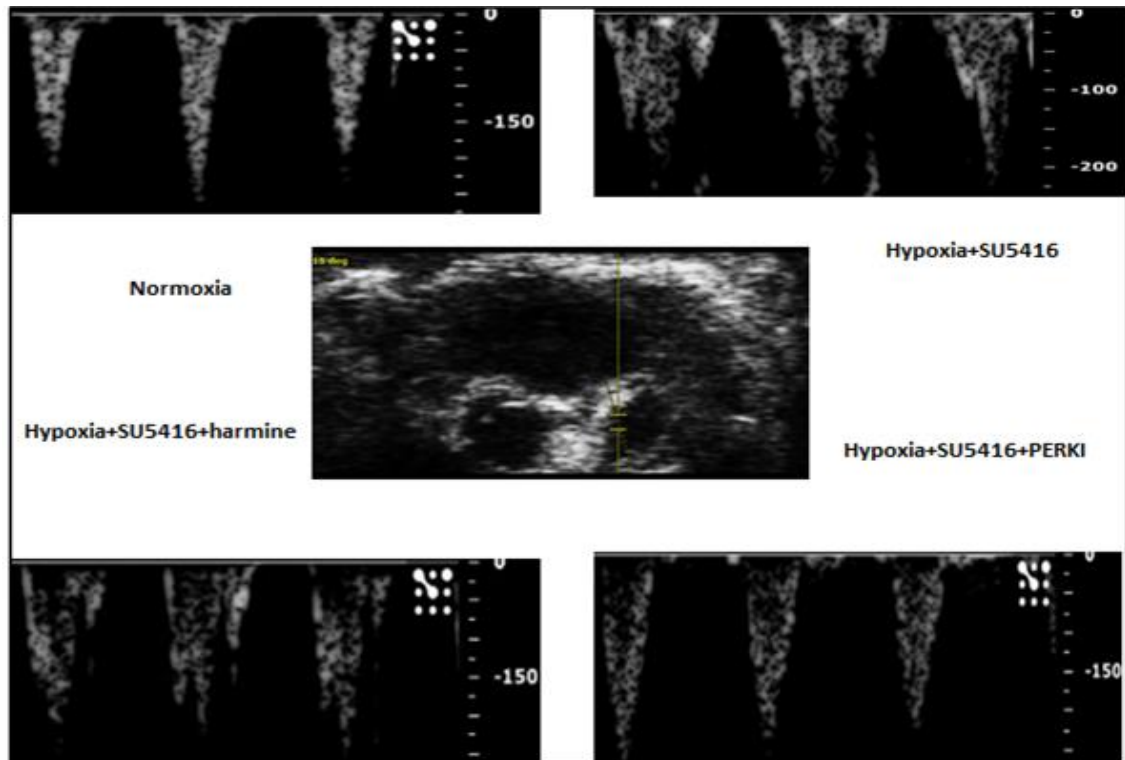


図 15. 肺動脈弁流出路波形

Normoxia では一峰性の波形であったが、Hypoxia+SU5416 及び Hypoxia+SU5416+harmine では二峰性となった。

Hypoxia+SU5416+PERKI では一峰性であった。

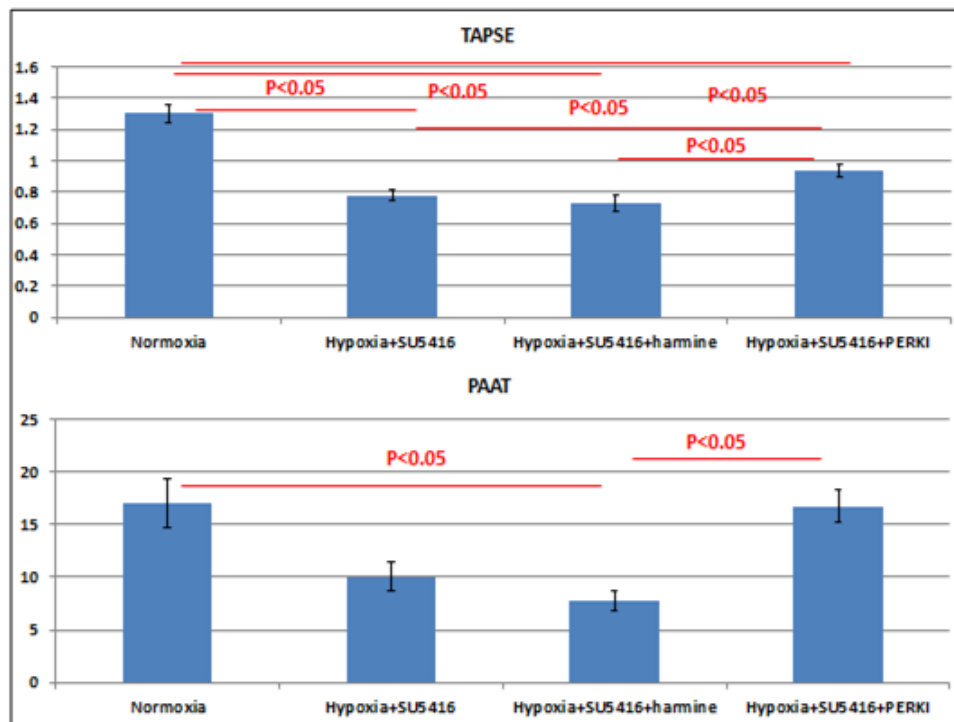


図 16. 右心機能評価 (TAPSE n=9-11/群、PAAT n=7-8/群)

Hypoxia+SU5416 群は Normoxia 群に比べて TAPSE 及び PAAT の有意な低下を認めた。Hypoxia+SU5416+harminine 群は Hypoxia+SU5416 群に比べて TAPSE 及び PAAT の有意な低下を認めた。Hypoxia+SU5416+PERKI 群は Hypoxia+SU5416 群に比べて TAPSE 及び PAAT の有意な改善を認めた。

また右室肥大に関しても、Hypoxia+SU5416+PERKI 群は Hypoxia+SU5416 群に比べて、Fulton index (RV/LV+Seprum) の改善 ( $0.37 \pm 0.04$  versus  $0.21 \pm 0.02$ ) (図 17)、を有意 ( $p < 0.05$ ) に認めた。右室心筋細胞の断面積を WGA 染色で評価したところ、Hypoxia+SU5416+PERKI 群は Hypoxia+SU5416 群に比べて有意に改善を認めた ( $179 \pm 5$  versus  $137 \pm 4$  %) (図 18)。

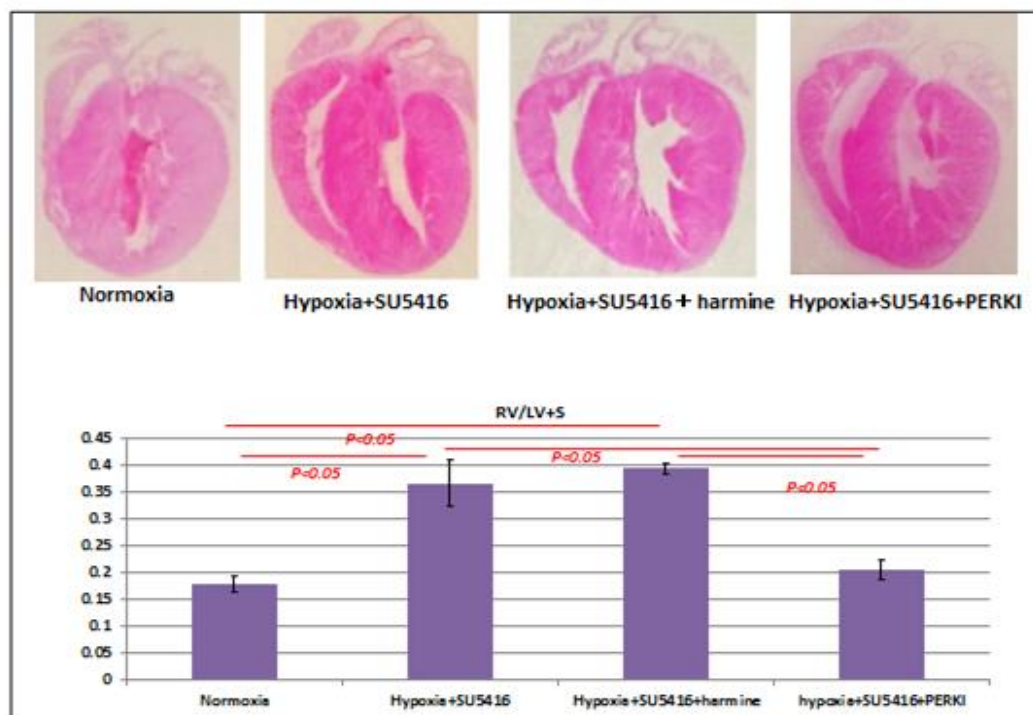


図 17. 右室心筋肥大 (n=7~10/群)

Hypoxia+SU5416 群及び Hypoxia+SU5416+harmine 群は Normoxia 群に比べて Fulton index (RV/LV+Seprum) の有意な増加を認めた。

Hypoxia+SU5416+PERKI 群は Hypoxia+SU5416 群に比べて Fulton index の有意な改善を認めた。

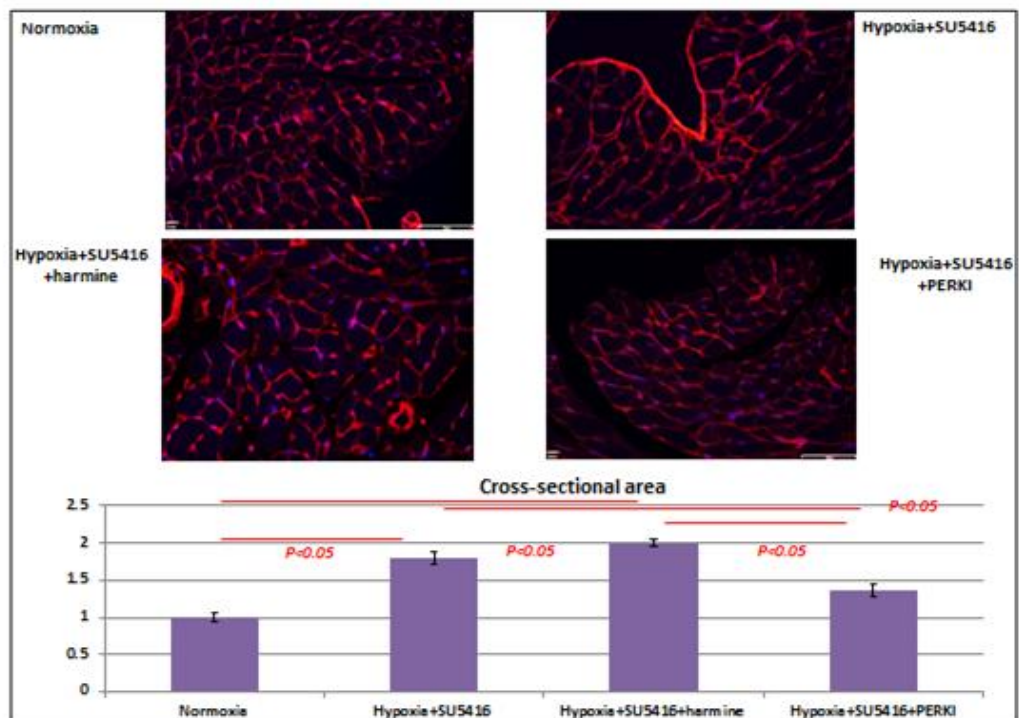


図 18. 右室心筋細胞肥大 (n=15/群)

Hypoxia+SU5416 群及び Hypoxia+SU5416+harmine 群は Normoxia 群に比べて右室心筋細胞断面積の有意な増加を認めた。

Hypoxia+SU5416+PERKI 群は Hypoxia+SU5416 群に比べて右室心筋細胞肥大の有意な改善を認めた。

### 5-3-2. Harmine HCl は右心不全を増悪させる

右心不全の指標である%RVFAC に関して Hypoxia+SU5416+Harmine HCl 群では Hypoxia+SU5416 群に比べて有意な増悪を認めた (図 12、13)。右室肥大に関しては両群で有意差を認めなかった (図 17)。また右室心筋細胞断面積に関しても Hypoxia+SU5416+Harmine HCl 群で有意な肥大を認めなかった (図 18)。

### 5-3-3. PERK inhibitor は肺血管リモデリングを改善する

Hypoxia+SU5416+PERKI 群は Hypoxia+SU5416 群に比べて、肺動脈(直径 30-100  $\mu$

m)の中膜肥大(medial wall thickening, MWT) ( $26.9 \pm 1.9$  versus  $34.4 \pm 1.1$  %) 及び外膜の線維化を改善する(図 19)が、Harmine は増悪させる(MWT  $41.8 \pm 1.7$  %)。また肺動脈中膜を構成する PASM の Ki67 陽性細胞率も、Hypoxia+SU5416+PERKI 群は Hypoxia+SU5416 群に比べて有意な低下を認めた( $7.2 \pm 0.4$  versus  $11.2 \pm 0.8$  %)が、Harmine HCl では有意な増加を認めた( $16.0 \pm 1.4$  %) (図 20)。

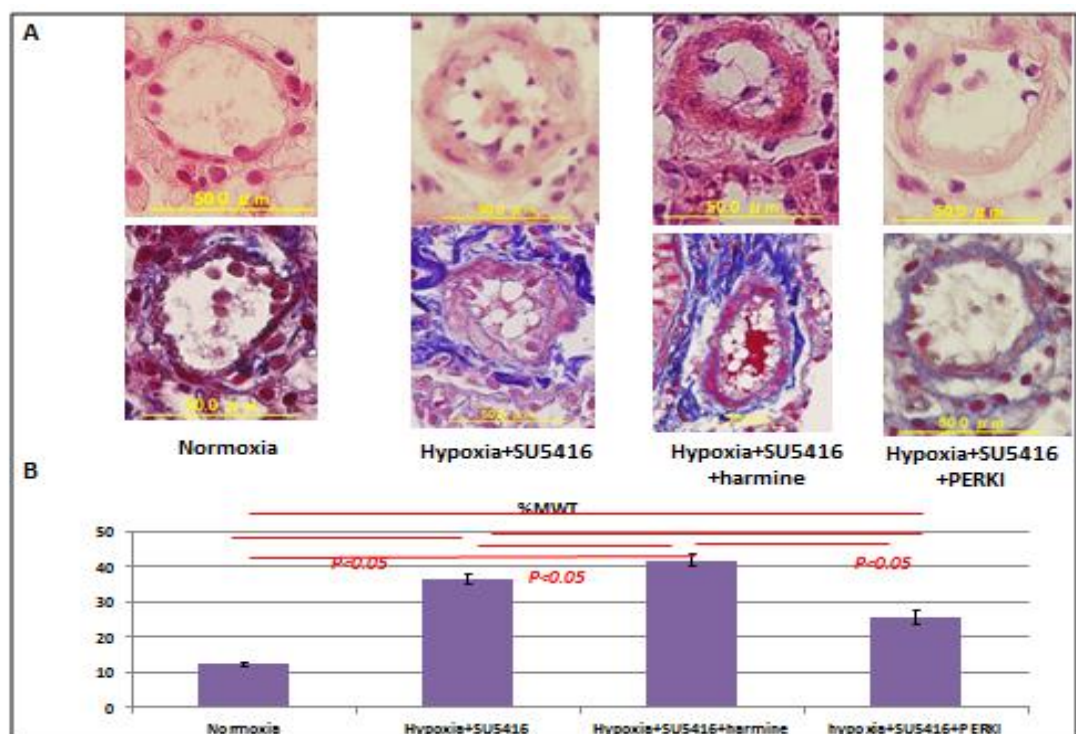


図 19. 肺血管リモデリングにおける Harmine 及び PERK inhibitor の作用

Hypoxia+SU5416 群では Normoxia 群に比べて、肺動脈(直径 30-100  $\mu$ m, n=5 血管/匹、5 匹/群)の中膜肥大(medial wall thickening, MWT)及び外膜の線維化を認めた。

Hypoxia+SU5416+harmine 群は Hypoxia+SU5416 群に比べて%MWT の増加を認めた。

Hypoxia+SU5416+PERKI 群では Hypoxia+SU5416 群に比べて、%MWT の低下及び外膜線維化の改善を認めた。



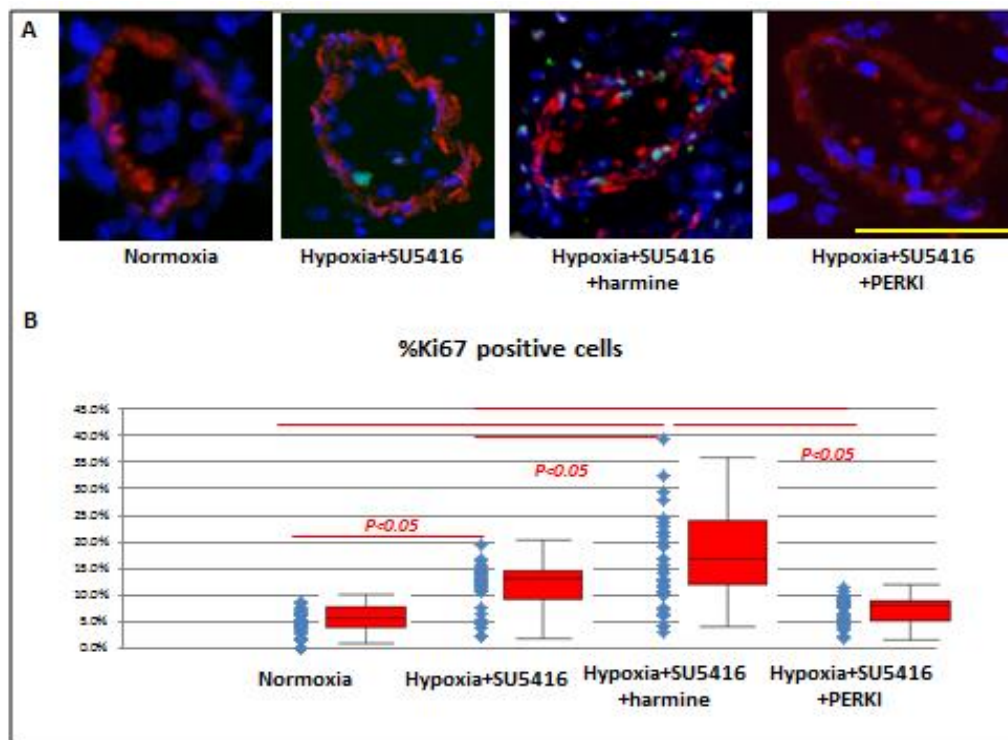


図 20. 肺動脈における Ki67 の発現

肺動脈中膜を構成する PASM 細胞を  $\alpha$ -SMA (赤) で染色し、Ki67 (緑) で蛍光染色を行った (n=7 血管/匹、5 匹/群)。

Hypoxia+SU5416 群では Normoxia 群に比べて、Ki67 がより高率に発現していた。

Hypoxia+SU5416+harmine 群は Hypoxia+SU5416 群に比べて Ki67 がより高率に発現していた。

Hypoxia+SU5416+PERKI 群では Hypoxia+SU5416 群に比べて、Ki67 の発現が有意に低下していた。

#### 5-3-4. PERK inhibitor は UPR target genes の発現を抑える

In Vivo における各群における PERK 及び eIF2 $\alpha$  のリン酸化をウェスタンブロッ

ティングで評価した (図 21)。PERK inhibitor によって、PERK 及び eIF2 $\alpha$  のリン

酸化が有意に抑えられていることを確認したが、Harmin HCl では変化を認めな

かった。



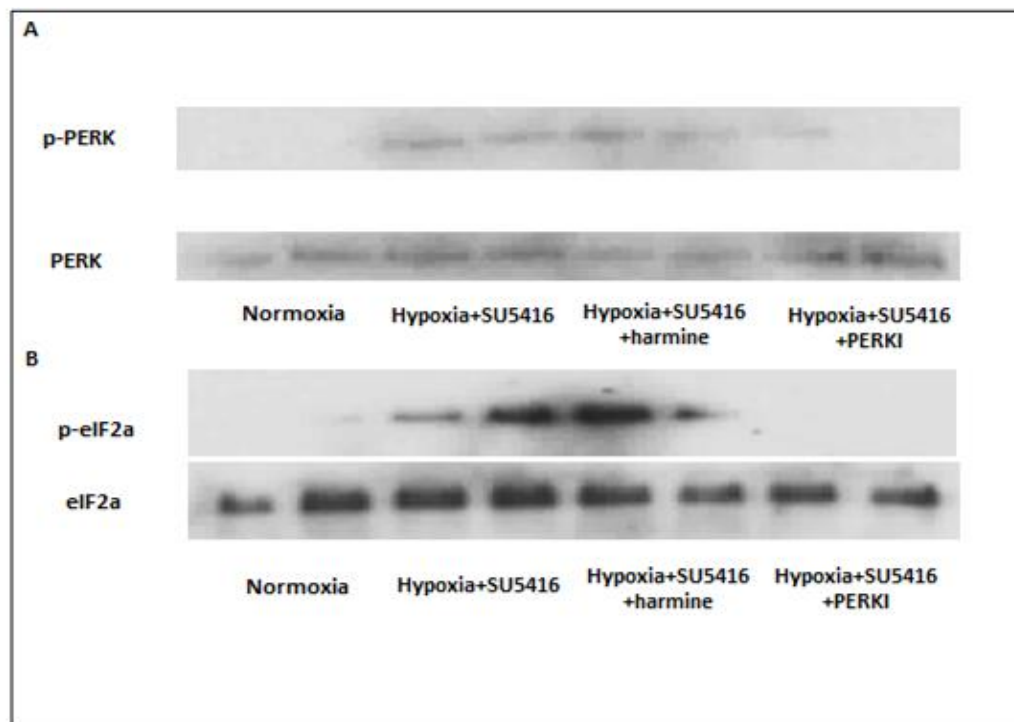


図 21. PERK 及び eIF2 $\alpha$  のリン酸化に及ぼす PERK inhibitor 及び harmine の作用  
Hypoxia+SU5416 群及び Hypoxia+SU5416+harmine 群では Normoxia 群に比べて、PERK 及び eIF2 $\alpha$  のリン酸化が生じていた。  
Hypoxia+SU5416+PERKI 群では Hypoxia+SU5416 群に比べて、PERK 及び eIF2 $\alpha$  のリン酸化が消失していた。

PERK シグナルの下流にある ATF4、CHOP 及び UPR target gene の一つであり、細胞増殖を促進する c-MYC(37)の発現を qRT-PCR で評価した(図 22)。これら共に PERK inhibitor によって有意に低下した。Harmine HCl では ATF4、CHOP の発現の増加を認めなかったが、c-MYC の発現の増加を有意に認めた。

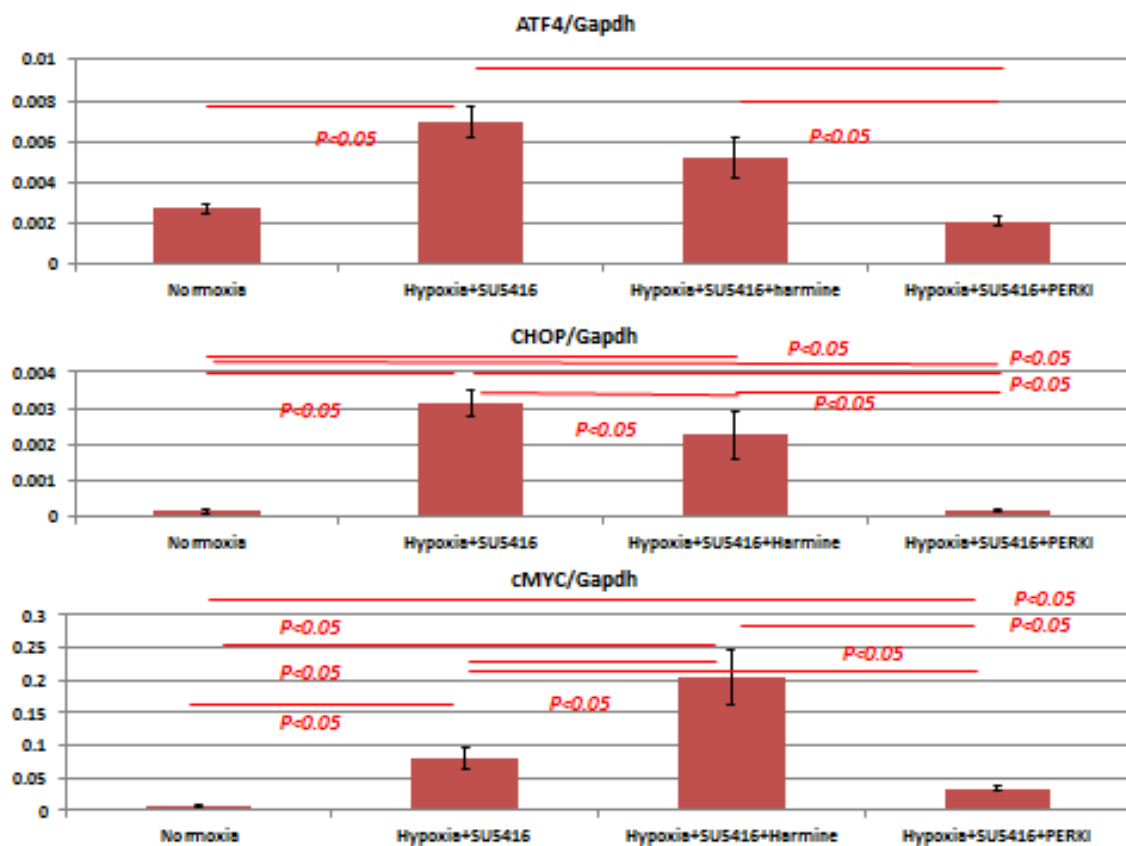


図 22. 肺動脈(In Vivo)における UPR target genes の発現 (n=5/群)

Hypoxia+SU5416 群では Normoxia 群に比べて、ATF4/CHOP/cMYC の発現が亢進していた。

Hypoxia+SU5416+harmine 群は Hypoxia+SU5416 群に比べて cMYC の発現が亢進していたが、ATF4/CHOP の発現に有意差を認めなかった。

Hypoxia+SU5416+PERKI 群では Hypoxia+SU5416 群に比べて、ATF4/CHOP/cMYC の発現が低下していた。

## 6. 考察

### 6-1. 本研究を通じて分かった事実

本研究では、低酸素ストレスによって肺動脈リモデリングがおきるメカニズムを肺動脈平滑筋増殖と小胞体ストレス応答反応に注目することによって明らかにした(図 23)。具体的には (Ⅰ) 低酸素条件下では肺動脈平滑筋が細胞外タンパクをエンドサイトーシスによって細胞内に取り込むこと、細胞内に取り込まれたタンパクが細胞内タンパク処理器官である小胞体に蓄積して小胞体ストレスが惹起されること、(Ⅱ)小胞体ストレス応答によって PERK シグナリング経路が活性化することで、ストレス顆粒 (Stress granules : SGs) と呼ばれる細胞内凝集体が形成され、この SGs が c-Myc 等の増殖シグナルを亢進させて細胞増殖を誘導すること、を培養平滑筋細胞を用いた *in vivo* の実験から明らかにした。さらに、慢性の低酸素暴露 (+ VEGF 受容体拮抗薬) で誘導されるマウス PAH モデルを用いて、薬理的な PERK 阻害によって PAH の病態が改善することを示した。すなわち、心カテーテル、心エコー検査による生理学的な検討によって PERK 阻害薬が収縮期および平均右室圧を有意に低下させ、右心機能を改善することを示し、病理組織学的な検討から、PERK 阻害薬が肺血管リモデリング (中膜の肥大、外膜の線維化) および、右心室細胞肥大を抑制することを示した。

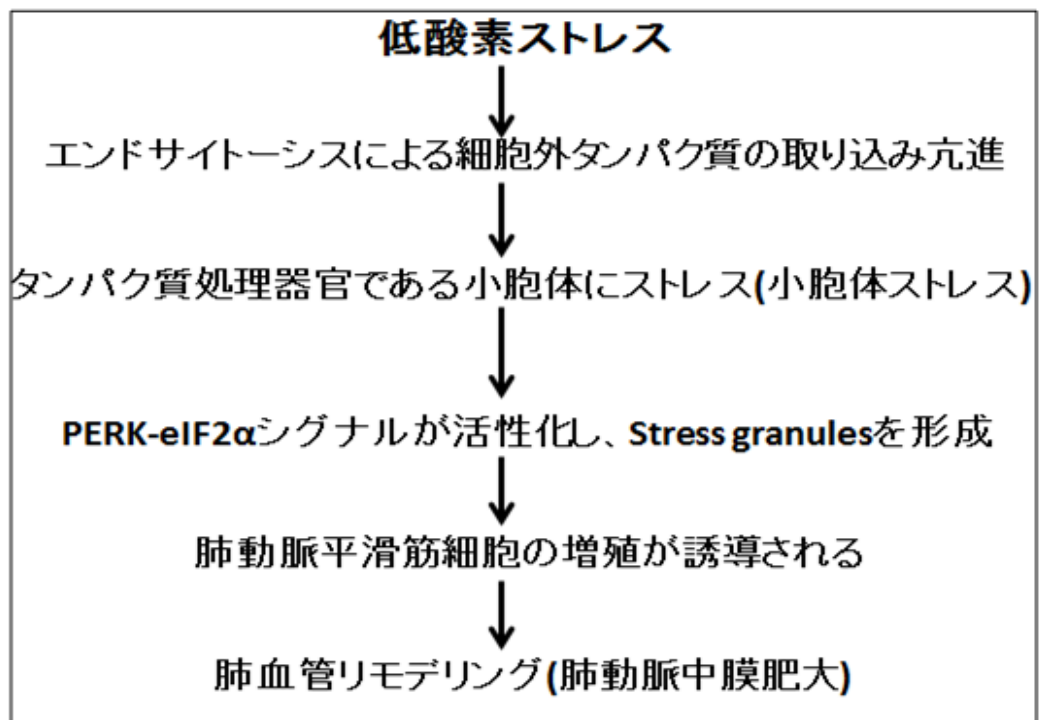


図 23. まとめ

肺高血圧において肺動脈平滑筋に小胞体ストレスがかかる機序として、細胞外タンパク質のエンドサイトーシスが関与していた。

小胞体ストレスによって肺動脈平滑筋が増殖する機序として、stress granules を介した c-Myc などの増殖シグナルの亢進が考えられた。

また、このマウス PAH モデルに SGs の分解を阻害する Harmine HCl を投与すると、慢性低酸素暴露（+ VEGF 受容体拮抗薬）による肺血管リモデリングが増悪することを示し、in vivo 病態モデルでも in vitro と同様に SGs 形成が鍵となる可能性を示した。

PERK 阻害薬は現在臨床で使われている既存の血管拡張薬とは、全く異なる作用機序(PASMC の細胞増殖を抑制)を有するため、新たな治療選択肢となる可能性があると考えられる。これまでも動物実験レベルで PAH の病態を改善することが報告された細胞増殖抑制剤(imatinib 等)はあるが、これらは体重減少をはじめ

めとする重篤な副作用のため臨床実用化には至っていない。本研究において PERK 阻害薬は、in vivo マウス実験で4週間連日投与されたが、体重減少等の明らかな副作用は認められなかった(図 24)。この点からも新規治療薬として有望なものであると考えている。

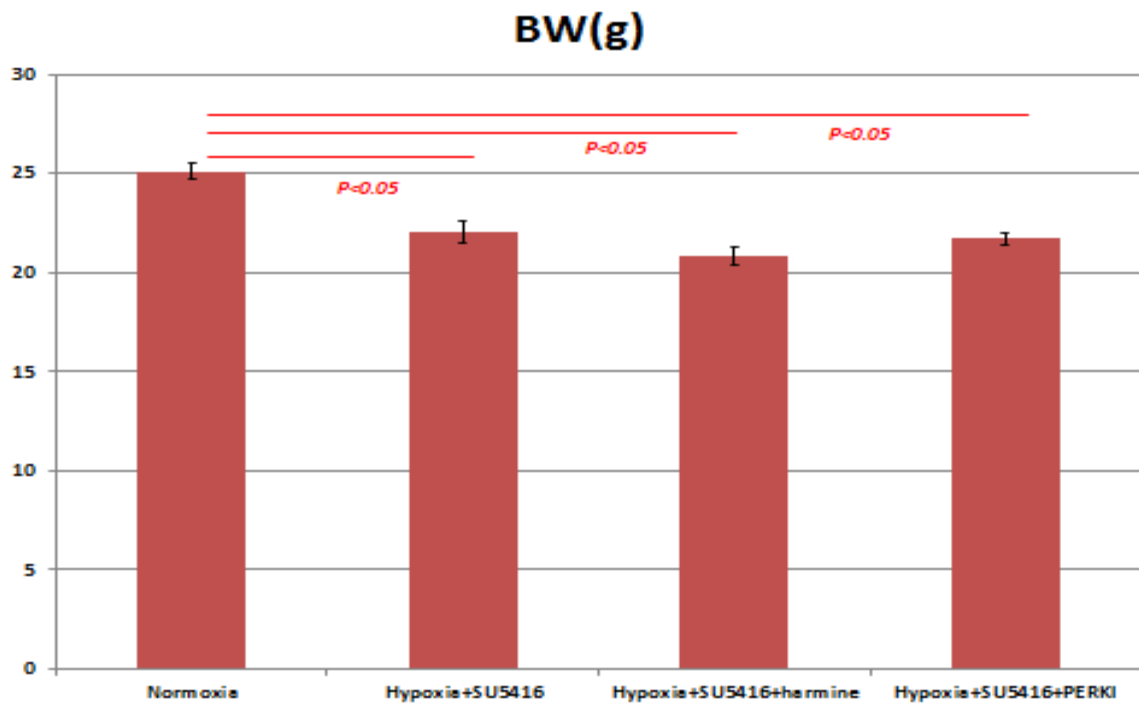


図 24. 各群の体重 (n=7-10/群)

Normoxia 群では実験後の方が実験前に比べて有意 ( $p<0.05$ , one-way ANOVA) に体重増加を認めた。

Hypoxia+SU5416 群では実験後において、有意な体重減少を認めた。

その他の群では有意な体重変化を認めなかった。

## 6-2. 本研究の独自性

本論文では以下の点について独自性を有すると考えられる。

### 6-2-1. PAH において小胞体ストレスが起きる機序を解明した

前述の通り、PAH の病態に小胞体ストレスが関与することが近年報告されたが、その詳細なメカニズムについては不明であった。小胞体ストレスとは折り畳まれていないタンパクが小胞体に蓄積することによって生じる反応であるが、PAH の病態でどのような機序によってタンパクが小胞体に蓄積するのかという点は不明であった。本研究では、培養平滑筋細胞に低酸素下で培養して増殖を誘導するという広く使われている実験系で検討をおこない、細胞外タンパクが endocytosis によって細胞内に取り込まれ、さらに小胞体内に蓄積することで小胞体ストレスが惹起されていることを初めて明らかにした。

6-2-2. 小胞体ストレスセンサーの一つである PERK の活性化が肺動脈平滑筋細胞 (PASMC) の増殖の鍵となることを明らかにした

先行研究(33)ではマウス PAH モデルを用いて、小胞体ストレスを軽減する chemical chaperone の PBA が PAH を改善することを示したが、小胞体ストレスに伴うどのような反応系が PAH の病態に関与しているかは明らかにされていなかった。小胞体ストレス下においては小胞体膜に存在する 3 つの小胞体ストレスセンサー (PERK、IRE1、ATF6) が活性化して、それぞれ下流にシグナルを伝えることが知られている。本研究ではこれら 3 つの経路のうち、これまでの報告を検討して特に PERK が重要である可能性に着目した。In Vitro, In Vivo 実験ともに薬理的に PERK を阻害して検討をおこない、PERK シグナルの役割を明

らかにした。

### 6-3. 本研究の限界と今後の展望

#### 6-3-1. In Vivo 実験における endocytosis と小胞体ストレスの関連に関して検討を行っていない

本研究では endocytosis によって小胞体ストレスが誘導されることを培養肺動脈平滑筋細胞を用いた In Vitro の実験系で示したが、同様の機序が In Vivo で存在しているのか否かについては検討していない。この理由としては、これまでに In Vivo 実験で利用できる endocytosis inhibitor が存在しなかったためであるが、ごく最近、マウスの卵巣癌モデルにおいて、endocytosis inhibitor として、dynamin inhibitor(dynasore)を In Vivo で投与して、卵巣癌の病態を改善するということが報告がされた(41)。そこで今後この dynamin inhibitor (dynasor)を入手し、慢性低酸素暴露（+VEGF受容体拮抗薬）で誘導されるマウス肺動脈高血圧モデルにおいて、dynasor 投与によってその病態改善が認められるか否かを検証する予定である。endocytosis は clathrin の会合によって細胞膜に形成される小胞が dynamin によってくびりとられるプロセスが鍵となっているが、clathrin inhibitor と dynasor はそれぞれこのステップを阻害するものであるため、In vivo 実験において dynasor を使用しても本研究で利用した clathrin inhibitor を用いた In Vitro 結果と矛盾しない結果が得られる

と考えている。ここでは生理学的、組織学的な検討だけでなく、endocytosis の評価が必須となると考えている。そこで、本研究の In Vitro 実験で使用した FITC-アルブミンを In Vivo でもマウスに投与して、肺平滑筋組織で組織学的な endocytosis の評価が可能か否かについて、現在予備検討を重ねている。

#### 6-3-2. PERK をノックアウトした In Vitro 及び In Vivo 実験を行っていない

本研究は培養平滑筋細胞実験、マウス実験ともに薬理学的 PERK 阻害の効果を評価することで PERK の役割を検討した。しかし、薬理学的阻害実験のみではオフターゲットエフェクトの影響を受けている可能性が否定できないこと、さらにマウス実験においては PERK の組織特異的な役割を示すことができないといった限界がある。このため遺伝子改変技術を用いて薬理学的な手法で得られた本研究結果を確認、検証する必要がある。現在、平滑筋細胞特異的 Cre 発現マウスと PERK flox マウス (Jackson Laboratory より入手) を交配することにより平滑筋細胞特異的に PERK を欠失させたコンディショナルノックアウトマウスを作製しており、慢性低酸素暴露 (+ VEGF 受容体阻害薬) による肺高血圧モデルのフェノタイプの解析が進行中である。さらにこのマウスから単離した PASMC を培養し、本研究 (5-1, 5-2) と同様に In Vitro 実験を行うことにより、PERK の平滑筋特異的作用をさらに明確に示したいと考えている。

#### 6-3-3. ストレス顆粒 (SGs) が PASMC を増殖させる機序が解明されていない



癌細胞においても SGs が形成されるが、SGs は pro-survival/anti-apoptosis に作用して細胞増殖亢進に重要な役割を果たしていることが複数の研究グループによって報告されている(19)。癌細胞の増殖においては細胞が死なないというメカニズム（抗アポトーシス）が重要であるが、SGs が抗アポトーシスに作用する機序としては RACK1 と呼ばれる scaffold タンパクが SGs に取り込まれることによって RACK1 を介したストレス応答性のアポトーシス誘導シグナル

（stress-activated p38 and JNK MAPK : SAPKs）の活性化が抑制されるためと考えられている(21)。本研究では肺動脈平滑筋において SGs が細胞増殖に重要であることが示された。この機序については検討していないが、いくつかの興味深い報告がそのヒントとなると考えている。ストレス顆粒の膜上に DYRK3

（dual-specificity tyrosine regulated kinase-3）というタンパクが存在しているが、Bogacheva らはこのタンパクが血球系では DYRK3 が NFAT シグナルを介して赤血球生成（erythropoiesis）を抑制することを報告している(39)。また Wang らは膵β細胞に Harmine を投与すると DYRK1 キナーゼ活性が阻害され、NFAT シグナルが亢進することを報告している。NFAT シグナリングは PAH の病態においても肺動脈平滑筋増殖に重要であることが報告されている(11)ため、SGs に存在する DYRK が肺動脈平滑筋細胞の増殖でも重要な役割を果たしているものと推察している。一方、Harmin の有する DYRK キナーゼ活性の阻害作用が SGs

の分解抑制に重要であることが報告されており (23)、SGs と DYRK、NFAT の相互関係をさらに解明することが今後の課題であると考えている。

6-3-4. マウス PAH モデルのみで PERK inhibitor の有効性を検討していることの妥当性が明らかでない

本研究ではマウス PAH モデルを使用し、PERK inhibitor が肺動脈中膜の肥大を抑制することを示した。これまでに発表されているマウス PAH モデルにはモノクロタリンで PAH を誘導するものや、低酸素のみで PAH を誘導するものがあるが、いずれも肺小動脈中膜筋層の肥厚 (Heath-Edwards 分類 I) は認めるものの、Heath-Edwards 分類 II ～IV に対応した内皮障害は起こしにくいことが知られている。例えば、最近の中岡らのグループが PAH 病態形成における炎症性サイトカインの役割について報告したが、ここで使用された慢性低酸素暴露によるマウス PAH モデルでも、肺小動脈中膜筋層の肥厚は認めるが、ヒトで見られるような内皮障害に伴う叢状変化は認めていない (42)。一方、阿部らはラットに低酸素暴露 + VEGF 受容体拮抗薬を投与することで、Heath-Edwards 分類 II ～IV に対応した内皮障害 (内皮細胞の増殖、内皮障害に伴う叢状変化など) が惹起されることを報告した (40)。本研究で使用したマウスモデルは、このプロトコルを基礎にしてマウスに応用したものであるが、これまでの報告と同様、内皮叢状変化までは認められなかった。これらのことより、種によってストレス暴

露に対する反応性が異なり、マウスではヒトのような叢状変化をきたすモデルを作成することは困難であると考えられる。今後は、よりヒトに近い肺血管組織病変が得られるラットでも PERK inhibitor の有効性を評価する必要があると考えられた。

#### 6-3-5. まとめ—PAH 病態と癌病態との比較

PAH の病態と癌の病態には代謝異常(嫌気呼吸の亢進、アミノ酸代謝の亢進)、c-MYC の発現増加などの共通点が報告されてきた(6)。また一部の癌では PERK inhibitor が抗癌剤として有効であることも報告されている(41)。本研究でも癌の病態とのアナロジーを基礎として、低酸素ストレスで誘導される肺平滑筋細胞の増殖に endocytosis による細胞外タンパクの取り込みが、小胞体ストレス反応を惹起するという分子機序を新たに示すことができた。今後はさらに、PAH 病態と癌病態でどのようなメカニズムがシェアされているのか、またどこが異なるのかについて詳細な比較検討をすすめることによって、PAH の分子病態の解明を目指していきたいと考えている。

## 7. 引用文献

1. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Sanchez MAG, Kumar RK, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R. (2013). "Updated clinical classification of pulmonary hypertension." J Am Coll Cardiol 62(25 Suppl): D34-41.
2. Olsson KM, Delcroix M, Ghofrani HA, Tiede H, Huscher D, Speich R, Grünig E, Staehler G, Rosenkranz S, Halank M, Held M, Lange TJ, Behr J, Klose H, Claussen M, Ewert R, Opitz CF, Vizza CD, Scelsi L, Vonk-Noordegraaf A, Kaemmerer H, Gibbs JSR, Coghlan G, Pepke-Zaba J, Schulz U, Gorenflo M, Pittrow D, Hoeper MM. (2014). "Anticoagulation and survival in pulmonary arterial hypertension: results from the Comparative, Prospective Registry of Newly Initiated Therapies for Pulmonary Hypertension (COMPERA)." Circulation 129(1): 57-65.
3. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaïci A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E, Cottin V, Degano B, Jaïs X, Montani D, Souza R, Simonneau G. (2010). "Survival in patients with idiopathic,

familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era." *Circulation* 122(2): 156-163.

4. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E, Simonneau G. (2006). "Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry." *Am J Respir Crit Care Med* 173(9): 1023-1030.

5. 坂尾誠一郎. (2014). 肺高血圧症の成因をめぐって. *日呼吸誌* 3:478-485.

6. Sutendra G, Michelakis ED. (2014). "The metabolic basis of pulmonary arterial hypertension." *Cell Metab* 19(4): 558-573.

7. Burton VJ, Ciuculan LI, Holmes AM, Rodman DM, Walker C, Budd DC. (2011). "Bone morphogenetic protein receptor II regulates pulmonary artery endothelial cell barrier function." *Blood* 117(1): 333-341.

8. Hoeper MM, Barst RJ, Bourge RC, Feldman J, Frost AE, Galié N, Gómez-Sánchez MA, Grimminger F, Grünig E, Hassoun PM, Morrell NW, Peacock AJ, Satoh T, Simonneau G, Tapson VF, Torres F, Lawrence D, Quinn DA, Ghofrani

HA. (2013). "Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: results of the randomized IMPRES study." *Circulation* 127(10) : 1128–1138.

9. Sobolewski A, Rudarakanchana N, Upton PD, Yang J, Crilley TK, Trembath RC, Morrell NW. (2008). "Failure of bone morphogenetic protein receptor trafficking in pulmonary arterial hypertension: potential for rescue." *Hum Mol Genet* 17(20): 3180–3190.

10. Minamino T, Kitakaze M. (2010). "ER stress in cardiovascular disease." *J Mol Cell Cardiol* 48(6): 1105–1110.

11. Teske BF, Weka SA, Bunpob P, Cundiffb JK, McClinticka JN, Anthonyb TG, Weka RC. (2011). "The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress." *Mol Biol Cell* 22(22): 4390–4405.

12. Rajesh K, Krishnamoorthy J, Kazimierczak U, Tenkerian C, Papadakis AI, Wang S, Huang S, E Koromilas A. (2015). "Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 $\alpha$  at serine 51 determines the cell fate decisions of Akt in response to oxidative stress." *Cell Death Dis* 6: e1591.

13. Axten JM, Medina JR, Feng Y, Shu A, Romeril SP, Grant SW, Li WHH, Heerding DA, Minthorn E, Mencken T, Atkins C, Liu Q, Rabindran S, Kumar R, Hong X, Goetz A, Stanley T, Taylor JD, Sigethy SD, Tomberlin GH, Hassell AM, Kahler KM, Shewchuk LM, Gampe RT. (2012). "Discovery of 7-methyl-5-(1-([3-(trifluoromethyl)phenyl]acetyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a potent and selective first-in-class inhibitor of protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)." *J Med Chem* 55(16): 7193-7207.
  
14. Harding HP, Zeng H, Zhang Y, Jungries R, Chung P, Plesken H, Sabatini DD, Ron D. (2001). "Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in Perk<sup>-/-</sup> mice reveals a role for translational control in survival of secretory cells." *Mol. Cell* 7:1153-1163.
  
15. Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova TV. (2010). "The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(2):113-127.
  
16. Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen CUT. (2001). "Molecular mechanisms of translation initiation

in eukaryotes."Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:7029-7036.

17. Holcik M, Sonenberg N. (2005). "Translational control in stress and apoptosis." Nat. Rev.Mol. Cell Biol. 6:318-327.

18. Han J, Back SH, Hur J, Lin YH, Gildersleeve R, Shan J, Yuan CL, Krokowski D, Wang S, Hatzoglou M, Kilberg MS, Sartor MA, Kaufman RJ. (2013). "ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. " Nature Cell Biol. 15:481-490.

19. Anderson P, Kedersha N, Ivanov P. (2015). "Stress granules, P-bodies and cancer." Biochim Biophys Acta 1849(7): 861-870.

20. Kedersha NL, Gupta M, Lia W, Millera I, Anderson P. (1999). " RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. " J. Cell Biol. 147:1431-1442.

21. Arimoto K, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Saito H, Takekawa M. (2008). " Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways." Nat Cell Biol. 10(11): 1324-1332.



22. Li S, Hu GF. (2010). "Angiogenin-mediated rRNA transcription in cancer and neurodegeneration. " *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 1:26-35.
23. Wippich F, Bodenmiller B, Trajkovska MG, Wanka S, Aebersold R, Pelkmans L. (2013). "Dual specificity kinase DYRK3 couples stress granule condensation/dissolution to mTORC1 signaling." *Cell* 152(4):791-805.
24. Michelakis ED, Wilkins MR, Rabinovitch M. (2008). "Emerging concepts and translational priorities in pulmonary arterial hypertension." *Circulation* 118:1486-1495.
25. Archer SL, Weir EK, Wilkins MR. (2010). "Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: new concepts and experimental therapies. " *Circulation* 121:2045-2066.
26. Newman JH, Wheeler L, Lane KB, Loyd E, Gaddipati R, Phillips JA, Loyd JE. (2001). "Mutation in the gene for bone morphogenetic protein receptor II as a cause of primary pulmonary hypertension in a large kindred. " *N Engl J Med* 345:319-324.
27. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. (2005). "Endoplasmic reticulum stress:

cell life and death decisions. " J Clin Invest 115:2656-2664.

28. Sobolewski A, Rudarakanchana N, Upton PD, Yang J, Crilley TK, Trembath RC, Morrell NW. (2008). "Failure of bone morphogenetic protein receptor trafficking in pulmonary arterial hypertension: potential for rescue." Hum Mol Genet 17(20): 3180-3190.

29. Dromparis P, Paulin R, Stenson TH, Haromy A, Sutendra G, Michelakis ED. (2013). "Attenuating endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic strategy in pulmonary hypertension." Circulation 127(1): 115-125.

30. Yao C, Yu J, Taylor L, Polgar P, McComb ME, Costello CE. (2015). "Protein Expression by Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells Containing a Mutation and the Action of ET-1 as Determined by Proteomic Mass Spectrometry ." Int J Mass Spectrom 378: 347-359.

31. Palm W, Park Y, Wright K, Pavlova NN, Tuveson DA, Thompson CB. (2015) . " The Utilization of Extracellular Proteins as Nutrients Is Suppressed by mTORC1." Cell 162(2): 259-270.

32. Mouraret N, Marcos E, Abid S, Gary-Bobo G, Saker M, Houssaini A, Dubois-Rande JL, Boyer L, Boczkowski J, Derumeaux G, Amsellem V, Adnot S. (2013). "Activation of lung p53 by Nutlin-3a prevents and reverses experimental pulmonary hypertension." *Circulation* 127(16): 1664-1676.
33. Savai R, Al-Tamari HM, Sedding D, Kojonazarov B, Muecke C, Teske R, Capecchi MR, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT, Pullamsetti SS. (2014). "Pro-proliferative and inflammatory signaling converge on FoxO1 transcription factor in pulmonary hypertension." *Nat Med* 20(11): 1289-1300.
34. Yumoto R, Nishikawa H, Okamoto M, Katayama H, Nagai J, Takano M. (2006). "Clathrin-mediated endocytosis of FITC-albumin in alveolar type II epithelial cell line RLE-6TN." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(5): L946-955.
35. von Kleist L, Stahlschmidt W, Bulut H, Gromova K, Puchkov D, Robertson MJ, MacGregor KA, Tomilin N, Pechstein A, Chau N, Chircop M, Sakoff J, von Kries JP, Saenger W, Kräusslich HG, Shupliakov O, Robinson PL, McCluskey A, Haucke V. (2011). "Role of the clathrin terminal domain in regulating

coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition." *Cell* 146(3): 471-484.

36. Wang P, Alvarez-Perez JC, Felsenfeld DP, Liu H, Sivendran S, Bender A, Kumar A, Sanchez R, Scott DK, Garcia-Ocaña A, Stewart AF. (2015). "A high-throughput chemical screen reveals that harmine-mediated inhibition of DYRK1A increases human pancreatic beta cell replication." *Nat Med* 21(4): 383-388.

37. Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. (2003). "XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. " *Mol Cell Biol* 23: 7448-7459.

38. Hu W, Liu T, Ivan C, Sun Y, Huang J, Mangala LS, Miyake T, Dalton HJ, Pradeep S, Rupaimoole R, Previs RA, Han HD, Bottsford-Miller J, Zand B, Kang Y, Pecot CV, Nick AM, Wu SY, Lee JS, Sehgal V, Ram P, Liu J, Tucker SL, Lopez-Berestein G, Baggerly KA, Coleman RL, Sood AK. (2014). "Notch3 pathway alterations in ovarian cancer. " *Cancer Res* 74:3282-93.

39. Bogacheva O, Bogachev O, Menon M, Dev A, Houde E, Valoret EI, Prosser HM, Creasy CL, Pickering SJ, Grau E, Rance K, Livi GP, Karur V,

Erickson-Miller CL, Wojchowski DM. (2008). "DYRK3 dual-specificity kinase attenuates erythropoiesis during anemia." *J Biol Chem* 283(52): 36665-36675.

40. Abe K, Toba M, Alzoubi A, Ito M, Fagan KA, Cool CD, Voelkel NF, McMurtry IF, Oka M. (2010). "Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension." *Circulation* 121(25): 2747-2754.

41. Ma XH, Piao SF, Dey S, McAfee Q, Karakousis G, Villanueva J, Hart LS, Levi S, Hu J, Zhang G, Lazova R, Klump V, Pawelek JM, Xu X, Xu W, Schuchter LM, Davies MA, Herlyn M, Winkler J, Koumenis C, Amaravadi RK. (2014). "Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma." *J. Clin. Invest* 124:1406-1417.

42. Hashimoto-Kataoka T, Hosen N, Sonobe T, Arita Y, Yasui T, Masaki T, Minami M, Inagaki T, Miyagawae S, Sawae Y, Murakami M, Kumanogoh A, Yamauchi-Takahara K, Okumura M, Kishimoto T, Komuro I, Shirai M, Sakata Y, Nakaoka Y. (2015). "Interleukin-6/interleukin-21 signaling axis is critical in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension." *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(20): E2677-2686.

## 8. 謝辞

本研究に関して、多大な指導及び助言を頂きました瀧本英樹先生(肺高血圧先進医療研究学講座)、指導教官の小室一成先生(循環器内科学)に感謝の意を表します。本研究の一部は、東京大学院医学系研究科博士課程研究遂行協力制度(平成25年度、平成26年度、平成27年度)、最先端研究開発支援プログラム(FIRST)からサポートを頂いた。