

論文の内容の要旨

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

氏名 清水 峻志

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(O₂ 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(02 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。

さらに 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。