

# 論文の内容の要旨

## 獣医学専攻

平成 23 年度博士課程入学

氏名 小林幸司

指導教員 村田幸久

論文題目 血管透過性抑制因子の同定とその作用機序の解明

### 【背景・目的】

血管の最内層を覆う内皮細胞は、隣接する内皮細胞と VE-cadherin などのタンパクを介して、「接着結合」と呼ばれる細胞間接着構造を形成している。通常時の内皮細胞はこの接着結合によって血液と組織の境界面に強固な障壁を形成し、血管内外の物質の移動を制限している。一方、炎症時には、大量に産生された炎症性メディエーターが内皮細胞の接着結合を破壊するため、血管の透過性が上昇する。その結果、血漿成分や炎症細胞が血中から組織へと流入し、さらなる炎症反応を引き起こされる。このように、血管透過性の亢進は炎症の最初期に生じ、その後の反応を引き起こすきっかけとなっているため、透過性制御因子の同定とその作用機序の解明は、炎症を理解しかつ制御する上で不可欠である。

Prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) は 細胞膜リン脂質由来のアラキドン酸がさらに代謝されて産生されるプロスタグランジンの 1 つである。PGD<sub>2</sub> は D prostanoid (DP) 受容体と chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells (CRTH2) 受容体を持ち、これらを介して睡眠や痛覚を制御し、また、喘息やアレルギー性皮膚炎を悪化させることが知られている。しかし、血管機能に対する PGD<sub>2</sub> の作用はほとんど検討されていなかった。近年、我々のグループは、PGD<sub>2</sub> が内皮細胞の DP 受容体を刺激して血管透過性を抑制し、癌の血管新生と成長を阻害することを見出した。しかし、その詳細な機構は不明のままであった。

骨髄間質細胞由来因子-1 $\alpha$  (stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ ; SDF-1 $\alpha$ ) は癌や虚血組織など低酸素領域で大量に産生されるケモカインの 1 種である。SDF-1 $\alpha$  の受容体として、C-X-C chemokine receptor type 4 および type 7 (CXCR4 および CXCR7) という 2 つの G タンパク結合型受容体が同定されており、これらは骨髄細胞および、内皮細胞に発現している。骨髄細胞に対する SDF-1 $\alpha$  の作用に関しては盛んに研究がおこなわれており、SDF-1 $\alpha$  は走化性因子として働いて、骨髄細胞の骨髄・末梢血・末梢組織間の移動を調節していることがわかっている。一方で、内皮細胞に対する SDF-1 $\alpha$  の作用についてはほとんど明らかになっていなかった。

以上を踏まえて、本研究では、PGD<sub>2</sub>とSDF-1 $\alpha$ という2つの生理活性物質に着目し、これらの血管透過性に対する作用とその詳細な機序について検討した。

## 【結果】

### 1) PGD<sub>2</sub>の血管透過性に対する作用とその機序

経内皮抵抗 (transendothelial electrical resistance: TER) および蛍光標識デキストランの透過性の測定によって、PGD<sub>2</sub> (0.1-3  $\mu$ mol/L) が濃度依存的にヒト臍帯動脈内皮細胞 (HUVEC) の透過性を抑制することが明らかになった。PGD<sub>2</sub>の受容体のうち、DP受容体の選択的作動薬であるBW245CはHUVECの透過性を抑制したが、CRTH2受容体選択的作動薬であるDK-PGD<sub>2</sub>は透過性に影響を与えなかった。また、PGD<sub>2</sub>およびBW245Cの透過性抑制作用はDP受容体阻害薬であるBWA868Cの前処置によって解除された。

次に、DP受容体を介した透過性抑制作用の詳細な機構について検討した。BW245CはHUVECの細胞内cAMP濃度を上昇させた。細胞内cAMP濃度の上昇はprotein kinase A (PKA) やexchange protein directly activated by cAMP 1 (Epac1)の活性化を介して生理作用を発揮する。PKA阻害薬(PKI)の前処置はBW245Cの透過性抑制作用を顕著に阻害した。BW245CはHUVECのPKA活性を顕著に増加させることも確認した。一方で、siRNAの導入によるEpac1の発現抑制は、BW245Cの作用に影響を与えなかった。

PKAの下流の因子であるRac1は、内皮細胞のアクチン骨格を再構築し、接着結合を強化することで透過性を抑制していることが知られている。Rac1阻害薬であるNSC-23766の前処置はBW245Cの透過性抑制作用を完全に解除した。また、プルダウン法によってBW245CがHUVECのRac1の活性化を引き起こすことも示された。免疫染色によって、BW245Cは内皮細胞のcortical actin rimを形成し、また、VE-cadherinの細胞膜上での発現を増加させて接着結合を強固にすることが分かった。これらの現象はNSC-23766の前処置によって完全に阻害された。

PGD<sub>2</sub>の透過性抑制作用を、マウスモデルを用いて評価した。C57BL6マウス(WTマウス)の耳介にcroton oilを塗布すると、炎症が惹起されて血管透過性が上昇し、evans blueの血管外漏出が引き起こされた。BW245Cの処置はcroton oil塗布による血管透過性上昇を抑制したが、この作用はPKIの前処置によって解除された。DP受容体ノックアウトマウス(DP<sup>-/-</sup>マウス)にcroton oilを塗布すると、WTマウスに比べて、血管透過性がより大きく上昇した。DP<sup>-/-</sup>マウスにBW245Cを処置しても血管透過性に変化は見られなかった。

### 2) SDF-1 $\alpha$ の血管透過性に対する作用とその機序

TERおよび蛍光標識デキストランの透過性の測定によって、SDF-1 $\alpha$  (1-100 ng/mL) がウシ大動脈内皮細胞 (BAEC) の透過性を抑制することが分かった。この透過性抑制作用はヒト由来の初代単離内皮細胞 (ヒト肺動脈内皮細胞 (HPAEC) および HUVEC) でも観察された。CXCR4の阻害薬およびsiRNA導入による発現抑制の処置によって、SDF-1 $\alpha$ の透

過性抑制作用は完全に解除された。一方、CXCR7の阻害薬およびsiRNAの処置はSDF-1 $\alpha$ の作用に影響を与えなかった。

CXCR4はGiタンパク結合型の受容体であるため、Giタンパクとその下流の因子であるPI3K、Aktの関与について検討した。Giタンパク阻害薬 (pertussis toxin)、PI3K阻害薬 (LY294002)、Akt阻害薬 (Akt1/2 kinase inhibitor) の前処置はSDF-1 $\alpha$ の透過性抑制作用を顕著に抑制した。ウエスタンブロットにより、SDF-1 $\alpha$ はAkt<sup>S473</sup>のリン酸化を引き起こすことが確認された。NSC-23766の前処置はSDF-1 $\alpha$ の透過性抑制作用を完全に解除した。また、プルダウン法によってSDF-1 $\alpha$ がBAECのRac1活性化を引き起こすことを確認した。免疫染色によって、SDF-1 $\alpha$ は内皮細胞のcortical actin rim形成を促進し、また、VE-cadherinの細胞膜上での発現を増加させて接着結合を強固にすることが分かった。

SDF-1 $\alpha$ の透過性抑制作用を、マウスモデルを用いて検討した。Croton oilをFVBマウスの耳介に塗布すると血管透過性が亢進し、evans blueの血管外漏出や浮腫が引き起こされた。これらの現象はSDF-1 $\alpha$  (100 ng/ear) の皮内投与によって強く抑制された。SDF-1 $\alpha$ の透過性抑制作用は、LY294002やNSC-23766の前処置によって解除された。また、SDF-1 $\alpha$ は、histamineあるいはVEGFの皮内投与による血管透過性亢進に対して、拮抗作用を示すことも明らかになった。

#### 【結論】

本研究によって1) PGD<sub>2</sub>の血管透過性抑制作用に、DP/cAMP/PKA/Rac1経路の活性化と、それに続く内皮細胞間接着結合の強化が関与すること、2) SDF-1 $\alpha$ が強力な血管透過性抑制分子であり、その作用にCXCR4/Gi/PI3K/Rac1経路の活性化と、それに続く内皮細胞間接着結合の強化が関与すること、が示された。血管透過性の亢進は急性炎症のみならず慢性炎症の進行にも大きく関与する現象であることが近年明らかになっており、透過性制御因子は新たな治療標的として注目されている。PGD<sub>2</sub>とSDF-1 $\alpha$ の強力な血管透過性抑制作用とその詳細な作用機序を解明した本研究が、様々な炎症関連疾患の治療法開発の糸口になれば幸いである。