

氏名（本籍）	はら たくもと（東京都）
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	甲第11号
学位授与の日付	平成29年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Clarification of the mechanisms underlying vascular endothelial proteoglycan synthesis based on novel research strategies (新しい研究戦略に基づく血管内皮細胞のプロテオグリカン合成機構解明に関する研究)

論文審査委員	(主査) 教授 宮崎 智
	教授 鍛冶 利幸 教授 市原 学
	教授 和田 猛 教授 樋上 賀一

論文内容の要旨

プロテオグリカンは細胞外マトリックスに存在する複合糖質であり、コアタンパク質に対して共有結合した硫酸化糖鎖グリコサミノグリカンによって分類される。様々な生体内因子をコアタンパク質やグリコサミノグリカンに結合させ、それらの活性を調節することで、プロテオグリカンはシグナルメディエーターとして機能することが知られている。また、細胞種ごとに産生される分子種のみならず、グリコサミノグリカンに対する修飾も異なるため、プロテオグリカンは細胞種ごとに別個の解析が求められる。血管の内腔を一層で覆う血管内皮細胞から主に産生されるヘパラン硫酸プロテオグリカンとして、基底膜の構成成分である大型分子種のパールカンをはじめ、細胞膜貫通型のシンデカン-1 およびシンデカン-4、ならびに、細胞膜局在型のグリピカンが存在する。一方で、デルマタン硫酸プロテオグリカンとしては、小型分子種であるビグリカンとデコリンが細胞外に分泌される。これらのプロテオグリカン分子種は、抗血栓特性をはじめとする内皮細胞機能の維持に寄与することが報告されている。

また、プロテオグリカンは動脈硬化血管壁において分子種ごとの存在量が大きく変動す

ることが報告されている。すなわち、内皮細胞の傷害に起因する動脈硬化症の誘発と、その進展に伴ってビグリカンが高く蓄積する一方で、ヘパラン硫酸プロテオグリカンは減少することが認められている。しかしながら、このような病理組織学的知見を裏付けるプロテオグリカン分子種の発現調節機構や、内皮細胞におけるビグリカンの機能に関する報告は皆無である。これまで、内皮細胞のプロテオグリカン分子種の発現調節は、動脈硬化血管壁での発現が認められる細胞増殖因子やサイトカインの処理下において解析が行われてきたが、その理解は決して十分であるとは言えない。その原因は一概に断定できるものではないが、アプローチ方法の転換は現状の打破に繋がると考える。そこで本研究では、従前と異なる新奇なアプローチ方法に基づき、内皮細胞が産生するプロテオグリカン分子種の発現調節機構の解明を目的とした。

まず病理組織学知見に着想を得て、内皮細胞におけるビグリカンの発現変動が、他のプロテオグリカン分子種の発現に及ぼす影響を検討したところ、ビグリカンの発現抑制下において時間依存的にシンデカン-4の発現が誘導されることを見出した。TGF- β は動脈硬化の進展過程において蓄積し、ビグリカンと相互作用することが報告されている。そこで、TGF- β_1 シグナルとシンデカン-4発現の関与を検討した。TGF- β_1 の発現を抑制した内皮細胞において、シンデカン-4の発現誘導が認められた。内皮細胞ではTGF- β タイプ1受容体としてALK1とALK5が発現しているが、ALK5の発現抑制時のみシンデカン-4の発現が誘導され、ALK5阻害剤であるLY364947処理下においても同様の結果が示された。また、ビグリカンとTGF- β_1 およびALK5の相互作用を検討したところ、ビグリカンのコアタンパク質はTGF- β_1 およびALK5と結合し、複合体を形成することが示された。TGF- β_1 はALK5を介して下流のSmad経路(Smad2およびSmad3)とMAPK経路(ERK1/2, JNKおよびp38 MAPK)を活性化することが知られているが、ビグリカンの発現抑制下においてTGF- β_1 によるSmad2/3活性化の減弱が認められた。

次に、TGF- β_1 で処理した内皮細胞における継時的なシンデカン-4の発現を検討したところ、TGF- β_1 の処理後6時間(初期)にかけて濃度依存的なシンデカン-4の発現誘導が生じ、処理後12時間にかけて減衰し、処理後24時間(後期)では濃度依存的な発現抑制が認められた。そこで、TGF- β_1 による二相性のシンデカン-4発現変動に関する分子機構の解析を行った。まず、TGF- β_1 処理後の継時的なSmad経路とMAPK経路の活性化を検討した結果、TGF- β_1 処理濃度依存的なSmad2/3とp38 MAPKの活性化が認められた。p38 MAPK経路の阻害剤SB203580の前処理により、TGF- β_1 処理後初期で生じたシンデカン-4の発現増加が顕著に抑制されたが、後期に生じたシンデカン-4の発現抑制への影響は認められなかった。一方、Smad2およびSmad3の発現抑制はTGF- β_1 処理によらず、シンデカン-4の発現

を増加させた。また、Smad3 の発現抑制下では TGF- β_1 処理後初期におけるシンデカン-4 の発現増加が消失し、後期におけるシンデカン-4 コアタンパク質の発現抑制が減弱した。TGF- β_1 処理後後期におけるシンデカン-4 mRNA の抑制は、Smad2 および Smad3 単独の発現抑制では変動が認められなかったものの、Smad2 と Smad3 を同時に発現抑制することでシンデカン-4 の抑制は消失した。なお、TGF- β_1 による p38 MAPK の活性化への Smad 経路の関与を検討したところ、Smad3 の発現抑制下において p38 MAPK の活性化の消失が認められた。これより、内皮細胞のビグリカンは TGF- β_1 と協調して ALK5/Smad 経路を介してシンデカン-4 の発現を抑制すること、また、TGF- β_1 によるシンデカン-4 の発現調節は 2 相性を有し、p38 MAPK により一過的に発現誘導された後、Smad3 により発現抑制されることが明らかとなった。

細胞増殖因子やサイトカインは、個々に特異性の高い受容体や下流に位置する分子によりシグナルが伝達されるため、その枠を超えて生じる内皮細胞機能の調節や、プロテオグリカン分子種の発現変動を解析するための手段として適当であるとは言い難い。そこで、これらの分子に依存しないプロテオグリカン分子種の発現調節機構を探索するため有機-無機ハイブリッド分子（ハイブリッド分子）に着目した。分子構造内に金属を有するハイブリッド分子は、主に分子変換反応の触媒として普及し、今日の化学の発達に寄与しているが、生命科学研究では未だ活用例が少ない。当研究室では、生体機能解析ツールとしてのハイブリッド分子の活用例を提示し、ハイブリッド分子の生物学（バイオオルガノメタリクス）を世界に先駆けて発信している。必須微量元素である亜鉛は内皮細胞の増殖を促進させ、傷害内皮細胞層の修復を促す。また、内皮細胞の防御応答および細胞増殖にシンデカン-4 とパールカンはそれぞれ寄与することが知られている。そこで、これら分子種の発現を調節するハイブリッド分子を亜鉛錯体ライブラリーから探索したところ 1,10-phenanthroline (*o*-Phen) 骨格を配位子とする化合物群にシンデカン-4 の高い発現誘導とパールカンの発現抑制が認められた。そこで、*o*-Phen に対して亜鉛、銅、およびロジウムを導入した化合物（それぞれ Zn-Phen, Cu-Phen, および Rh-Phen）を用いて、ハイブリッド分子により惹起される生物活性に中心金属が及ぼす影響を検討した。まず、内皮細胞を各化合物で処理したところ、Zn-Phen, Cu-Phen と Rh-Phen は濃度依存的に細胞内亜鉛、銅およびロジウム蓄積量をそれぞれ増加させ、Cu-Phen において強い細胞傷害性が認められた。そこで細胞傷害性を示さない濃度の *o*-Phen, Zn-Phen, および Rh-Phen の処理下において内皮細胞のプロテオグリカン産生に及ぼす影響を検討したところ、各化合物に共通してシンデカン-4 の発現誘導が生じた一方で、Rh-Phen に顕著なパールカンの発現抑制作用が認められた。なお、シンデカン-4 の発現誘導は *o*-Phen>Zn-Phen>Rh-Phen の順に強く、い

いずれも処理濃度依存的な発現誘導を示した。また、*o*-Phen と Zn-Phen は曝露後 48 時間までシンデカン-4 の持続的な発現誘導を示したのに対し、Rh-Phen は処理後 24 時間でその発現を誘導させたものの、その後 48 時間にかけて誘導の消失が認められた。

o-Phen は低酸素誘導因子-1 α (HIF-1 α) の発現を亢進させることが報告されている。そこで、*o*-Phen, Zn-Phen, および Rh-Phen 処理下の内皮細胞における HIF-1 α の発現を検討したところ、*o*-Phen と Zn-Phen は HIF-1 α の発現を増加させたが、Rh-Phen による発現変動は認められなかった。HIF-1 α または、HIF-1 α の転写活性化に必要な分子である HIF-1 β の発現抑制下では、*o*-Phen と Zn-Phen によるシンデカン-4 の発現誘導が抑制された。しかしながら、HIF-1 α のアイソフォームである HIF-2 α の発現抑制下ではシンデカン-4 の発現誘導は抑制されなかった。加えて、*o*-Phen および Zn-Phen は HIF の分解を促す prolyl hydroxylase domain-containing protein 2 の活性を抑制することが示された。これらの結果により、*o*-Phen と Zn-Phen は HIF の分解を抑制することで、HIF-1 α / β 経路特異的にシンデカン-4 の発現を誘導することが明らかとなった。

一方で、Rh-Phen は処理濃度依存的にパルカンの発現を抑制し、その作用は *o*-Phen や塩化ロジウムでは認められず、ハイブリッド分子としての Rh-Phen の構造が重要であることが示された。加えて、Rh-Phen の誘導體を用いてパルカンの発現抑制に重要な構成要素を検討したところ、Rh-Phen の 2,9 位メチル基置換体ではパルカンの発現抑制が消失した一方で、5 位ニトロ基置換体では Rh-Phen よりも強いパルカンの発現抑制が認められた。また、内皮細胞に限らず、血管平滑筋細胞においても Rh-Phen によって処理後 2 時間よりパルカンの発現が抑制された。内皮細胞においてパルカンは細胞増殖を促すことが知られているため、細胞増殖に関わる MAPK 経路および Akt 経路への Rh-Phen の関与を検討したところ、p38 MAPK の活性化は亢進し、Akt の活性化は抑制されることが明らかとなった。低分子化合物を用いたパルカンの発現調節に関する報告は前例がなく、詳細なメカニズムは現在検討中である。

以上、動脈硬化症の病理組織学知見に着想を得た検討からは、(1) プロテオグリカン分子種に存在する発現調節のクロストークを見出し、(2) 内皮細胞におけるビグリカンの生理的機能を示すとともに、TGF- β ₁ シグナルを介したシンデカン-4 の発現調節機構を明らかにした。一方で、バイオオルガノメタリクス研究戦略に基づく検討では (3) ハイブリッド分子により惹起される生物活性は、配位子に導入する金属を選択することで、微細に調節可能であることを示唆する結果を得るとともに、(4) 内皮細胞のシンデカン-4 が HIF-1 α / β 経路を介して誘導されることを示した。本研究は、これまでに例を見ない方法論に基づき内皮細胞におけるプロテオグリカン分子種の発現調節機構の一端を解明したものである。

論文審査の結果の要旨

動脈硬化病変は、先進国において死因別死亡率の上位にある心血管疾患の基礎病変として、先進国共通の公衆衛生学上の大問題となっている。動脈硬化病変の進展過程は長期間に及び、しかもそのメカニズムはきわめて複雑である。しかしながら、近年、細胞レベル分子レベルでは、プロテオグリカン (PGs) が鍵分子となっていることが次第に明らかになってきた。PGs はコアタンパク質と呼ばれる骨格にグリコサミノグリカン糖鎖を結合した構造を有する複合糖質の総称である。PGs は細胞増殖因子/サイトカインとの相互作用や細胞外マトリックスの構築等を通じて細胞の機能調節を行う多機能型の分子である。血管内皮細胞は血管内腔を一層で覆い、動脈硬化病変に対して抑制的な役割を果たしているが、その細胞膜上および細胞外マトリックスには数種類の PG 分子種が存在している。しかしながら、その合成調節はよく分かっていない。

本論文著者は、疾病予防と健康増進を目指す衛生薬学の観点から、血管内皮細胞の PGs に着目した。内皮細胞は細胞外マトリックスに存在するヘパラン硫酸 PGs の大型分子種パルカンおよびデルマトン硫酸 PGs の小型分子種ビグリカン、細胞膜貫通型ヘパラン硫酸 PGs のシンデカンファミリーおよび細胞膜結合型ヘパラン硫酸 PGs のグリピカンを発現していることが知られている。

第 1 章第 1 節では、機能がほとんど分かっていなかったビグリカンについて、その機能が他の PG 分子種の発現調節にあるのではないかという仮説を立て研究に取り組んだ。その結果、ビグリカンが内皮細胞の内因性サイトカインの 1 つである TGF- β_1 およびその受容体である ALK5 と結合し、TGF- β_1 のシグナル経路である ALK5-Smad2/3 経路を活性化することによってシンデカン-4 の発現を負に制御することを明らかにした。PG 分子種発現のクロストークというこれまでにない新しい戦略を提示し、その存在を証明しただけでなく、ビグリカンが TGF- β_1 に対する Co-receptor として機能することを明らかにし、さらにビグリカン-シンデカン-4 発現クロストークのメカニズムまで明らかにした、きわめて優れた内容となっている。

この過程で、本論文著者は TGF- β_1 がシンデカン-4 の発現を一過性に上昇させ、その後その発現を抑制するという現象を観察した。そこで第 1 章第 2 節ではこの二相性のメカニズムについて内皮細胞の培養系を用いて解析を行った。その結果、TGF- β_1 によるシンデカン-4 発現の最初の上昇は ALK5-Smad3-p38 MAPK 経路の活性化によって起こり、一方、その後起こる抑制は ALK5-Smad2/3 経路の活性化によることを明らかにした。第 1 節の研究をサイトカインによる内皮細胞シンデカン-4 の合成調節の分子機構解明に発展させた研究であり、本論文著者の研究者としての実力が発揮された研究として高く評価される。

第 2 章はもう 1 つの新しい研究戦略—バイオオルガノメタリクス—に関するものである。第 1 章の研究は PG 分子種発現のクロストークという新戦略が特徴であったが、結果は生理的調節因子による調節機構に帰着した。それ自体は重要な発見であるが、本論文著者はそれに満足せず、有機-無機ハイブリッド分子を活用して副経路の解析に取り組んだ。第 1 節では、亜鉛錯体ライブラリーより血管内皮細胞の PG 合成を調節する化合物を抽出した。膨大な実験結果から解析ツールの候補となる亜鉛

錯体を獲得した。第2節では、その化合物を含むライブラリーの毒性評価を行い、同じ配位子を有するハイブリッド分子が導入金属によってその毒性を劇的に変えること、およびその毒性は無機態の金属の毒性から想定できないことを明らかにした。これは毒性学上も重要な知見である。

第3節では、毒性がないことを確認した解析ツールの候補となる亜鉛錯体と配位子、さらに亜鉛よりも固く配位子に結合するロジウム導入体を用いて、内皮細胞 PG 合成を解析した。その結果、配位子 1,10-phenanthroline > 亜鉛導入体 > ロジウム導入体の順に強いシンデカン-4 誘導能を示すことを見出した。この結果から本論文著者はこれらの化合物のキレート能に着目し、1,10-phenanthroline およびその亜鉛導入体が prolyl hydroxylase domain-containing protein 2 を阻害することによって低酸素シグナル HIF-1 α / β 経路を活性化し、そのためにシンデカン-4 が誘導されることを明らかにした。有機-無機ハイブリッド分子を活用することによって初めて解明された内皮細胞シンデカン-4 合成誘導の副経路であり、新しい研究戦略によって解明されたという意味でも優れた研究であると評価される。

本論文の内容は4編の国際学術論文として公表されており、その新規性、戦略性、独創性、重要性において高く評価できるものである。以上より、本論文は博士（薬科学）を授与するのに相応しいものであると認める。