

図2 PPAR γ によるCOX-2の発現制御

マクロファージ系細胞において、COX-2により産生されるPGのうちPGD₂代謝物がPPAR γ リガンドとして作用し、COX-2の発現にかかわるNF- κ Bの転写因子の活性化を抑制する。この機構によって非活性化状態におけるCOX-2の発現は非常に低いレベルで維持される。炎症性メディエーターの刺激によってCOX-2の発現が活性化されると、同時にPPAR γ の発現が下行制御され、この負のフィードバックから解放される。また、COX-2から産生されるPGE₂はマクロファージ系細胞で発現している細胞膜型受容体に作用し、細胞内のcAMP濃度を上昇させ、それによって更にCOX-2の発現が活性化する。なお、このような場合においても、グルココルチコイド受容体(GR)の発現は逆増加し、グルココルチコイドによる抑制効果に対して感受性が上がる。

1995年に報告された。最近になって尿中や培養液中における測定の結果、15d-PGJ₂は内因性リガンドではないとする報告がなされた³⁾。15d-PGJ₂はPGE₂の代謝産物であるPGA₂とともに、以前より抗腫瘍活性、抗ウイルス活性、細胞周期のG1停止活性が示されている。通常のPGにはG蛋白質共役型の細胞膜型受容体の存在が明らかになっているが、PGJ₂およびPGA₂シリーズのPGには細胞膜型受容体が見いだされておらず、核に移行することが知られていた。また、細胞内でCOXは小胞体と核膜の両方に検出される。したがって、15d-PGJ₂がPPAR γ の内因性リガンドとして働くことは、これらの知見と一貫性をもつように考えられる。しかしながら、15d-PGJ₂の作用はPPAR γ に依存せず、炎症に関与する転写因子NF- κ Bの制

御にかかわる酵素I κ -Bキナーゼを阻害すること、細胞内酸化ストレス誘発因子であること、解毒酵素であるグルタチオン転移酵素の誘導を引き起こすことなどが報告されている。なお、最近PGA₂をリガンドとする核内受容体の候補として核内受容体NR4Aファミリー(Nur77, Nurr1, NOR1)が報告された。

著者は誘導型シクロオキシゲナーゼ(COX-2)の細胞特異的発現制御の研究から、少なくともマクロファージ系細胞において、COX-2の発現がPPAR γ によってフィードバック制御されることを報告した(図2)^{4,5)}。この制御機構はまだまだ不完全で修正を要すると思われるが、少なくともCOX-2とPPAR γ が逆の発現パターンを示すことが多数報告されており、'PGD₂の代謝産物が核内で、PPAR γ のリガンドとし

て働くか?’という疑問とともに今後の課題である。

3. オレイルエタノールアミドと 15-HETE-G

オレイルエタノールアミド(OEA)は核受容体PPAR α の活性化を介して食欲と体重をコントロールすることが報告された⁹⁾。既にアラキドン酸のエタノールアミドであるアナンダミドはG蛋白質共役型受容体であるカンナビノイド受容体を介して、多幸福感など、マリファナ様の作用を発揮することが知られている。そこでオレイン酸のエタノールアミドであるOEAについてもカンナビノイド受容体に作用することが予想されたが、そのような作用は見いだされなかった。そしてOEAはPPAR α に高い親和性をもち(EC₅₀=10 nM)、その親和性はオレイン酸に対する親和性の1,000倍と報告された。一方、OEAはPPAR δ に対しても親和性をもつが(EC₅₀=1.1 μ M)、PPAR γ には親和性をもたない。更に、①OEAはPPAR α の活性化を介して、脂質代謝にかかわる蛋白質の転写を高め、摂食刺激に関与するNO合成酵素の誘導を抑制すること、②自由に摂食させているマウスの小腸を時間差で調べると、えさを食べる夜間はOEA濃度が低く、逆に満腹で休んでいる日中はOEA濃度が高いことが報告され、OEAがPPAR α の活性化を介して食欲の調節をしていることが提唱された。著者らもその追試実験を行ったが、著者らの系ではOEAのPPAR α 活性化能は見いだされていない。その理由として、PPARに対する反応性において細胞特異的な機構が働いている可能性や報告された実験系では安定な遺伝子導入系を用いており、通常使われている一過性の遺伝子導入系とは異なっている可能性などが考えられる。魅惑的な仮説であるので、今後更に検証していく必要がある。

一方、前述のカンナビノイド受容体の内因性リガンドとしては、アナンダミドよりも2-アラキドニルグリセロール(2-AG)の方が有力な候補である。そのなかで、2-AGが15リポキシゲナーゼによって代謝された産物15-HETE-G

(15-hydroxyeicosatetraenoic acid glyceryl ester)がPPAR α リガンドとして働くことが報告された⁷⁾。これらの知見も更に検討していく必要がある。

4. 植物ポリフェノール類

レスベラトロールは赤ワインに含まれる抗酸化作用をもつフィトアレキシン(抗菌性物質)である。レスベラトロールは中等度のワイン消費が心血管病、脳卒中、痴呆の危険度と負の相関を示す、いわゆる‘フレンチパラドックス’に関与する物質と考えられてきた。著者らは最近、①レスベラトロールは核内受容体群のうち、PPAR α およびPPAR γ を選択的に活性化すること、②その活性化は血管内皮細胞およびニューロンで認められること、③レスベラトロールおよびPPAR α リガンドを3日間経口投与後に、24時間脳虚血にすると、脳梗塞の体積がコントロールに比べ有意に減少し、脳保護効果が認められること、④その脳保護効果はPPAR α ノックアウトマウスでは認められないことを明らかにした。これらの結果から、レスベラトロールによるPPAR α の活性化は、‘フレンチパラドックス’を説明する新しい作用機構を提供すると考えている⁸⁾。

一方、以前よりカロリー制限は、ラットで実験的に老化を遅らせ、寿命を延長させることが知られている。そこでカロリー制限の機構を解明し、その効果のみを模倣する薬剤(カロリー制限模倣剤)の開発が行われている。そのスクリーニングの結果、興味深いことにレスベラトロールが見いだされ、酵母の寿命を延ばすことが報告された¹⁰⁾。その効果はNAD⁺依存性脱アセチル化酵素Sirtuinファミリーの活性化に由来すると報告されたが、Sirtuinはヒストンを介して様々な転写調節に関与しており、核内受容体とも相互作用していると考えられる。

これらの結果と先に記したOEAの報告を考慮すると、PPARの活性化は寿命延長効果とも直接関連していると予想される(図3)。最近、DNAチップによる解析で、カロリー制限を行ったネズミと核内受容体PPAR α のアゴニスト

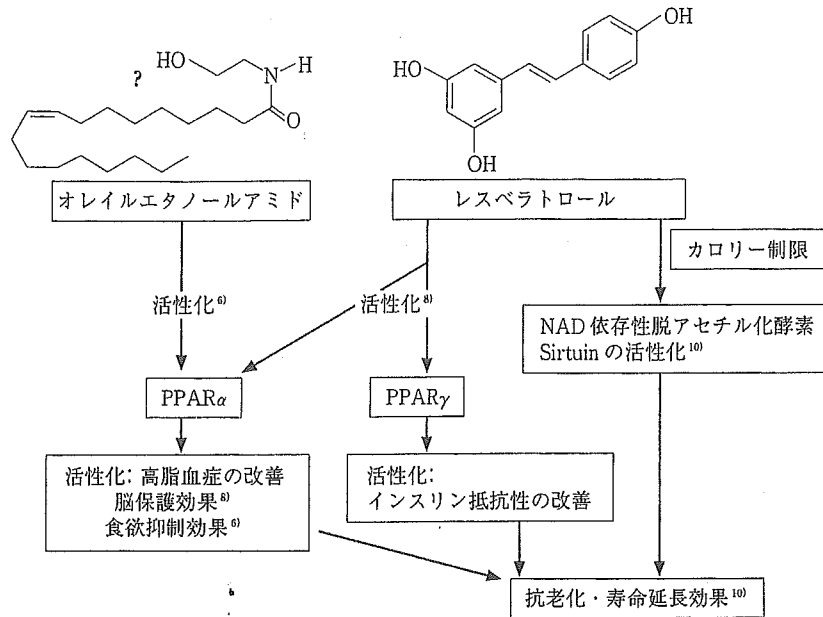


図3 レスベラトロールの作用機構

を投与したネズミではよく似た遺伝子の発現パターンを示し、寿命延長に關与するとの報告がなされた¹⁰⁾。しかし一方で、レスベラトロールで活性化される Sirtuin は PPAR γ の活性化を抑制することで白色脂肪細胞において脂肪代謝を活性化するという報告もなされた¹¹⁾。この結果は、レスベラトロールは PPAR γ も同時に活性化するという著者らの報告とは一致しない。いずれにせよ、レスベラトロールと核内受容体の相互作用は、寿命延長、生活習慣病予防の視点から、今後更に研究が進んでいくと考えられる。もう一方で、レスベラトロールに構造が似てい

る種々のポリフェノールの幾つかについても PPAR γ のリガンドになることがわかってきた。著者らもそれを確認するとともに、それぞれの選択性を現在検討している。最近、リングのポリフェノールが筋力増強、脂肪減少の効果があるとするニュースを知った。これは最近の知見を考慮すると、リングのポリフェノールが PPAR δ を活性化して働いている可能性が考えられる。したがって、植物ポリフェノールは PPAR の新たな内因性リガンド候補として検討していく必要があると考えられる。

■ 文 献

- 1) Evans RM, et al: PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* 10: 355-361, 2004.
- 2) Xu HE, et al: Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13919-13924, 2001.
- 3) Bell-Parikh LC, et al: Biosynthesis of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ and the ligation of PPAR. *J Clin Invest* 112: 945-955, 2003.
- 4) Inoue H, et al: Feedback control of COX-2 expression through PPAR γ . *J Biol Chem* 275: 28028-28032, 2000.
- 5) 井上裕康: 核内受容体 PPAR を介する誘導型シクロオキシゲナーゼの発現調節に関する研究. *ビタミン* 77: 449-458, 2003.
- 6) Fu J, et al: Oleyl ethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear

- receptor PPAR α . Nature 425: 90-93, 2003.
- 7) Kozak KR, et al: 15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonylglycerol. J Biol Chem 277: 23278-23286, 2002.
 - 8) Inoue H, et al: Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires PPAR α in mice. Neurosci Lett 352: 203-206, 2003.
 - 9) Howitz KT, et al: Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. Nature 425: 191-196, 2003.
 - 10) Corton JC, et al: Mimetics of caloric restriction include agonists of lipid-activated nuclear receptors. J Biol Chem 279: 46204-46212, 2004.
 - 11) Picard F, et al: Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. Nature 429: 771-776, 2004.

研究の スポット

「フレンチパラドックス」と 核内受容体PPARとの新しい 接点

井上裕康

奈良女子大学生生活環境学部

「フレンチパラドックス」という言葉は、中等度の赤ワイン消費が心血管病、脳卒中、痴呆の危険度と負の相関を示すことに由来している。赤ワインには、レスベラトロールと呼ばれるフィトアレキシン（抗菌性物質）が含まれており、このレスベラトロールの抗酸化活性が、「フレンチパラドックス」に関与していると考えられてきた。

筆者らは、プロスタグランジン産生の律速酵素である誘導型シクロオキシゲナーゼ（COX-2）の発現制御について、種々の疾患における役割を視野に入れて10年以上研究を続けている。その共同研究の中で、レスベラトロールが①COX-2の酵素活性や発現誘導を阻害すること、②核内受容体PPAR (peroxisome proliferators activated receptor) α とPPAR γ を選択的に活性化すること、さらに③PPAR α ノックアウトマウスを用いた脳虚血モデル実験において、レスベラトロールの経口投与がPPAR α を介して脳保護効果をもつことを見いだした⁽¹⁾。これらの知見から、「フレンチパラドックス」の新しい分子作用機構としてシクロオキシゲナーゼ（COX）経路とともにPPARが中心的な役割を演じていると仮説を立て、現在研究を進めている。一方、レスベラト

ロールが寿命延長効果をもつカロリー制限模倣物質であること⁽²⁾、PPAR α の新しい内因性リガンド候補として見いだされたオレイルエタノールアミドがPPAR α 活性化によって食欲をコントロールすること⁽³⁾が、筆者らの報告とほぼ同時期に報告され、PPAR活性化→カロリー制限→長寿効果につながっていく可能性が出てきた。本稿では、その背景、経緯、展望について紹介したい。なお、レスベラトロールに関する最近の動向については総説^(4,5)を参照していただきたい。

シクロオキシゲナーゼ経路と核内受容体との関係

COXはプロスタグランジン（PG）産生の律速酵素で、アラキドン酸を基質にしてPGH₂を生成する反応を触媒する。非ステロイド性抗炎症薬の作用はCOX活性の阻害によるPG産生抑制を介している。COXには構成型発現を示すCOX-1と誘導型COX-2の2種類のアイソザイムが存在する。COX-2の発現は炎症性刺激で迅速に誘導され、かつ抗炎症性ステロイド剤である合成グルココルチコイド・デキサメタゾン（DEX）によって抑制されることから、炎症反応への関与が想定されてい

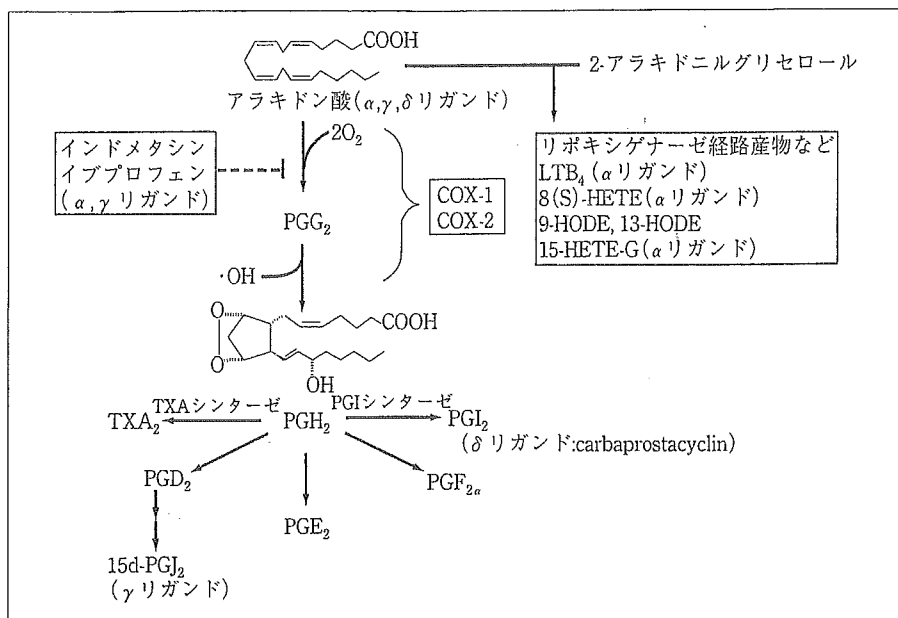


図1 ■ シクロオキシゲナーゼ経路と PPAR リガンド

プロスタグランジン産生系などアラキドン酸代謝物、およびその阻害剤の中に、PPARのリガンドとして働くものがいくつか報告されている。ただし、これらはPPARに対する結合能で検出され、高濃度のみ働くものも多い。したがって、これらが実際に生体内でPPARを介して機能しているかどうかはさらに検討が必要である。

る。実際、最近開発された COX-2 選択的阻害剤は COX-1 活性阻害に由来する副作用が少ない抗炎症薬として注目されている。さらに、COX-2 ノックアウトマウスの解析や最近の臨床、疫学調査を含む研究などから、COX-2 が発癌、アルツハイマー病、循環器系疾患にも関与し、様々な役割を担っていることが次第に明らかになってきた⁽⁶⁾。

グルココルチコイドや活性型ビタミン D などは生理活性をもつ脂溶性物質であり、これらをリガンドとする核内受容体群は、その構造上の相同性によってファミリーを形成している。PPARはこの核内受容体ファミリーに属するリガンド依存性転写因子である⁽⁶⁾。PPARには現在3種類のサブタイプ α , γ , $\delta(\beta)$ が知られている。PPAR α は主に肝臓、腎臓に、PPAR γ は主に脂肪細胞、マクロファージに、PPAR δ は様々な組織に発現している。PPAR α に対する合成リガンド・フィブレート系誘導体は高脂血症治療薬として、PPAR γ に対する合成リガンド・チアゾリジン系誘導体はインスリン抵抗性改善薬として知られており、PPARは生活習慣病改善薬の標的分子として現在注目を集めている。PPAR γ の内因性リガンドは未だ不明であるが、その候補として PGD₂ の代謝産物 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ₂ (15d-PGJ₂) が報告された。また、アラキドン酸をはじめとする脂肪酸やその代謝産物、非ステロイド性抗炎症薬なども PPAR のリガンドとして働く可能性が指摘され、食生活とも密接に関わる核内受容体であることがわかってきた。図1に COX 経路およびリポキシゲナーゼ経路で PPAR のリガンドとして働く可能性があるものを示す。注目すべき点とし

て、PPAR が関与していると考えられる生体内での役割は、前述した COX-2 が関与する役割と重複している。

細胞の種類によって異なる COX-2 の発現調節

循環器系においては、プロスタサイクリン (PGI₂) とそれに拮抗する作用をもつトロンボキサン (TXA₂) の産生のバランスがホメオスターシスに重要であり、そのバランスの破綻は動脈硬化症をはじめとする様々な病態と関連している。PGI₂ は主に血管内皮細胞で、一方 TXA₂ は血小板や活性化マクロファージで産生されるが、血小板以外の細胞では COX-2 の発現が種々の刺激により誘導され、それぞれの PG 類産生に寄与している。筆者らはその視点から、PGI₂ を産生する培養血管内皮細胞と TXA₂, PGE₂ を産生するマクロファージ系 U937 細胞での COX-2 発現の相違に注目して研究を進めてきた。その結果、①COX-2 遺伝子のプロモーター領域に存在する転写因子結合配列のうち、cAMP 応答エレメント (CRE), NF-IL6 および NF- κ B 結合配列が COX-2 の転写調節に関与していること、②これらのシスエレメントに、種々の転写因子が作用すること、③これら転写因子は細胞種、刺激剤、時間などによって異なった組み合わせで作用することを明らかにしてきた (図2)。

注目すべき点として、COX-2 の発現に対する DEX 作用の相違がある。DEX による COX-2 発現抑制は上記に示した U937 細胞など、種々の細胞で報告されているが、血管内皮細胞において COX-2 の発現は DEX でほとんど抑制されない。この血管内皮細胞における DEX 非

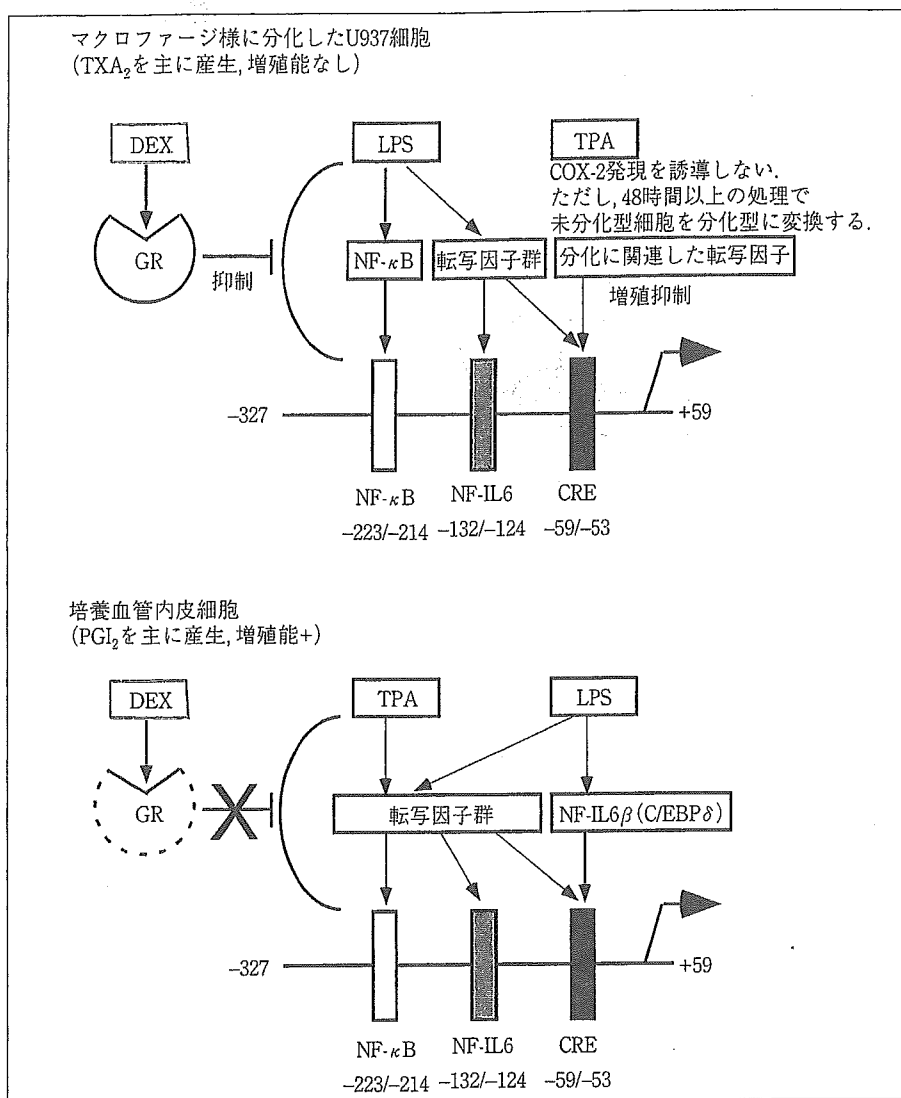


図2 ■ マクロファージ系細胞と血管内皮細胞でのCOX-2遺伝子転写調節の比較

TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (発がんプロモーターの一種)

感受性について検討した結果、ウシ動脈由来血管内皮細胞 (BAEC) では U937 細胞に比べると、グルココルチコイド受容体 (GR) の発現が非常に低いことがわかった。そこで、GR 発現ベクターを BAEC に導入したところ、DEX の濃度および導入する GR 発現ベクター量に依存して COX-2 プロモーター活性が抑制された。したがって、BAEC における GR の低い発現レベルが DEX 非感受性に参与していると結論した⁽⁸⁾。さらに DEX は、転写レベル以外に、転写後の段階でも働き、COX-2 遺伝子の 3' 非翻訳領域が GR を介して転写後調節に参与していることが示唆された⁽⁹⁾。一方で筆者らは、血管内皮細胞において、静脈血程度の弱い流れ刺激 (シェアストレス) で COX-2 が誘導され、PGI₂ 産生に参与することを明らかにした⁽¹⁰⁾。これらの知見から、生体の血管内皮細胞では流れ刺激によって COX-2 が構成的に発現し、PGI₂ 産生に参与していると考えられる。最近、COX-2

選択的阻害薬投与によって心筋梗塞や脳卒中中の危険度が増加することが指摘されているが、COX-2 を介する PGI₂ 産生が関与している可能性が示唆される。

マクロファージにおける PPAR_γ による COX-2 発現のフィードバック制御⁽¹¹⁾

筆者らは、DEX の場合と同様、PPAR_γ 内因性リガンド候補 15d-PGJ₂ によって COX-2 の発現が U937 細胞では抑制されるが、血管内皮細胞では抑制されないことを見いだした。さらに、血管内皮細胞では PPAR_γ の発現がほとんど認められないこと、血管内皮細胞に PPAR_γ 発現ベクターを導入すると、15d-PGJ₂ による COX-2 プロモーター活性が抑制されることを見いだした。一方、U937 細胞では PPAR_γ mRNA の顕著な発現が観察されるが、LPS (リポ多糖) 刺激で迅速に抑制された。この PPAR_γ の発現とは対照的に、GR は LPS 刺激で誘導さ

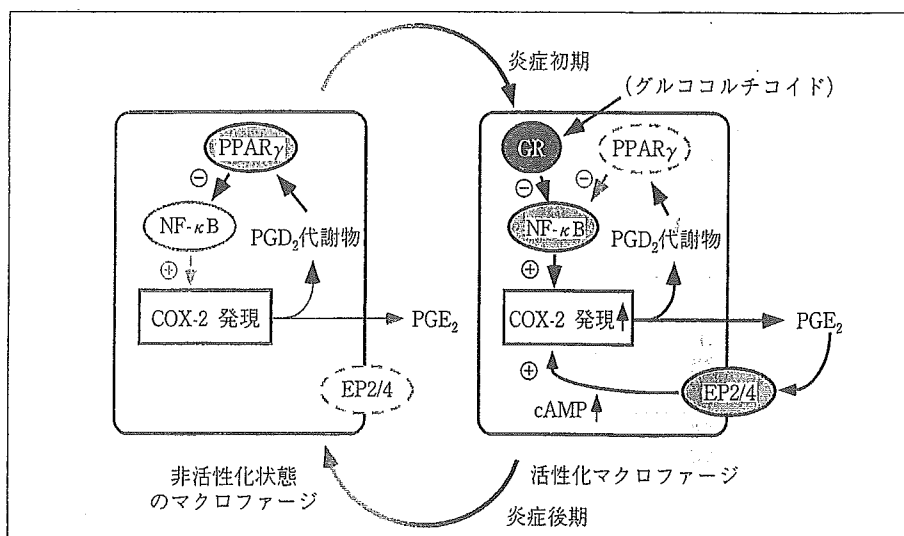


図3 ■ PPAR γ による COX-2 の発現制御

れた。U937 細胞において、100 nM DEX では COX-2 の発現が 90% 以上抑制されるのに対し、10 μ M 15d-PGJ₂ では 60% 程度の抑制しか観察されない。この DEX と 15d-PGJ₂ の COX-2 発現抑制効果の相違は、核内受容体 GR と PPAR γ の発現変動が関与していると考えられ、GR と PPAR γ はマクロファージにおける COX-2 の発現、ひいては PG 産生に関して異なる役割をもつと考えられる。

つまり、LPS 刺激により COX-2 が誘導され、多量の PG が産生された状態（これは活性化マクロファージの状態と想定される）において、GR の発現上昇によってグルココルチコイドに対する COX-2 の発現抑制感受性が上がることが示唆される。GR とは対照的に、PPAR γ は LPS 刺激で抑制されるため 15d-PGJ₂ に対する感受性は低下する。一方、活性化マクロファージになる前の非活性化状態では、15d-PGJ₂ が COX-2 の発現を抑制していると考えられる。さらに、U937 細胞では 15d-PGJ₂ の前駆体となる PGD₂ が COX-2 に依存して産生されること、PGD₂ 産生に関わる PGD 合成酵素が発現していることを見いだしたので、マクロファージで合成された PGD₂ 代謝産物が PPAR γ のリガンドとして作用することによって COX-2 発現は負のフィードバック制御を受けることが示唆された（図3）。

一方、活性化状態になり PPAR γ によるフィードバック制御から開放された COX-2 の発現は PGE₂ の産生を促し、それがマクロファージ系細胞で発現する細胞膜型受容体 EP2 あるいは EP4 に働き、細胞内 cAMP 濃度を上昇させ、COX-2 の発現を増強すると予想される。この予想に関連して、COX-2 と同様、炎症性刺激で誘導さ

れ、DEX で抑制される性質を有し、COX-2 の下流で PGE₂ 産生に関わる膜結合型 PGE 合成酵素が発見された。

以上、時間により異なる種類の PG 産生が核内受容体と細胞膜型受容体へ異なる情報を伝達することで、マクロファージにおけるダイナミックな PG 産生を可能にしていると考えられる。ただ、この制御機構についての理解は未だ不完全で、相反する知見も報告されている。しかし、少なくとも COX-2 と PPAR γ が逆の発現パターンを示すことが多数報告されており、この制御機構の検証を今後も進めていきたいと考えている。

■ レスベラトロール：COX-2 阻害剤かつ PPAR α および γ の選択的デュアルアゴニスト

発癌と PG との関わりについては以下のような報告がある。①疫学的調査の結果、リウマチ患者などでアスピリンを長期間常用している患者は大腸がんによる死亡率が 40~50% 低いこと、②種々の化学発癌物質を用いたマウスでの発癌実験において、アスピリンなど非ステロイド性抗炎症薬は有意に癌の発生を抑制すること、③ヒト家族性大腸腺腫症モデルマウスにおいて、COX-2 の活性を抑制すると、腺腫の大きさと数が有意に減少することなどである。一方、レスベラトロールはマウス皮膚癌モデルで発癌抑制効果を示す⁽¹²⁾。

このように、癌の研究者が COX-2 に興味をもつようになってきた。筆者らはコーネル大学 Dannenberg 博士との共同研究の結果、レスベラトロールが癌細胞において COX-2 の活性および発現を抑制することを見いだした⁽¹³⁾。そこで、種々の細胞でレスベラトロールの効果

をさらに検討した結果、COX-2の発現の様相が細胞の種類によって異なっていることを見いだした(未発表)。したがって、DEXや15d-PGJ₂と同様に、レスベラトロールがある種の核内受容体リガンドとして作用しているのではないかという新しい着想を得た。

そこで、核内受容体の専門家である故梅園和彦博士(京都大学ウイルス研究所)、脳卒中の専門家である名村尚武博士(当時・国立循環器病センター、現Morehouse医学校神経科学研究所)と共同研究を行ない、①レスベラトロールは核内受容体群のうち、PPAR α およびPPAR γ を選択的に活性化すること、②その活性化は血管内皮細胞およびニューロンで認められること、③レスベラトロールおよびPPAR α リガンドを3日間経口投与後に24時間脳虚血にすると、脳梗塞の体積が対照と比べて有意に減少し、脳保護効果が認められること、④その脳保護効果はPPAR α ノックアウトマウスでは認められないことを明らかにした。これらの結果から、レスベラトロールによるPPAR α の活性化は、「フレンチパラドックス」を説明する新しい作用機構であり、PPAR α が脳卒中に対する薬剤の新しい分子標的になることが示唆された⁽¹⁾。

現在、PPARの活性化は脳保護効果以外にも生活習慣病に関連する種々の病態を改善することが報告されており、レスベラトロールの効果も広く生活習慣病予防に関与すると考えられる。しかし、その分子作用機構については不明な部分が多いので、現在、PPAR活性化の下流で働く分子群の同定とともに検討を進めている。

■ 展望：カロリー制限、寿命延長効果、核内受容体、COX経路との関係

以前より、カロリー制限は、ラットで実験的に老化を遅らせ、寿命を延長させることが知られている。そこでカロリー制限の機構を解明し、その効果のみを模倣する薬剤(カロリー制限模倣剤)の開発が行なわれている。上記の筆者らの報告と同じ2003年に、レスベラトロールがそのような作用をもち、酵母の寿命をのばすことが報告された⁽²⁾。その効果はNAD⁺依存性脱アセチル化酵素Sirtuinファミリーの活性化に由来すると報告されたが、Sirtuinはヒストンを介して様々な転写調節に関与しており、核内受容体とも相互作用していると考えられる。

さらに同じ2003年に、オレイルエタノールアミド(OEA)が核内受容体PPAR α の活性化を介して食欲と体重をコントロールすることが報告された⁽³⁾。アラキドンのエタノールアミドであるアナンダミドはG蛋白

質共役型受容体であるカンナビノイド受容体を介して、多幸福感など、マリファナ様の作用を発揮することが知られている。そこで、オレイン酸のエタノールアミドであるOEAについてもカンナビノイド受容体に作用することが予想されたが、そのような作用は見いだされなかった。そしてOEAはPPAR α に高い親和性をもち(EC₅₀=10 nM)、オレイン酸に対する親和性の1,000倍と報告された。一方、OEAはPPAR δ に対しても親和性をもつが(EC₅₀=1.1 μ M)、PPAR γ には親和性をもたない。さらに、①OEAはPPAR α の活性化を介して、脂質代謝に関わる蛋白質の転写を高め、摂食刺激に關与するNO合成酵素の誘導を抑制すること、②自由に摂食させているマウスの小腸を時間差で調べると、餌を食べる夜間はOEA濃度が低く、逆に満腹で休んでいる日中はOEA濃度が高いことが報告され、OEAがPPAR α の活性化を介して食欲の調節をしていることが提唱された。

筆者らもその追試実験を行なったが、筆者らの系ではOEAのPPAR α 活性化能は見いだされていない。その理由として、①PPARに対する反応性に細胞特異的な機構が働いている可能性や、②報告された実験系では安定な遺伝子導入系を用いており、通常使われている一過性の遺伝子導入系とは異なっている可能性などが考えられる。魅力的な仮説であるので、今後さらに検証していく必要がある。

一方、前述のカンナビノイド受容体の内因性リガンドとしては、アナンダミドよりも2-アラキドニルグリセロール(2-AG)のほうが有力な候補である。すなわち、2-AGの15-リポキシゲナーゼによる代謝産物である15-HETE-G(15-hydroxyeicosatetraenoic acid glyceryl ester)がPPAR α リガンドとして働くことが報告された。これらの知見も含めて、さらに検討していく必要がある。

以上述べてきた事実は、筆者らが報告し、提唱しているPPARを介するレスベラトロールの生活習慣病予防と直接関連していると考えられる。図4にその概略を示す。最近、DNAチップによる解析で、カロリー制限を行なったネズミと核内受容体PPAR α のアゴニストを投与したネズミではよく似た遺伝子の発現パターンを示し、PPAR α が寿命延長に關与する可能性が報告されたが⁽¹⁴⁾、筆者らも同様の結果を得ている(投稿準備中)。しかし一方で、レスベラトロールで活性化されるSirtuinはPPAR γ の活性化を抑制することで白色脂肪細胞において脂肪代謝を活性化するという報告もある⁽¹⁵⁾。この結果は、レスベラトロールがPPAR γ も同時に活性化するという筆者らの結果とは一致しない。一方、共同研究の

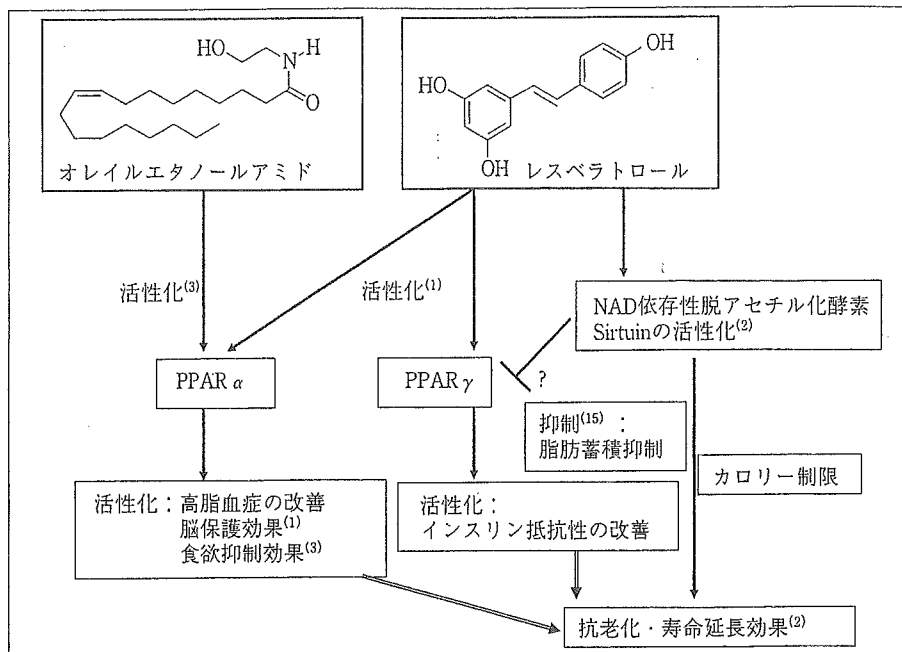


図4 ■ レスベラトロールの作用機構

結果, γ -Mangostin や Chrysin などが COX-2 の発現を抑制することもわかってきた。したがって, レスベラトロールにとどまらず, 食品に含まれるその他のポリフェノール類と核内受容体や COX 経路との相互作用は, 寿命延長, 生活習慣病予防の視点から, 今後さらに研究が進んでいくと考えられる。

文献

- 1) H. Inoue, X. Jiang, T. Katayama, S. Osada, K. Umesono & S. Namura : *Neurosci. Lett.*, **352**, 203 (2003).
- 2) K. T. Howitz, K. J. Bitterman, H. Y. Cohen, D. W. Lamming, S. Lavu, J. G. Wood, R. E. Zipkin, P. Chung, A. Kisielewski, L. L. Zhang, B. Scherer & D. A. Sinclair : *Nature*, **425**, 191 (2003).
- 3) J. Fu, S. Gaetani, F. Oveisi, J. Lo Verme, A. Serrano, F. Rodriguez De Fonseca, A. Rosengarth, H. Luecke, B. Di Giacomo, G. Tarzia & D. Piomelli : *Nature*, **425**, 90 (2003).
- 4) C. A. de la Lastra & I. Villegas : *Mol. Nutr. Food. Res.*, **49**, 405 (2005).
- 5) 松岡厚子 : *FFI Journal*, **200**, 12 (2002).
- 6) 室田誠逸, 山本尚三編 : “プロスタグランジン研究の新展開”, 東京化学同人, 2001, p. 3.
- 7) D. J. Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg B. P. Kastner, M. Mark, P. Chambon & R. M. Evans : *Cell*, **83**, 835 (1995).
- 8) H. Inoue, K. Umesono, T. Nishimori, Y. Hirata & T. Tanabe : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **254**, 292 (1999).
- 9) T. Nishimori, H. Inoue & Y. Hirata : *Life Sci.*, **74**, 2505 (2004).
- 10) H. Inoue, Y. Taba, Y. Miwa, C. Yokota, M. Miyagi & T. Sasaguri : *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**, 1415 (2002).
- 11) H. Inoue, K. Umesono & T. Tanabe : *J. Biol. Chem.*, **275**,

28028, (2000).

- 12) M. Jang, L. Cai, G. O. Udeani, K. V. Slowing, C. F. Thomas, C. W. Beecher, H. H. Fong, N. R. Farnsworth, A. D. Kinghorn, R. G. Mehta, R. C. Moon & J. M. Pezzuto : *Science*, **275**, 218 (1997).
- 13) K. Subbaramaiah, W. J. Chung, P. Michaluart, N. Te-lang, T. Tanabe, H. Inoue, M. Jang, J. M. Pezzuto & A. J. Dannenberg : *J. Biol. Chem.*, **273**, 21875 (1998).
- 14) J. C. Corton *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **279**, 46204 (2004).
- 15) F. Picard *et al.* : *Nature*, **429**, 771 (2004).

くらしの中の化学と生物

日本農芸化学会 編
四版刊・並装・平均230頁

- 1 **今話題のくすり** 開発の背景と薬効
岩村 徹・荻野重男・松本和男・山田靖宙 編/定価1680円
- 2 **お酒のはなし** 酒はいきもの
塚越規弘・栗山一秀・井上 喬 編/定価1631円
- 3 **ヒット食品開発の発想と技術**
五十嵐脩・上野川修一 編/定価1680円
- 4 **世界を制覇した植物たち** 神が与えたスーパーファミ
リー ソラナム
大山莞爾・天知輝夫・坂崎 潮 編/定価1890円
- 5 **ヒット化粧品** 美を創る技術を解き明かす
岩村 徹・大場健吉・田中宗男・田原定明・梶田文八 編/
定価1890円
- 6 **何を食べたらよいのか** 沼澤する情報にふりまわされないために
杉本悦郎・伏木 亨・野口 忠・垣沼淳司・桐山修八 編/
定価1680円
- 7 **遺伝子組換え食品** 新しい食材の科学
大澤勝次・田中寿司 編/定価1890円
- 8 **人に役立つ微生物のはなし**
羽柴輝良 編/定価1890円

学会出版センター

心血管疾患における細胞-遺伝子ハイブリッド治療

国立循環器病センター研究所心臓生理部 みやほらよしのり 宮原義典, もり 盛 英三
ひでぞう
 国立循環器病センター研究所再生医療部 ながやのりとし 永谷憲歳

はじめに

1980年代より遺伝性疾患を皮切りに、悪性腫瘍、自己免疫疾患などに対して遺伝子治療の臨床応用が開始され、現在では欠損遺伝子や変異遺伝子を補充する治療法から、生体の治癒力を補う目的の治療にも拡大施行されている。循環器疾患における遺伝子治療は、1994年に米国のタフツ大学で VEGF（血管内皮細胞増殖因子）遺伝子の虚血肢への血管内投与という形で行われ、血管再生効果が確認された¹⁾。以後、循環障害に対する遺伝子治療の臨床応用が多くの施設で行われている。

また、日本では1997年に臓器移植法が施行され、心臓、肺などの脳死臓器移植が可能となったが、ドナー不足のためにこれまで二十数例が施行されるにとどまっている。末期の臓器不全に対して何らかの代替治療が必要とされている中で、体性幹細胞移植や tissue-engineering などの再生医療が注目を集めている。当施設では、2004年より既存の治療に抵抗性の重症拡張型心筋症および虚血性心筋症の患者に対して、間葉系幹細胞移植の臨床研究を開始している。

われわれはこの遺伝子治療と細胞移植治療をハイブリッドし、基底 (base) となる機能細胞に補完的機能をもつ遺伝子を導入するという遺伝子-細胞ハイブリッド治療を考案した。遺伝子を格子

構造を有する生分解性ゼラチンに取り込ませ、このゼラチン-遺伝子複合体を貪食能を有する細胞に導入させる方法である。われわれは正常な血管床の再生という点に主眼を置き、細胞-遺伝子ハイブリッド治療を原発性肺高血圧症に応用した。

本稿では、ゼラチンを用いた遺伝子導入法、ゼラチン-遺伝子複合体、肺高血圧症に対する細胞-遺伝子ハイブリッド治療の研究成果について概説する。

ゼラチンを用いた遺伝子導入法

従来用いられてきた代表的な遺伝子導入法として、プラスミド DNA そのものを組織に投与する方法、アデノウイルスやレトロウイルスなどのウイルスベクターを用いる方法などがあげられる。しかし、プラスミド DNA の直接投与では組織内で拡散・希釈され、細胞核内に到達する前に核酸分解酵素により分解されてしまうため、有効な治療効果を得るには大量の遺伝子を準備する必要がある。また、ウイルスベクター法は導入効率の良いものの、ウイルス蛋白の抗原性、ウイルスの突然変異の懸念など、安全性に重大な問題がある。われわれが考案した細胞-遺伝子ハイブリッド化は、*ex vivo* でウイルスベクターを用いることなく細胞への遺伝子導入が高効率に行える次世代の

[Key words] 細胞-遺伝子ハイブリッド治療, 血管新生, 肺高血圧症

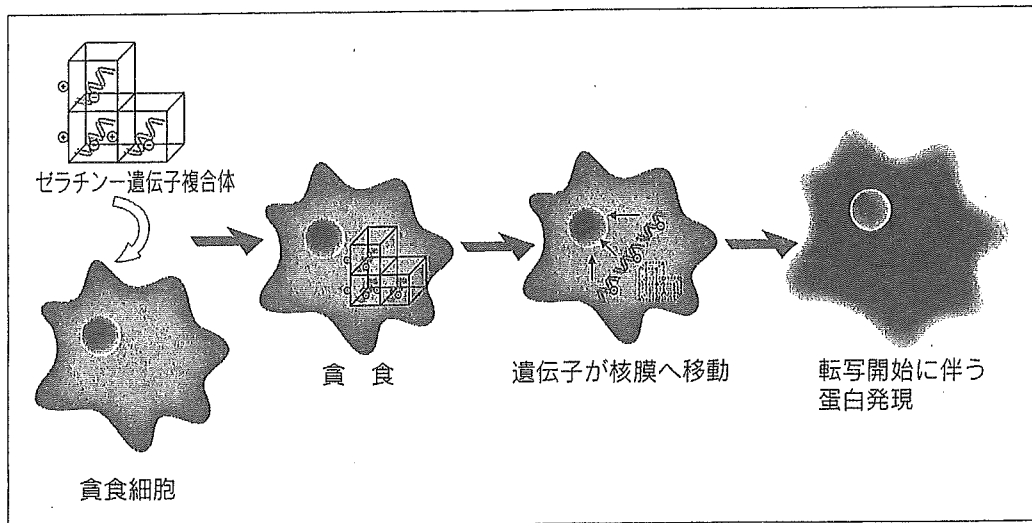


図1 ゼラチンを用いた遺伝子導入の概念図

貪食細胞がゼラチン-遺伝子複合体を取り込んだ後、ゼラチンは細胞内で分解され、封入されていた遺伝子が核膜へ向かい、蛋白発現に向けたプロセスが開始される。

遺伝子導入法である(図1)。このハイブリッド化を実現する鍵となる物質が生分解性ゼラチンである。

ブタの皮膚から抽出したゼラチンをグルタルアルデヒドの架橋反応により格子構造とし、エチレンジアミンを加えると正帯電ゼラチンが完成する²⁾。この正帯電ゼラチンの特徴として、

- ① 陽性に帯電しているため、陰性に帯電しているDNAや蛋白質と数時間接触することにより容易にイオン結合し、電気的複合体を形成する。
- ② 構造が3次元格子状なので、結合物質をゲル内部に保護することにより、分解酵素の影響を受けにくくする。
- ③ 生体内で徐々に分解を受けて、この分解に伴い結合物質を徐々に放出する。
- ④ その分解速度はゼラチンの架橋度を変えることにより自由に調節できる。
- ⑤ ゼラチン-遺伝子複合体は貪食細胞(単球、マクロファージなど)に容易に貪食される。
- ⑥ 貪食細胞内で高率に遺伝子を発現する。

などがあげられる。

われわれはゼラチンを、その構造や表面電荷を自由に変えることが容易である性質から遺伝子の

担体として利用することを着想した。遺伝子をあらかじめゼラチンの格子構造内へ封入してゼラチン-遺伝子複合体を形成し、生体内へ投与することで核酸分解酵素による遺伝子の分解・代謝が緩徐となり、結果として安全かつ高効率に遺伝子を導入することができると考えられる。実際に遺伝子をゼラチンと結合させて投与したところ、生体内における遺伝子の残存期間を延長させることに成功し、遺伝子の発現率も従来の遺伝子単独投与と比較して約10倍の増加が認められた³⁾。

ゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体による血管新生療法

血管内皮細胞から産生されるアドレノメデュリンは、生体内で最も強い血管拡張作用を示すペプチドであり⁴⁾、血管新生促進や抗アポトーシス作用などの多様な生理活性を併せもつ。われわれは家兎下肢虚血モデルを用いてゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体の治療効果を検討した⁵⁾。大腿動脈摘除後10日目に大腿筋肉内にアドレノメデュリン遺伝子そのもの、およびゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体を投与した群を作製し、4週間後に下腿血圧、組織血流量および組

織内の毛細血管密度を調べた。いずれの治療もコントロール群と比較して著明な血管新生および血流改善効果を認めたが、ゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体投与群が有意に勝っており(図2a, b, c), 血管造影でもより多くの再生血管が描出された(図2d)。また、筋肉組織中のアドレノメデュリン濃度は投与後2週間にわたって遺伝子単独投与群よりも高値を示した(図2e)。この事実により、アドレノメデュリン遺伝子をゼラチン内に封入して投与することで、遺伝子が虚血組織内で長期にわたり高濃度に維持され、徐放されながら遺伝子導入を果たし、より効果的な血管新生の発現が得られたと考えられる。

ゼラチンを介した細胞-遺伝子ハイブリッド治療

遺伝子または調節因子の投与のみでは代謝による影響があり、必要とされる場所への有効量の到達の面で限界がある。この問題を解決するために1991年に細胞を遺伝子発現の基地として用いるcell-basedの遺伝子治療がPlautzらによって始められた⁶⁾。これをさらに発展させた細胞-遺伝子ハイブリッド治療は、貪食能をもつ機能細胞にゼラチン-遺伝子複合体を取り込ませて遺伝子導入を行う。つまり、細胞が遺伝子発現の基地としてだけでなく、治療要素としての働きをももつことになる。細胞移植の観点から言い換えれば、移植細胞の機能強化のために遺伝子治療を併用した治療法といえる。細胞-遺伝子ハイブリッド治療は、ベクターにウイルスを使用せず、ゼラチンを用いることで安全性と効率の高い遺伝子導入を実現する。また、移植したマクロファージや単球などの貪食細胞が自身の走化性によって障害部位に特異的に集まるため、標的組織へ凝集したこれらの細胞が導入された遺伝子をもとにタンパク質を合成し、より高い治療効果を上げると考えられる。

血管内皮前駆細胞を用いた原発性肺高血圧に対する細胞-遺伝子ハイブリッド治療

1997年Asaharaらは、血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cells: EPCs)が生体内で虚血や血管内皮障害が起こったときに骨髄から末梢血中に動員され、障害部位に遊走・付着し、血管内皮細胞に分化して血管を形成することを明らかにした^{7,8)}。また、われわれはEPCsがマクロファージのような貪食能を有し、ゼラチン-遺伝子複合体を貪食することを発見した⁹⁾。EPCsの移植は虚血性心疾患、閉塞性動脈硬化症の治療に有効であることが報告されており^{10,11)}、この効果は、①EPCs自身が血管形成に加わること、②EPCsがVEGFなどの血管新生因子を放出して局所の血管新生を促すためと考えられる。

原発性肺高血圧症の病態は、血管内皮細胞の機能障害およびそれに基づく血管作動物質の不均衡であると考えられている(図3)。われわれは、肺血管床で強力な拡張因子として働くアドレノメデュリンを血管内投与することで、平均肺動脈圧を低下させることができることを示してきた¹²⁾。アドレノメデュリンの特異的受容体は、体血管よりもむしろ肺血管に多数存在し¹³⁾、血管平滑筋の受容体に直接作用してcAMPを増加させたり、血管内皮細胞に働き一酸化窒素を介して血管拡張を引き起こす¹⁴⁾。故に、原発性肺高血圧症は細胞-遺伝子ハイブリッド治療が適している疾患と考えられた。

まず、アドレノメデュリン遺伝子をゼラチンに封入して*ex vivo*にてEPCsに取り込ませた(図4a, b, c)。このEPCsの貪食による遺伝子導入は、ウイルスベクターを用いずにEPCs自身への50~70%という高効率の遺伝子導入を可能にした。近年アドレノメデュリンはPI3K-Akt経路を活性化することで血管内皮細胞の生存、遊走、増殖に関与することがわかり、アドレノメデュリン遺伝子を導入することでEPCs自身のアポトーシス抑制、増殖促進の効果も得られることが明らか

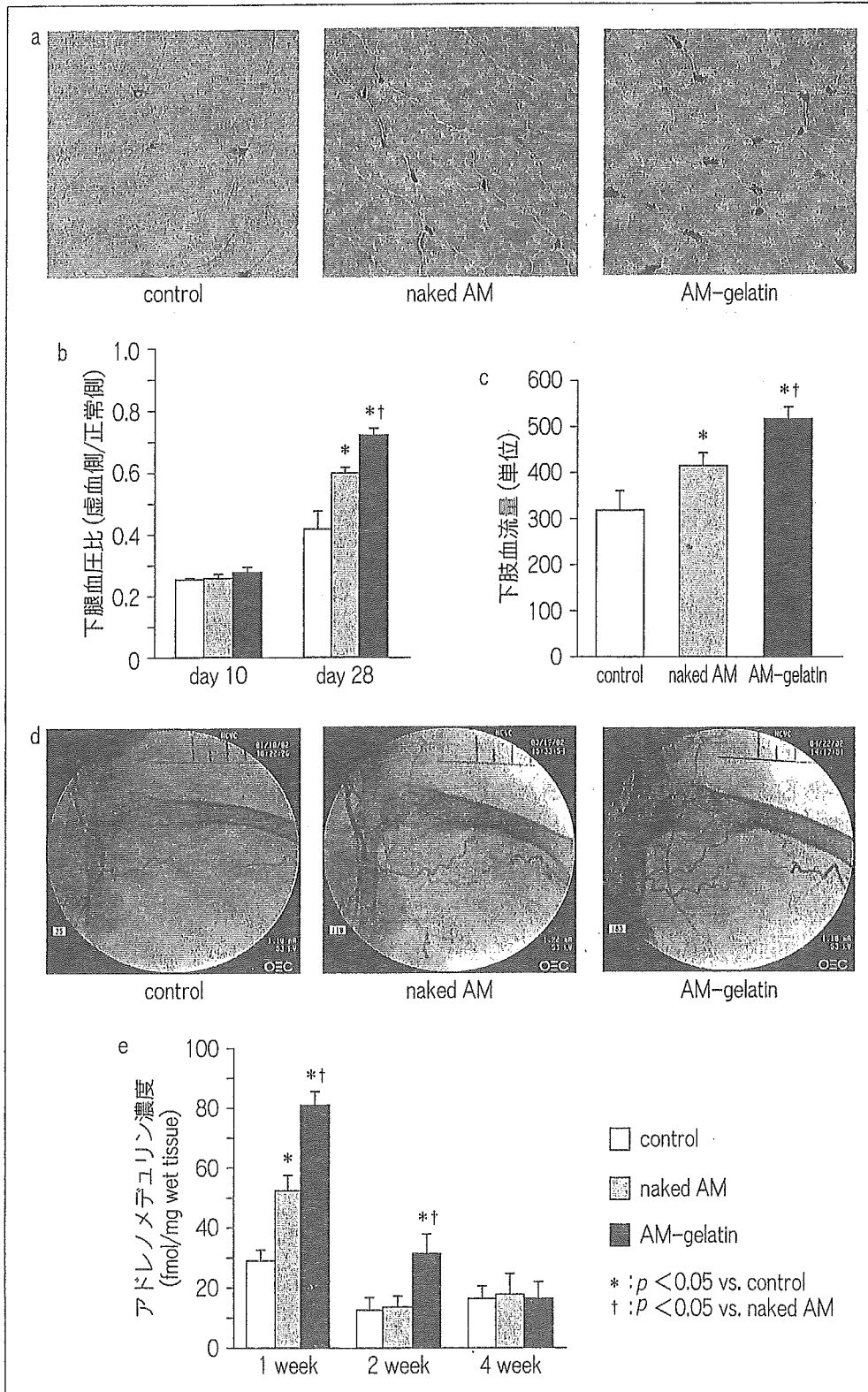


図2 ゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体の血管新生効果

naked AM : アドレノメデュリン遺伝子単独投与群, AM-gelatin : ゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体投与群

a : 虚血側大腿筋のアルカリホスファターゼ染色による毛細血管密度の比較 (×200).

b, c : 下腿血圧および下腿血流量は複合体投与群が有意に勝っていた。

d : 血管造影検査による再生血管の描出。

e : 治療後の筋肉組織内アドレノメデュリン濃度の経時的推移。

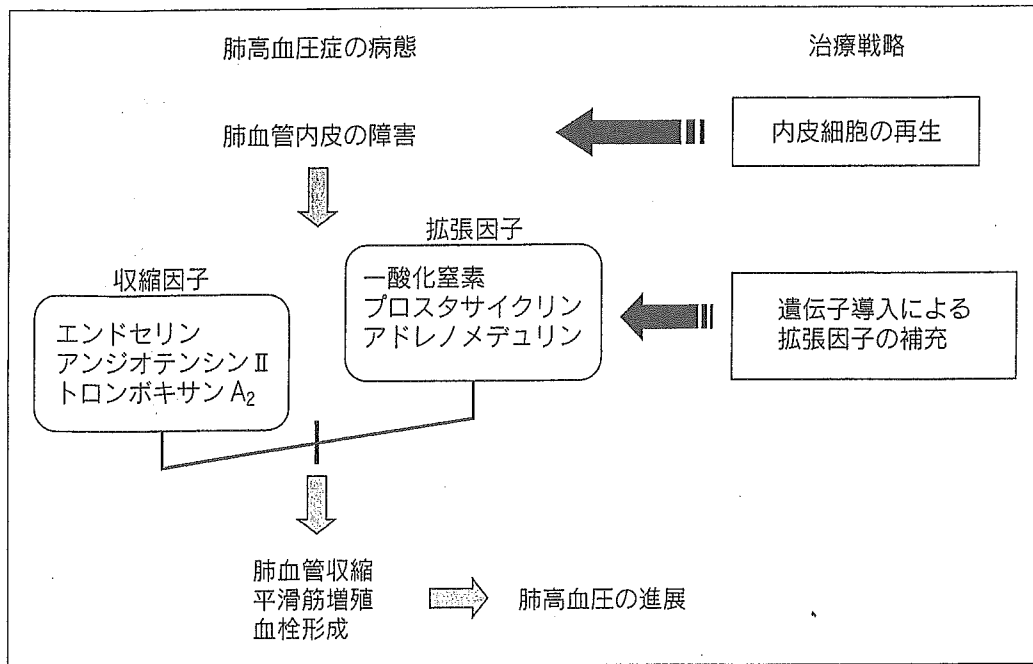


図3 肺高血圧症の病態に基づいた細胞-遺伝子ハイブリッド治療の戦略

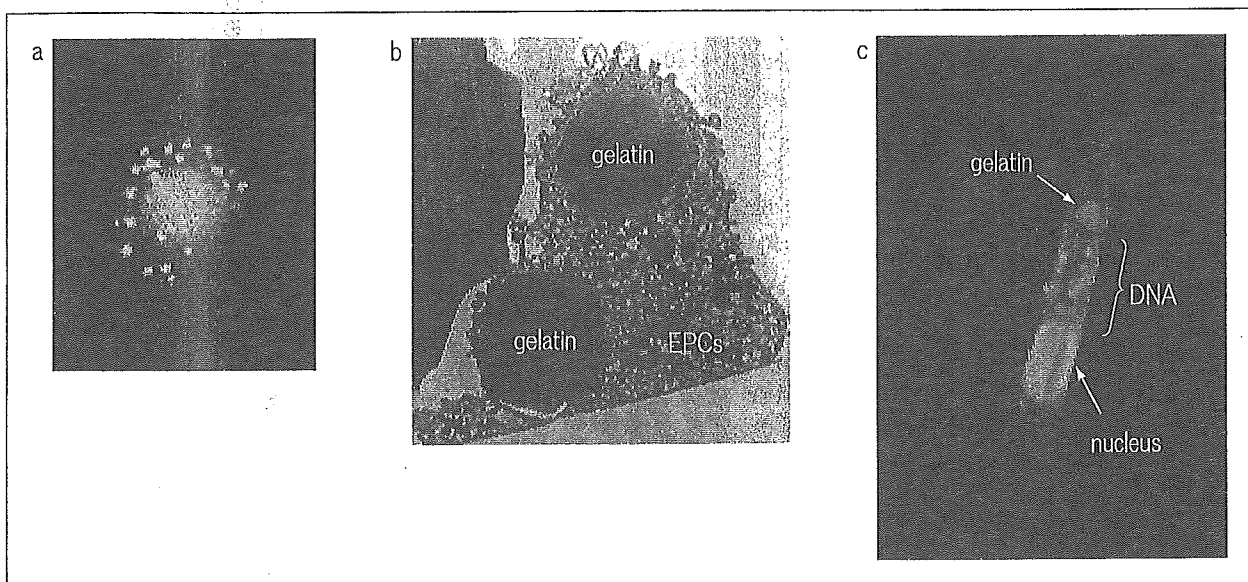


図4 ゼラチンを用いたEPCsへの遺伝子導入

- a: ゼラチンに封入されたアドレノメデュリン遺伝 (RITC-labeled)
 b: ゼラチンを貪食した血管内皮前駆細胞
 c: ゼラチンから細胞核に向かってDNAが放出される様子.

かになった。

モノクロタリン投与にて作製したラット肺高血圧モデルにアドレノメデュリン遺伝子を導入したEPCsを経静脈的に投与し、3週間後に肺高血圧

の軽減効果を検討した⁹⁾。EPCsは肺細動脈と間質に付着し、成熟した血管内皮細胞として血管を形成したが(図5a, b), EPCs単独投与では肺動脈の有意な低下には至らず、肺血管抵抗のわずか

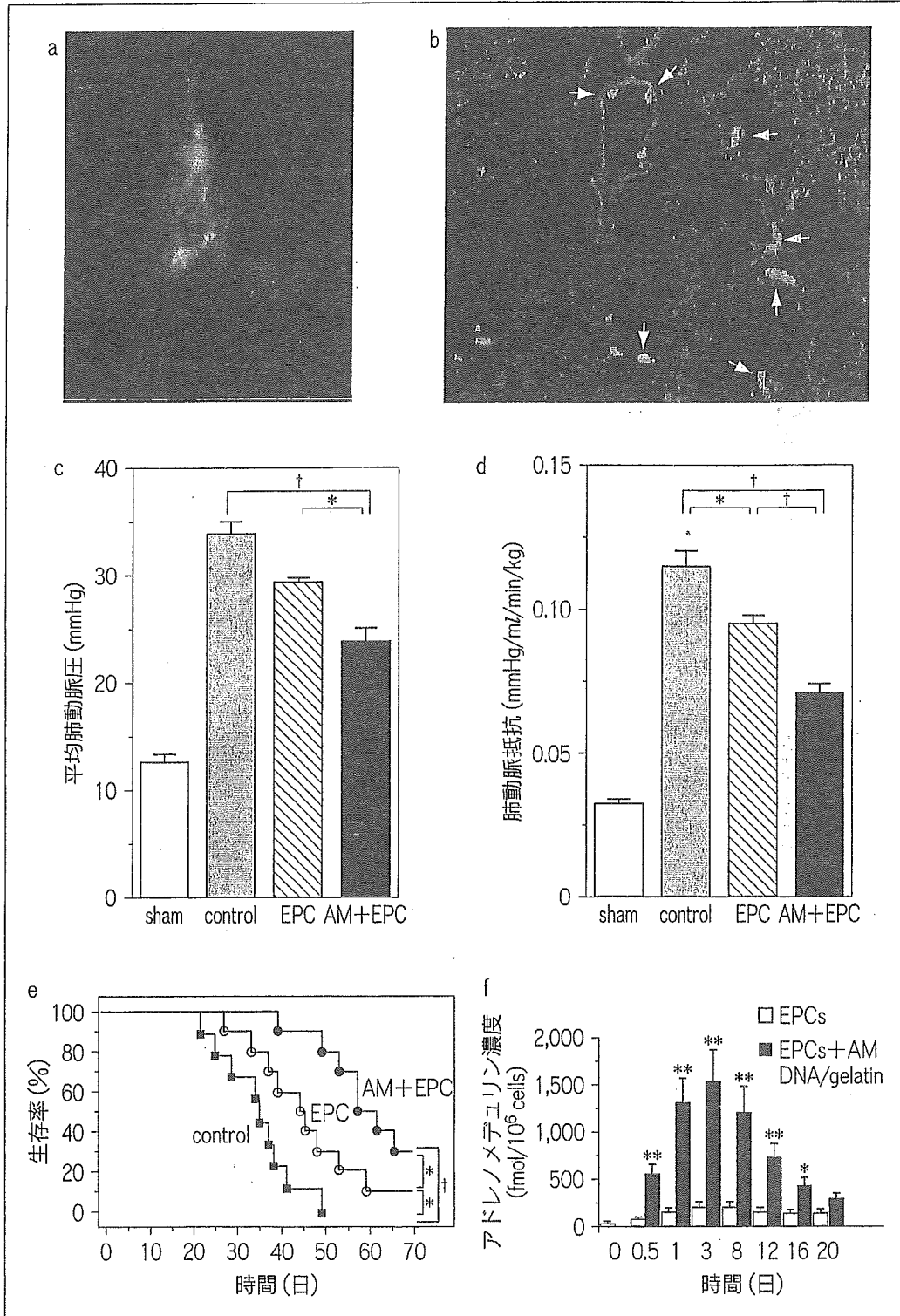


図5 肺高血圧ラットに対する血管内皮前駆細胞とアドレノメデュリン遺伝子のハイブリッド治療の効果

a : GFP 遺伝子導入 EPCs.

b : GFP 発現 EPCs は、肺細動脈の内面や肺組織の間質に付着し、血管を形成した。

c, d, e : アドレノメデュリン遺伝子導入 EPCs の移植により、平均肺動脈圧、肺血管抵抗、および予後が有意に改善した。* : $p < 0.05$, † : $p < 0.01$

f : 培養液中のアドレノメデュリン濃度。* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ vs EPCs

な改善のみにとどまった。一方アドレノメデュリン遺伝子導入 EPCs は平均肺動脈圧および平均肺動脈抵抗を有意に低下させ、生存率を有意に改善させた (図 5c, d, e)。また、アドレノメデュリン遺伝子導入 EPCs は EPCs 単独の約10倍のアドレノメデュリンを分泌し、約3週間にわたって発現が持続した (図 5f)。原発性肺高血圧症に対する治療としてプロスタサイクリン療法やエンドセリン受容体拮抗薬が開発され、その有効性が報告されているが、これらの治療にも抵抗性の症例が存在し、肺移植の適応とされながらもドナー不足により十分な治療が受けられないのが現状である。この細胞-遺伝子ハイブリッド治療が重症肺高血圧症に対する新たな治療法となる可能性がある。

おわりに

われわれが開発した生分解性ゼラチンを用いた遺伝子導入法は安全性、遺伝子の徐放化による持続発現の点で、従来のウイルスベクターを用いた方法よりも優れている可能性がある。本法は食能をもつ細胞であれば利用可能であると考えられ、肺高血圧症や虚血性心疾患などの難治性循環器疾患に対する新たな再生治療として期待されている。

文 献

- 1) Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R et al: Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb. *Lancet* 1996; **348**: 370-374
- 2) Tabata Y, Nagano A, Ikada Y et al: Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Eng* 1999; **5**: 127-138
- 3) Kasahara H, Tanaka E, Fukuyama N et al: Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2003; **41**: 1056-1062
- 4) Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M et al: Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **192**: 553-560
- 5) Tokunaga N, Nagaya N, Shirai N et al: Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic angiogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia: benefits of a novel nonviral vector, gelatin. *Circulation* 2004; **109**: 526-531
- 6) Plautz G, Nabel EG, Nabel GJ et al: Introduction of vascular smooth muscle cells expressing recombinant genes *in vivo*. *Circulation* 1991; **83**: 578-583
- 7) Asahara T, Murohara T, Isner JM et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; **275**: 964-967
- 8) Asahara T, Kawamoto A: Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; **287**: C572-C579
- 9) Nagaya N, Kangawa K, Mori H et al: Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation* 2003; **108**: 889-895
- 10) Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H et al: Therapeutic potential of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; **103**: 634-637
- 11) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; **360**: 427-435
- 12) Nagaya N, Kyotani S, Uematsu M et al: Effects of adrenomedullin inhalation on hemodynamics and exercise capacity in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2004; **109**: 351-356
- 13) Owji AA, Smith DM, Coppock HA: An abundant and specific binding site for the novel vasodilator adrenomedullin in the rat. *Endocrinology* 1995; **136**: 2127-2134
- 14) Nakamura M, Yoshida H, Makita S et al: Potent and long-lasting vasodilatory effects of adrenomedullin in humans. Comparisons between normal subjects and patients with chronic heart failure. *Circulation* 1997; **95**: 1214-1221

PECAM-1 を介した血管内皮細胞のメカノセンシング

増田 道隆, 小形 尚子, 望月 直樹

要約: 血管内皮細胞に発現している PECAM-1 (CD31) は, 細胞間接着部位に集積し, 細胞外ドメインのホモフィリックな結合により内皮細胞間をつないでいる接着分子である。PECAM-1 の細胞内ドメインには 2 つのチロシンリン酸化部位があり, 内皮細胞に機械的刺激を加えるとリン酸化が起こる。このリン酸化は Fer キナーゼによる可能性がある。リン酸化により SHP2 が細胞間接着部位に集積し, ERK キナーゼの活性化が引き起こされる。シアストレスによる ERK の活性化には PECAM-1 と SHP2 が必須である。抗 PECAM-1 細胞外ドメイン抗体でコートした磁気ビーズを用いて PECAM-1 を直接引っ張ると, PECAM-1 のリン酸化と ERK の活性化が起きる。コントロールのポリリジン磁気ビーズではどちらも起こらない。これらの結果は PECAM-1 がシアストレスセンサーとして機能していることを示唆する。

1. はじめに

血液を体のすみずみに過不足なく行き渡らせること, これが循環系の根源的な役割である。たとえ狭い範囲で短時間であっても, 血流停止は生命に直結する危機である。心筋梗塞のように血管が詰まるということがない限り, “すみずみに過不足なく” がごく自然に実現されている。私たちの体では, これをたった 1 つのポンプ心臓と血管の収縮・弛緩による流量調節だけで行っているのである。例えてみれば, 大都市の水道網を 1 つのポンプとバルブの調節だけで維持するようなもので, 途方もないことと言える。バルブの開閉を中央の指令だけで制御しようとする, 膨大なセンサー網と計算量を必要とし, 実現困難であることが予測される。循環系では, 自律神経系による中央制御と

共に, 局所における血管緊張の自律的調節が血流分配に重要な役割を果たしていると考えられる。内皮細胞は血流の強さに応じて NO などの血管作動因子を放出し, バルブである血管平滑筋細胞の収縮・弛緩を調節することにより, 局所的調節の主役を担っている。血管平滑筋細胞自身も, 血管壁の伸展・弛緩による張力変動を刺激として受容し, 張力発生を自己調節している。循環系を構成する細胞にとって力学的環境要因は大切な外的情報の 1 つであり, この情報をどのように感知し, どのような応答プログラムが準備されているのかを明らかにすることは重要な課題である。

2. 機械刺激センサーの同定

血管壁を構成する細胞には血液の流れにより 2 つの力が加わっている。1 つは流れの摩擦力であるシアストレスで, 血管の内面を覆う血管内皮細胞に, 流れの方向に平行な力として作用している。もう 1 つは血管内外の圧力差によって血管壁が円周方向に引き伸ばされる力である。これらの 2 つの力の大きさは心拍動にともない周期的に変化している。生理的に重要な血管緊張の調節のみならず, 内皮細胞と平滑筋細胞は, それぞれ, シアストレスが働く方向と伸展力が働く方向に配向する性質を持っており, このことが血管壁の構造や血管系の構築, すなわち血管のリモデリングに深く関わっている。

20 年余りの研究により, 内皮細胞がさまざまな機械刺激にどんな応答をするのかは, 細胞内情報伝達の仕組みを含めかなり明らかになってきている (1)。しかしセンシングに関してはまだ良くわかっていない。その理由の 1 つは, 機械刺激に特異性がないことにある。機械刺激を負荷された細胞では細胞全体にわたって影響が及び, 複数のセンシング機構とその下流の情報伝達経路が一斉に活性化されることが予想され, 実験では, それらの総和を観察している可能性が高い。さらに当然のことながら, 機械力のセンシングは細胞や組織の力学的性質・構築のされ方により, 大きく変化する。極端な例であるが, 仮に血管壁が鉄パイプのように硬いものであれば, 伸展力のセンシングは不可能

キーワード: 血管内皮細胞, シアストレス, PECAM-1, チロシンリン酸化, ERK

国立循環器病センター研究所・循環器形態部
(〒565-8565 吹田市藤白台 5)

e-mail: masuda61@ri.ncvc.go.jp

原稿受領日: 2004 年 8 月 30 日, 編集委員会依頼総説

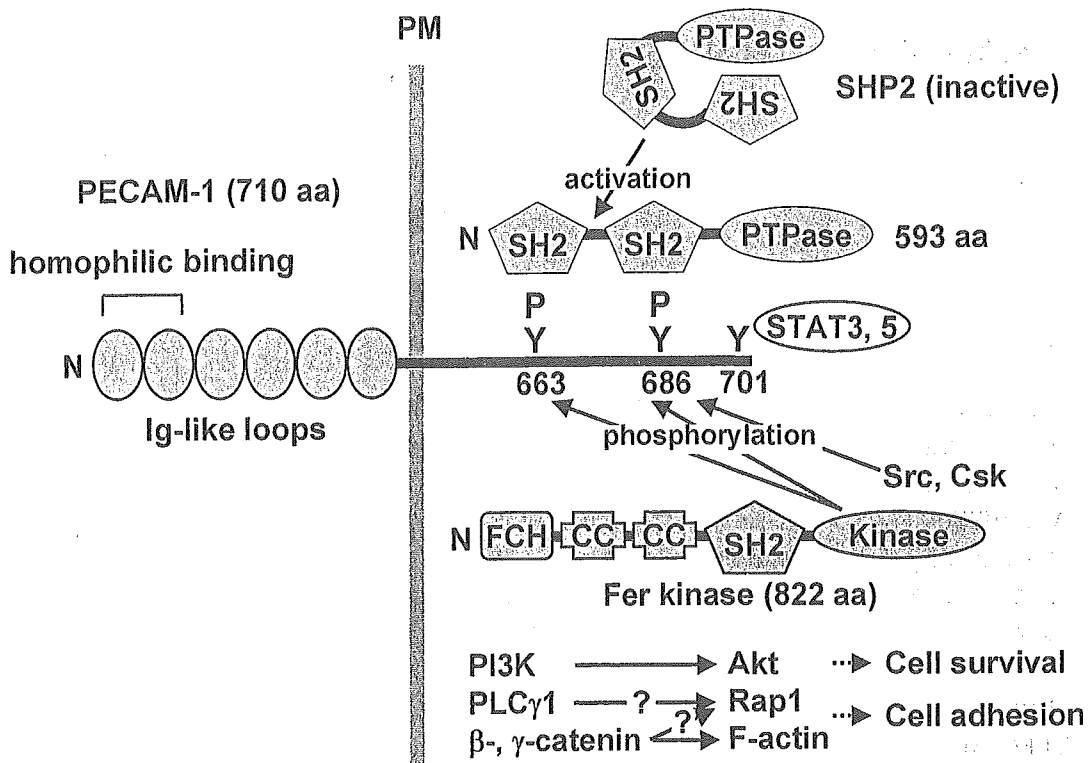


Fig. 1 A schematic representation of PECAM-1 and its binding partners.

である。したがって、同じ細胞が条件の違いで全く異なった応答をすることになる。本稿で紹介するシアストレスによる内皮細胞の ERK の活性化でも、低密度培養条件では PECAM-1 非依存性の機構が主に働いている。我々は、PECAM-1 からのシグナルを、おそらくインテグリンからのシグナルと分離するために実験デザインを工夫している。結局、機械刺激受容チャネルのような例外はあるものの、センシングの分子機構全体が解明されなければ、どの分子がセンサーとして機能しているかを特定することは困難である。このような状況では、とにかく機械刺激に起因すると思われる情報伝達分子の活性化をリストアップして、その信号経路がどの程度機械刺激の応答に貢献しているかを検討するとともに、経路を逆行することでセンシング分子の候補を探し出すのが妥当な方法であると思われる。

3. PECAM-1 のチロシンリン酸化と細胞内情報伝達

我々は、生理的な強さのシアストレスや浸透圧ショックにより、30 秒以内というはやい時間経過でチロシンリン酸化される内皮細胞の膜糖タンパク質を見だし(2)、PECAM-1 と同定した(3)。血小板の凝集時に PECAM-1

のチロシンリン酸化が起こることが報告されており、これらの実験の共通点を考えると、PECAM-1 のチロシンリン酸化の増大は細胞変形に依存して起こることが推定された。

PECAM-1 はイムノグロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子であり、細胞間接着部位に集積してホモフィリックな結合により細胞間をつないでいる(4)。この分子は内皮細胞、血小板に高発現しており、また単球、好中球、T 細胞などでも発現がある。分子構造は 6 個のイムノグロブリン様ループからなる細胞外ドメイン、1 つの膜貫通ドメイン、それに 118 アミノ酸残基 (ヒト) からなる細胞内ドメインで構成されている (Fig. 1)。細胞内ドメインにある 2 ヶ所のチロシン残基 Y663, Y686 を含む領域は BTAM (bisphosphoryl tyrosine-based activation motif) または ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) と呼ばれるモチーフとなっている。このモチーフは SH2 ドメインを 2 つ持つタンパク質チロシン脱リン酸化酵素、SHP1 と SHP2 が結合し活性化を受ける部位である(5)。我々は、内皮細胞を機械刺激すると PECAM-1 が SHP2 とチロシンリン酸化依存的に結合し、PECAM-1

は内皮細胞における SHP2 の主要な結合相手であることを明らかにした(6)。また、リン酸化 Y686 は Src ファミリーキナーゼの SH2 ドメインが結合する認識配列にあり、実際に結合することを *in vitro* で確認した。種を超えて保存されている Y701 には STAT3,5 が結合し(7)、結合部位は未定であるが、PI3 キナーゼ(8)や β -, γ -カテニン(9)など10を超える結合分子が報告されている(10)。これらのことは PECAM-1 が細胞接着・細胞骨格分子としてのみならず情報伝達分子としても機能することを示唆しており、少なくともその作用の一部が、チロシンリン酸化によりコントロールされている可能性を示している。

4. ERK の活性化と PECAM-1

SHP2 は EGF 受容体などの受容体型チロシンキナーゼの下流で ERK キナーゼをポジティブに制御していることが知られている。流れ刺激によって ERK の活性化が引き起こされることが、多くの研究室で確認されていることもあり、我々は機械刺激によって引き起こされる ERK の活性化に、PECAM-1 と SHP2 の関与があるのかどうか調べた(11)。PECAM-1 のチロシンリン酸化が起こる条件である流れ刺激 (15 dyn/cm²) や、高浸透圧刺激 (300 mM ショ糖の添加) で、刺激後 10 分をピークとした一過性の ERK の活性化が起こった。アンチセンスオリゴ法により PECAM-1 の発現を抑制し、高浸透圧刺激を加えると ERK の活性化は抑制されたが、やはり高浸透圧刺激で活性化される p38MAP キナーゼの活性化は抑制されず、PECAM-1 の関与が ERK の活性化経路に特異的であることが示唆された (Fig. 2a)。

機械刺激による ERK の活性化に対して、PECAM-1 の細胞質ドメインがドミナントネガティブ効果を持つことが明らかとなった。内皮細胞に HA-PECAM-1_{cyt} (HA タグ付加 PECAM-1 細胞内ドメイン) と FLAG-ERK2 を共発現して 10 分間の流れ刺激を負荷し、それぞれのタグに対する抗体で免疫沈降した。その結果、流れ刺激による ERK2 の活性化は HA-PECAM-1_{cyt} を発現させた内皮細胞で約 70% の阻害を受けた (Fig. 2b)。高浸透圧刺激でも同様の結果が得られた。この阻害効果は上述の BTAM の Y663 と Y686 をフェニルアラニン残基に変異した HA-PECAM-1_{cyt}-Y/F を用いた場合には観察されず、これらのチロシンが PECAM-1 の情報伝達に重要であることが示唆された。SHP2 が関与しないとされる VEGF による ERK2 の活性化は影響されなかったことから (Fig. 2c)、ERK 活性化に対する一般的阻害効果ではない。HA-PECAM-1_{cyt} は細胞質に拡散して存在し、内在性の PECAM-1 や α -, β -カテニンなどの分布に影響しないので、HA-PECAM-1_{cyt} により細胞間接着や細胞骨格が破壊された結果とは

考え難い。PECAM-1 の細胞内ドメインに結合し ERK の活性化に必要な分子が、リン酸化される HA-PECAM-1_{cyt} によって細胞間接着部位から引き離されることが、ドミナントネガティブ効果の原因と考えられた。

ドミナントネガティブ効果のターゲットとしてまず SHP2 があげられる。SHP2 が ERK 活性化に必要であるかを、酵素活性を持たない SHP2 の大量発現で調べた。活性中心のシステインをセリンで置換した SHP2-C/S は流れ刺激による ERK 活性化を強く阻害した (Fig. 2d)。機械刺激による ERK 活性化に SHP2 がどのように関わっているのかは不明であるが、活性化のメカニズムについて最近 2 つの経路が報告されている。1 つは PAG (phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains, CBP Csk binding protein と呼ばれる膜タンパク質) の脱リン酸化を介して Csk (c-Src tyrosine kinase) の膜移行を負に制御し、Csk による Src ファミリーキナーゼの不活性化を阻害する経路である(12)。他方は、受容体チロシンキナーゼの下流でネガティブフィードバックを担っている Sprouty(13)を脱リン酸化し、阻害を解除するという Ras-ERK の経路に直接働くものである(14)。機械刺激において Src は PECAM-1 のチロシンリン酸化に遅れて活性化されることから、内皮細胞においても PAG/CBP の経路が成立するのかを調べる必要がある。

以上の過剰発現実験により、PECAM-1 のチロシンリン酸化を介した SHP2 の膜移行が内皮細胞の機械刺激受容に関与していることが示唆された。流れ刺激により内在性の SHP2 の分布が実際に変化するかどうかを特異抗体による免疫染色で調べた。SHP2 は無刺激の内皮細胞中では細胞質に拡散して存在しているが、流れ刺激で PECAM-1 が局在する細胞間接着部位に濃縮されるようになる(11)。SHP2 のドッキングタンパク質である Gab1(15)も細胞間接着部位に膜移行する。アンチセンスオリゴ法により PECAM-1 の発現を抑制すると、SHP2 と Gab1 の細胞間接着部位への移行は起こらなくなる。さらに、GFP (green fluorescence protein) でラベルされた SHP2-C/S を内皮細胞に発現させると、刺激の有無に関わらず常に細胞間接着部位に局在し、実際に PECAM-1 と結合していた。野生型の GFP-SHP2 の場合でも、酵素活性を阻害するパナジン酸で 30 分ほど処理すると、刺激のない状態で細胞間接着部位に濃縮されるようになる。これらの結果から、流れ刺激による ERK の活性化の少なくとも一部は、PECAM-1 のチロシンリン酸化と SHP2 の活性化を介するシグナル伝達によるものであると結論した。PECAM-1 は SHP2 で脱リン酸化されること、酵素活性のない SHP2 が常に PECAM-1 に結合していることなどから、PECAM-1 のチロシンリン酸化、SHP2 の結合と脱リン酸化、そして