

論 文 内 容 要 旨

題目 Rho-associated protein kinase and cyclophilin a are involved in inorganic phosphate-induced calcification signaling in vascular smooth muscle cells

(血管平滑筋細胞石灰化シグナルにおける Rho キナーゼ-サイクロフィリン A 経路の関与)

著者 Tatsuya Tsuda, Masaki Imanishi, Mizuho Oogoshi, Mitsuhiro Goda, Yoshitaka Kihira, Yuya Horinouchi, Yoshito Zamami, Keisuke Ishizawa, Yasumasa Ikeda, Ichiro Hashimoto, Toshiaki Tamaki, Yuki Izawa-Ishizawa

令和 2 年 3 月発行 Journal of Pharmacological Sciences
第 142 巻 第 3 号 109 ページから 115 ページに発表済

内容要旨

粥状動脈硬化症、糖尿病、腎不全などの病態では血管石灰化病変の形成を認め、皮弁壊死の要因となり得るなど、治療効果に大いに影響を及ぼす。そのため、血管石灰化形成の分子メカニズムを解明し、治療標的分子を同定することは临床上重要な課題である。血管石灰化をきたすメカニズムの一つとして、血管平滑筋細胞の骨芽細胞様細胞への形質転換が関与していることが知られている。その細胞内シグナル伝達経路には、mitogen-activated protein (MAP) kinase ファミリーの一つである extracellular-signal regulated protein kinase (ERK) 1/2 のリン酸化が重要な役割を担っていると考えられている。一方 cyclophilin A (CypA) は酸化ストレスによる ERK1/2 活性化を仲介する鍵分子であることが近年報告された。CypA 経路の上流分子の一つとして報告されている rho-associated protein kinase (ROCK) は、血管石灰化への関与が示唆されているが、その詳細な分子機序は明らかとなっていない。そこで我々は、強力な石灰化誘導因子である無機リン酸塩 (inorganic phosphate: Pi) 刺激を用い、血管平滑筋細胞の石灰化における ROCK-CypA 経路の関与について検討した。

培養ラット大動脈平滑筋細胞 (rat aortic smooth muscle cell: RASMC) を用いた実験では、ERK1/2 はリン酸化を、骨芽細胞マーカーである runt-related

様式(8)

transcription factor 2 (runx2) はその発現を、ROCK の活性化は内因性基質である myosin phosphatase targeting subunit 1 (MYPT1) のリン酸化を評価した。石灰化の評価としてカルシウム沈着、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性を測定した。CypA の細胞外分泌はそのタンパク量を評価した。また、ヒト病理検体組織及び糖尿病モデル db/db マウス大動脈切片を用いた実験では、CypA、runx2 蛋白発現を免疫染色法により評価した。得られた結果は以下の通りである。

- (1) RASMC において Pi は刺激後 10 分をピークに ERK1/2 のリン酸化を増加させ、ERK1/2 阻害剤 PD98059 の処置は Pi による ALP 活性上昇を抑制した。
- (2) Pi 刺激は刺激後 10 分をピークに MYPT1 のリン酸化すなわち ROCK 活性化を上昇させた。
- (3) ROCK 阻害剤 Y-27632 の前処置は Pi による ERK1/2 リン酸化、ALP 活性上昇、カルシウム沈着を抑制した。
- (4) db/db マウスの大動脈では、runx2 及び CypA の発現が増加していることを認めた。
- (5) 正常ヒト組織の血管平滑筋細胞では CypA 発現を認めないが、プラークを有する脳底動脈及び大動脈ではその新生内膜、中膜において CypA 発現増強を認めた。
- (6) RASMC において Pi 刺激は、細胞外への CypA 分泌を増加させた。
- (7) Y-27632 の前処置は CypA 分泌を抑制した。
- (8) CypA 阻害剤 239836 の前処置は Pi 刺激による ERK1/2 リン酸化、Runx2 発現上昇、カルシウム沈着を抑制した。
- (9) CypA リコンビナント蛋白を培地中に添加し培養した RASMC ではカルシウム沈着が増加した。

以上の結果より、Pi 刺激に誘導される血管平滑筋細胞の石灰化には、ROCK 活性化による CypA の分泌上昇が、下流の ERK1/2 リン酸化、runx2 発現増加に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1520 号	氏名	津田 達也
審査委員	主査 秦 広樹 副査 佐田 政隆 副査 竹谷 豊		

題目 Rho-associated protein kinase and cyclophilin a are involved in inorganic phosphate-induced calcification signaling in vascular smooth muscle cells
(血管平滑筋細胞石灰化シグナルにおける Rho キナーゼ-サイクロフィリン A 経路の関与)

著者 Tatsuya Tsuda, Masaki Imanishi, Mizuho Oogoshi, Mitsuhiro Goda, Yoshitaka Kihira, Yuya Horinouchi, Yoshito Zamami, Keisuke Ishizawa, Yasumasa Ikeda, Ichiro Hashimoto, Toshiaki Tamaki, Yuki Izawa-Ishizawa
令和 2 年 3 月発行 Journal of Pharmacological Sciences
第 142 巻 第 3 号 109 ページから 115 ページに発表済
(主任教授 橋本一郎)

要旨 粥状動脈硬化症や糖尿病などでは動脈に石灰化病変を認め、外科手術をはじめ、さまざまな治療に影響を及ぼす。そのため、血管石灰化形成の分子メカニズムを解明し、治療標的分子を同定することは临床上重要な課題である。動脈石灰化のメカニズムとして、血管平滑筋細胞の骨芽細胞様細胞への形質転換が関与しているとされる。その細胞内シグナル伝達経路には、extracellular-signal regulated protein kinase (ERK) 1/2 と cyclophilin A (CypA) の関与が近年報告された。しかし、CypA 経路の上流分子である rho-associated protein kinase (ROCK) の血管石灰化に関する詳細は明らかとなっていない。申請者らは、

無機リン酸 (Pi) 刺激を用い、血管平滑筋細胞の石灰化における ROCK-CypA 経路の影響について検討した。

得られた結果は以下の通りである。

- (1) 培養ラット大動脈平滑筋細胞 (rat aortic smooth muscle cell: RASMC) において Pi 刺激は ERK1/2 のリン酸化を増加させ、ERK1/2 阻害剤により Pi 刺激による ALP 活性上昇は抑制された。
- (2) RASMC において Pi 刺激は ROCK 活性化を上昇させ、ROCK 阻害剤により Pi 刺激による ERK1/2 リン酸化、ALP 活性上昇、カルシウム沈着は抑制された。
- (3) db/db マウスの大動脈では、RUNX2 及び CypA の発現が増加していた。
- (4) 正常ヒト組織の血管平滑筋細胞では CypA 発現を認めなかったが、プラークを有する脳底動脈及び大動脈ではその新生内膜、中膜において CypA 発現の増強を認めた。
- (5) RASMC において Pi 刺激は、細胞外への CypA 分泌を増加させたが、ROCK 阻害剤により CypA 分泌は抑制された。さらに、CypA 阻害剤は Pi 刺激による ERK1/2 リン酸化、RUNX2 発現上昇、カルシウム沈着を抑制した。
- (6) CypA リコンビナント蛋白を培地中に添加し培養した RASMC では、カルシウム沈着が増加した。

以上の結果より、血管平滑筋細胞の石灰化に関して、ERK1/2 リン酸化、RUNX2 発現増加が関与していることが示され、その上流には ROCK 活性化による CypA の分泌上昇が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。本研究は血管平滑筋細胞の石灰化の機序について、ROCK-CypA 経路の関与を明らかにしたものであり、医学的意義は高く、学位授与に値すると判定した。