

論文内容要旨

背景

天然のビタミン A 誘導体である全トランス型レチノイン酸 (all-*trans* retinoic acid, ATRA) は血管平滑筋細胞における増殖抑制作用を持ち、バルーン傷害モデル動物において強い新生内膜抑制・再狭窄抑制作用が報告され、血管に対する作用が注目されている。血管平滑筋細胞に対する ATRA の作用が良く知られていることに対して、血管内皮細胞に対する作用は、urokinase-type plasminogen activator, tissue-type plasminogen activator, thrombomodulin などの抗血栓作用を持つ遺伝子の発現を誘導することが報告されているものの、血管内皮機能に関する報告はほとんど無く、その検討が必要とされている。血管内皮機能に関する作用を検討する目的で、ATRA による一酸化窒素 (nitric oxide, NO) 発現調節機構を検討した。

方法と結果

ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (human dermal microvascular endothelial cells, HMVECs), ラット肺血管内皮細胞 (SV 40-transformed rat lung vascular endothelial cells, TRLEC-03) を ATRA 存在下もしくは非存在下で 12 時間から 48 時間培養した。血管内皮細胞における NO 産生は、蛍光 NO 指示薬である diaminofluorescein-2 diacetate を用いて検討した。ATRA 処理 (1 μ mol/L, 48 時間) により、血管内皮細胞での NO 産生は、約 1.7 倍に増強した。NO 測定 30 分前より NO 合成酵素阻害剤 N ω -nitro-L-arginine methyl ester もしくは NO スカベンジャー carboxy-PTIO で処理したところ、ATRA 処理・非処理両群で蛍光強度は強く抑制された。ATRA による NO 産生の上昇は、レチノイン酸受容体 (retinoic acid receptor, RAR) アンタゴニスト LE540 もしくは、ホスホイノシチド 3-キナーゼ (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 阻害剤 wortmannin で抑制された。内皮型 NO 合成酵素 (endothelial NO synthase, eNOS) セリン 1177 残基リン酸化特異的抗体を用いたウエスタン・ブロット法により、ATRA は eNOS リン酸化を亢進させることを確認した。ATRA は eNOS セリン 1177 残基リン酸化に強く関与することが知られるセリン・スレオニンキナーゼである Akt のセリン 473 残基のリン酸化も強く亢進させたが、eNOS, Akt ともにタンパク発現には影響を与えなかった。eNOS セリン 1177 残基および Akt セリン 473 残基のリン酸化はともに wortmannin, LE540 で抑制された。血管内皮細胞における PI3K 活性は ATRA 処理もしくは非処理細胞からの抽出タンパクを PI3K p85 調節サブユニット特異的抗体により免疫沈降し、*in vitro* における PI (4,5) P₂ 基質の PI (3,4,5) P₃ への変換効率を酵素免疫吸着法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) により測定した。ATRA は血管内皮細胞において 48 時間で PI3K 活性を著明に上昇

させた。ATRA は PI3K p110 β 触媒サブユニットのタンパク発現を 48 時間で上昇させたが、mRNA 発現は変化させなかった。

結 論

ATRA は血管内皮細胞において、RAR を介し PI3K/Akt 経路、eNOS のリン酸化を亢進させることにより NO 産生を増加させた。ATRA は血管内皮機能に関して有益な作用をもち、内皮機能障害が発生する血管疾患に対して治療的役割を持つ可能性が示された。

審査結果の要旨

天然のビタミン A 誘導体である全トランス型レチノイン酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) は血管平滑筋細胞における増殖抑制作用を持ち、バルーン傷害モデル動物において強い新生内膜抑制・再狭窄抑制作用が報告され、血管に対する作用が注目されている。血管平滑筋細胞に対する ATRA の作用が良く知られていることに対して、血管内皮細胞に対する作用は、urokinase-type plasminogen activator, tissue-type plasminogen activator, thrombomodulin などの抗血栓作用を持つ遺伝子の発現を誘導することが報告されているものの、血管内皮機能に関する報告はほとんどなく、その検討が必要とされている。本研究では血管内皮機能に関する作用を検討する目的で、ATRA による一酸化窒素 (nitric oxide, NO) 発現調節機構を検討した。ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (human dermal microvascular endothelial cells, HMVECs), ラット肺血管内皮細胞 (SV 40-transformed rat lung vascular endothelial cells, TRLEC-03) を ATRA 存在下もしくは非存在下で 12 時間から 48 時間培養した。血管内皮細胞における NO 産生は、蛍光 NO 指示薬である diaminofluorescein-2 diacetate を用いて検討した。ATRA 処理 (1 μ mol/L, 48 時間) により、血管内皮細胞での NO 産生は、約 1.7 倍に増強した。NO 測定 30 分前より NO 合成酵素阻害剤 N ω -nitro-L-arginine methyl ester もしくは NO スカベンジャー carboxy-PTIO で処理したところ、ATRA 処理・非処理群で蛍光強度は強く抑制された。ATRA による NO 産生の上昇は、レチノイン酸受容体 (retinoic acid receptor, RAR) アンタゴニスト LE540 もしくはホスホイノシチド 3-キナーゼ (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 阻害剤 wortmannin で抑制された。内皮型 NO 合成酵素 (endothelial NO synthase, eNOS) セリン 1177 残基リン酸化特異的抗体を用いたウエスタン・ブロット法により、ATRA は eNOS リン酸化を亢進させることが確認された。ATRA は eNOS セリン 1177 残基リン酸化に強く関与することが知られるセリン・スレオニンキナーゼである Akt のセリン 473 残基のリン酸化も強く亢進させたが、eNOS, Akt とともにタンパク発現には影響を与えなかった。eNOS セリン 1177 残基及び Akt セリン 473 残基のリン酸化はともに wortmannin, LE540 で抑制された。血管内皮細胞における PI3K 活性は ATRA 処理もしくは非処理細胞からの抽出タンパクを PI3Kp85 調節サブユニット特異的抗体により免疫沈降し、in vitro における PI (4,5) P₂ 基質の PI (3,4,5) P₃ への変換効率を酵素免疫吸着法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) により測定した。ATRA は血管内皮細胞において 48 時間で PI3K 活性を著明に上昇させた。ATRA は PI3Kp110 β 触媒サブユニットのタンパク発現を 48 時間で上昇させたが、mRNA 発現は変化させなかった。

以上より、ATRA は血管内皮細胞において、RAR を介し PI3K/Akt 経路、eNOS のリン酸化を亢進させることにより NO 産生を増加させた。ATRA は血管内皮機能に関して有益な作用を持ち、内皮機能障害が発生する血管疾患に対して、治療的役割を持つ可能性が新しく示された。この成績は新知見であり、学術的にも優れていることより、学位に十分値するものと思われる。