

氏 名 (本籍)	すぎ 杉 村 宏 一 郎
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2 0 9 3 号
学位授与年月日	平 成 1 6 年 3 月 2 5 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	高血圧ラットの大動脈における Focal adhesion kinase と Proline-rich trosine kinase 2 の発現 とリン酸化の検討

(主 査)

論文審査委員	教授 白 土 邦 男	教授 伊 藤 貞 嘉
	教授 佐 藤 靖 史	

論文内容要旨

背 景

高血圧症は動脈硬化に代表される血管疾患の進展における重要なリスクファクターである。高血圧による動脈硬化形成の一機序として血管に与える機械的負荷がある。血管に与える機械的負荷は、血管平滑筋細胞や内皮細胞など血管を形成する細胞の圧受容体などを介して、機械的シグナルから化学的シグナルに変換され、細胞内へ情報が伝達される。そして、機械的シグナルを化学的シグナルに変換する装置の一つとしてインテグリンが挙げられる。FAK, PYK2はインテグリンシグナル伝達に関与する非受容体型蛋白チロシンキナーゼであるが、近年、培養血管平滑筋細胞、培養血管内皮細胞において機械的負荷によって活性化し、細胞の分化や増殖に関係するMitogen-activated protein kinaseカスケードに関与することが報告された。しかし、慢性の高血圧症においてもインテグリンおよびFAK, PYK2が活性化されているかどうか不明である。また、FAKとPYK2はアンジオテンシンIIによっても活性化することが確認され、生体内における、FAK, PYK2のリン酸化に対する体液性因子の関与もわかっていない。

目 的

今回私は、腹部大動脈狭窄高血圧モデルにて、大動脈組織におけるFAK, PYK2のリン酸化を高血圧の急性期および慢性期にて評価して、高血圧という生体内の変化においても、FAK, PYK2を介した細胞内シグナルの伝達が働いているのかを研究した。

方 法

ラットの腹部大動脈狭窄モデルを作製し(AO群)、術後6時間、3日間、1週間、4週間後の経過で大動脈組織でのFAKとPYK2の蛋白の発現とリン酸化をウエスタンブロットにて評価した。また、FAKとPYK2の発現を免疫染色にて組織学的に評価した。上記モデルは腹部大動脈狭窄部位の遠位側はアンジオテンシンIIなどの体液性因子が亢進した状態であるにもかかわらず、正常な血圧であり、同部におけるFAKやPYK2のリン酸化も同時に評価することで、体液性因子の関与も調べた。さらには、FAKやPYK2のリン酸化を起こしていると考えられているインテグリンの発現の変化についても同時に検討した。

結 果

AO群の近位側大動脈平均血圧はそれぞれのSO群に比較し、3日後から有意な増加を示した。血漿レニン活性、血漿アンジオテンシンIIはAO群6時間後から有意な増加を認めたが、4週

間後には正常域に低下していた。FAK と PYK2 の発現は AO 群近位側大動脈において術後 1 週間、4 週間で有意な増加を認めた（それぞれの Sham 手術群 (SO 群) の遠位側大動脈に対して FAK の発現：1 週間後 1.94 ± 0.18 倍、4 週間後 2.54 ± 0.16 倍、PYK2 の発現：1 週間後 2.43 ± 0.31 倍、4 週間後 2.96 ± 0.68 倍 ($P < 0.05$)）。FAK および PYK2 の免疫染色では大動脈中膜に発現が増強していた。AO 群近位側大動脈においてのリン酸化 FAK の発現は 3 日間後から有意な増加を認め（それぞれの SO 群遠位側大動脈に対し 3 日後 1.75 ± 0.08 倍、1 週間後 1.94 ± 0.18 倍、4 週間後 2.54 ± 0.16 倍 ($P < 0.05$)）、リン酸化 PYK2 の発現は術後 1 週間から増加を認めた（それぞれの SO 群遠位側大動脈に対し 1 週間後 5.12 ± 1.24 倍、4 週間後 5.18 ± 0.96 倍 ($P < 0.05$)）。AO 群遠位側大動脈、SO 群近位側および SO 群遠位側大動脈において、いずれの時期も FAK、PYK2 の発現とリン酸化 FAK、リン酸化 PYK2 の発現に有意差を認めなかった。すべての群で $\beta 1$ インテグリンサブユニット、 $\beta 3$ インテグリンサブユニットの発現に有意差を認めなかった。

考 察

高血圧により大動脈組織の FAK と PYK2 の発現とリン酸化は増加した。そして、発現の増加は大動脈中膜に認められた。また、その発現の増加には、血漿アンギオテンシン II に比較して高血圧の関与が大きいと考えられた。リン酸化 FAK とリン酸化 PYK2 の発現は高血圧負荷により増加していた。リン酸化 FAK の発現は FAK の発現が増加する前より増加しており、高血圧負荷は FAK を介してシグナル伝達がなされていると考えられた。

結 論

急性期および慢性期の高血圧によって、インテグリンの細胞内シグナルである FAK および PYK2 の蛋白発現が増加し、また同蛋白のリン酸化が亢進することが証明された。そして、これらの変化は、大動脈狭窄に伴う体液性因子の変化とは無関係であった。高血圧による動脈硬化形成や血管のリモデリングの進行を阻止するために、細胞に備わっている圧のセンサーと細胞内へのシグナルの伝達を解明することは非常に重要なことである。今回の結果から、インテグリンが高血圧という生体内の変化を感知して、細胞内へシグナルを伝達していることが示唆された。

審査結果の要旨

高血圧は心血管疾患の重要なリスクファクターであり、アンジオテンシンⅡなどの体液性因子とともに動脈硬化の発症進展に大きく関与している。近年インテグリンは機械的負荷受容体として注目されているが、FAKはそのインテグリンの細胞内シグナル伝達に最も重要なシグナル蛋白であり機械的負荷により活性化し、細胞増殖、遊走、さまざまな遺伝子発現に関与するMAP kinaseの活性化に関与することがin vitroの実験で報告されている。また、FAKと類似の構造を持つPYK2もインテグリンシグナル、機械的負荷のシグナル伝達に関与していることが報告されている。本研究はラット高血圧モデルを使用しin vivoで高血圧という動脈への機械的負荷の細胞内シグナル伝達機序をFAKおよびPYK2に焦点を当てて検討したものである。ラットの腹部大動脈を両側腎動脈上で縛り狭窄を作ることで高血圧モデルを作製した。本モデルの狭窄部遠位側大動脈ではアンジオテンシンⅡが上昇しているにもかかわらず正常血圧であり、高血圧の狭窄部近位側大動脈と比較することで高血圧と体液性因子の影響を検討した。ウエスタンブロット法と免疫染色法による検討の結果、FAKとPYK2の発現は高血圧により大動脈中膜に有意に増加していた。リン酸化FAKの発現はリン酸化PYK2の発現に比較し、高血圧モデル作製後の、より早期の時期から増加を認めた。狭窄モデル遠位側大動脈、sham手術群近位側および遠位側大動脈において、いずれの時期もFAK、PYK2の発現とリン酸化FAK、リン酸化PYK2の発現に有意差を認めなかった。in vitroではFAKおよびPYK2のリン酸化を引き起こすアンジオテンシンⅡの関与はin vivoでは認めなかった。つまり、高血圧の大動脈において体液性因子ではなく機械的負荷によるFAK、PYK2を介したシグナル伝達が行われている可能性が示された。

大動脈において高血圧によりFAKおよびPYK2を介した細胞内シグナル伝達が行われていることが本研究において初めて示された。本研究の結果は高血圧そのものによる血管リモデリング、動脈硬化発症進展の一機序の存在を示唆するものであり、今後の高血圧による血管リモデリング、動脈硬化への治療につながる研究と考えられ臨床的意義が大きい。よって本研究は学位に十分値する研究であると考えられる。