

学 位 論 文 題 名

血管内皮細胞におよぼす
プロインスリンC-ペプチドの作用
－ MAP キナーゼを介した遺伝子発現の調節－

学位論文内容の要旨

C-ペプチドはプロインスリンを構成しているペプチドで、膵臓β細胞の分泌顆粒中にプロインスリンの切断により生じたインスリンと共に存在する。したがって C-ペプチドはインスリンと同時に血中へ分泌されるが、インスリンの著明な血糖降下作用に比べ C-ペプチドには生理活性が無いと考えられてきた。しかし近年、インスリン及び C-ペプチドの分泌が著しく低下しているインスリン依存性糖尿病(IDDM)の患者やモデル動物に C-ペプチドを投与すると、末梢血流が増大し糖尿病に伴う種々の病態が改善される可能性が示されている。しかしながら、C-ペプチドに結合する特異的受容体の存在や、血流調節に関わる分子メカニズムは未だ不明である。本学位論文では血管内皮細胞が C-ペプチド応答細胞であることを発見し、C-ペプチドが MAP キナーゼの活性化とそれに続く遺伝子発現を介して血管内皮細胞の機能を調節していることを明らかにした。

第一章ではまず、C-ペプチド作用の指標として細胞内情報伝達のキー・エンザイムである p44/42 MAP キナーゼ(ERK)のリン酸化（活性化）を検出することで C-ペプチド応答細胞を探した。調べた 11 種類の細胞のうち LEII 血管内皮細胞株では C-ペプチドによる著明なリン酸化の増大が認められた。この様な効果は 3T3-F442A および Swiss3T3 線維芽細胞株でもみられたが、肝細胞株や骨格筋細胞株、神経系細胞株では認められなかった。MAP キナーゼファミリーには ERK の他に p38MAPK、JNK があり、いずれも様々な細胞機能に関与することが知られている。そこで次に、C-ペプチドの p38MAPK と JNK に対する効果について調べたところ、3T3-F442A および Swiss3T3 細胞ではいずれの活性化も認められなかったが、LEII 細胞では ERK に加え p38MAPK の活性化がみられた。これらの結果より、LEII 血管内皮細胞株は C-ペプチド応答細胞の一つであり、C-ペプチドによって ERK と p38MAPK が活性化されることが示された。この反応の基本的性質を LEII 細胞を用いて調べたところ、ERK と p38MAPK いずれのリン酸化も 1pM という低濃度の C-ペプチドで促進され 1nM で最大となっ

た。C-ペプチドの血中濃度は 0.1~1nM なので、上記の結果は C-ペプチドによる MAP キナーゼの活性化が生理的条件で起こりうることを示している。また、この様な MAP キナーゼに対する作用は立体異性体である D 型アミノ酸からなる C-ペプチドやアミノ酸配列を逆にした C-ペプチドでは認められなかったことから、C-ペプチドはその立体構造を認識しうる受容機構（特異的受容体）を介して MAP キナーゼのシグナル経路を活性化していることが示唆された。

第二章では、LEII 血管内皮細胞株を用いて C-ペプチドによる MAP キナーゼ活性化細胞内機構を調べた。C-ペプチドによる ERK および p38MAPK のリン酸化は、いずれも百日咳毒素感受性 G-蛋白質(Gi/Go)、PI-3 キナーゼ(PI-3K)、プロテインキナーゼ C(PKC)に対する阻害剤で有意に抑制された。したがって、C-ペプチドは G-蛋白質(Gi/Go)と PI-3K、PKC が関与する共通の経路を介して ERK と p38MAPK を活性化することが示された。MAP キナーゼやそれによって活性化されるプロテインキナーゼは様々な転写因子をリン酸化し DNA への結合能を変化させることで、遺伝子発現の調節に関与することが知られている。そこで次に、ERK および p38MAPK 経路の共通の標的転写因子である CREB/ATF の活性化について調べたところ、C-ペプチド刺激によって CREB/ATF1 のリン酸化と DNA への結合が促進された。また阻害剤を用いた検討により、これらの転写因子の活性化には ERK は関与せず p38MAPK とそれにより活性化される MAPK activated protein kinase 2 (MAPKAP-K2)が関与することが明らかとなった。

しかしながら LEII 細胞は株化された細胞であり、必ずしも生体内での血管内皮細胞と同じ性質を保持しているとは限らない。そこで第三章では、C-ペプチドによる MAP キナーゼ経路の活性化について、ラットより分離培養した肺微小血管内皮細胞(RLMEC)と大動脈血管内皮細胞(RAEC)を用いて検討した。RLMEC 細胞では、LEII 細胞と全く同様に C-ペプチド刺激によって ERK、p38MAPK、CREB/ATF1 の活性化が促進された。一方、RAEC 細胞では、ERK の活性化はみられるものの p38MAPK と CREB/ATF1 の活性化は認められなかった。これらの結果は C-ペプチドが血管内皮細胞に直接作用すること、その効果が大動脈と微小血管の内皮細胞では異なることを示している。特に微小血管内皮細胞においては C-ペプチドが p38MAPK~CREB/ATF1 経路によって何らかの遺伝子発現の制御に関与していることが示唆される。

一方、ERK の経路も血管内皮細胞の機能に重要な内皮型 NO 合成酵素(eNOS)などの遺伝子発現に関与することが知られているが、C-ペプチドによる ERK 活性化の機能は明らかではない。そこで第四章では、C ペプチドが ERK 経路を介して遺伝発現を誘導しうるか否かを、RAEC 細胞における eNOS の発現に焦点を絞って解析した。RAEC 細胞を C ペプチドで刺激すると、10 分から 1 時間にかけて eNOS mRNA の発現が増加し、それに伴って eNOS 蛋白質の発現量が増加した。また、刺激後 3 時間で NO 産生量が約 2 倍に増加していた。これらの変化はいずれも ERK 経路の阻害剤でほぼ完全に抑制されたことから、C-ペプチドは

ERK 経路を介して eNOS 遺伝子の発現を促進すること、それに伴い血管保護・血管弛緩作用をもつ NO 産生を増大させることが明らかとなった。

以上のように、C-ペプチドは大動脈および微小血管の内皮細胞に作用し、前者においては G-蛋白質・PI-3K・PKC を介した ERK の活性化により eNOS 遺伝子の発現を増加させ、後者においては ERK に加え p38MAPK を介して転写因子 CREB/ATF1 を活性化させることが明らかとなった。即ち、C-ペプチドは MAP キナーゼのシグナル経路を活性化して遺伝子発現を誘導する機能調節ペプチドであることが示された。この様な血管内皮細胞に対する C-ペプチドの作用が IDDM 患者やモデル動物で認められている C-ペプチドの血流促進効果に関与しているものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	斉藤昌之
副査	教授	桑原幹典
副査	教授	稲葉睦
副査	助教授	木村和弘

学位論文題名

血管内皮細胞におよぼす

プロインスリンC-ペプチドの作用

－ MAP キナーゼを介した遺伝子発現の調節－

C-ペプチドはプロインスリンを構成しているペプチドで、プロインスリンの切断により膵臓β細胞からインスリンと共に分泌される。一般に C-ペプチドには生理活性が無いとされてきたが、最近、インスリン依存性糖尿病の患者やモデル動物に C-ペプチドを投与すると、末梢血流が増大し糖尿病に伴う種々の病態が改善される事が報告された。しかしながら、C-ペプチドに結合する特異的受容体の存在や、血流調節に関わる分子メカニズムは不明である。本学位論文では血管内皮細胞が C-ペプチド応答細胞であることを発見し、C-ペプチドが MAP キナーゼの活性化とそれに続く遺伝子発現を介して血管内皮細胞の機能を調節しうることを明らかにした。

第一章ではまず、C-ペプチド作用の指標として細胞内情報伝達のキー・エンザイムである p44/42 MAP キナーゼ(ERK)のリン酸化(活性化)を検出することで C-ペプチド応答細胞を探した。調べた 11 種類の細胞のうち LEII 血管内皮細胞株と 3T3-F442A および Swiss3T3 線維芽細胞株では、C-ペプチドによる著明なリン酸化の増大が見られたが、肝細胞株や骨格筋細胞株、神経系細胞株では認められなかった。MAP キナーゼファミリーには ERK の他に p38MAPK、JNK があり、いずれも様々な細胞機能に関与することが知られているが、LEII 細胞では ERK に加え p38MAPK の活性化がみられた。ERK と p38MAPK いずれのリン酸化も 1pM の C-ペプチドで促進され生理的血中濃度である 1nM で最大となった。しかし、立体異性体である D 型アミノ酸からなる C-ペプチドやアミノ酸配列を逆にした C-ペプチドでは、高濃度でも MAP キナーゼの活性化は認められなかった。これら

の結果から、生理的濃度の C-ペプチドは、何らかの特異的受容体を介して LEII 血管内皮細胞の MAP キナーゼのシグナル経路を活性化することが明らかとなった。

第二章では、LEII 血管内皮細胞株を用いて C-ペプチドによる MAP キナーゼ活性化の細胞内機構を調べた。C-ペプチドによる ERK と p38MAPK のリン酸化は、いずれも百日咳毒素感受性 G-蛋白質、PI-3 キナーゼ、プロテインキナーゼ C に対する阻害剤で有意に抑制されたので、C-ペプチドはこれらの細胞内因子に共通する経路を介して作用することが示された。MAP キナーゼ機構は、様々な転写因子を介して遺伝子発現の調節に関わることが知られている。そこで、予想される標的転写因子の一つである CREB/ATF の活性化について調べたところ、C-ペプチド刺激によって CREB/ATF1 のリン酸化と DNA への結合が促進された。また阻害剤を用いた検討により、これらの転写因子の活性化には ERK は関与せず p38MAPK とそれにより活性化される MAPK activated protein kinase 2 が関与することが明らかとなった。

しかしながら LEII 細胞は株化された細胞であり、必ずしも生体内での血管内皮細胞と同じ性質を保持しているとは限らない。そこで第三章では、ラットより分離培養した肺微小血管内皮細胞(RLMEC)と大動脈血管内皮細胞(RAEC)を用いて検討した。RLMEC 細胞では、LEII 細胞と全く同様に C-ペプチド刺激によって ERK、p38MAPK、CREB/ATF1 の活性化が促進された。一方、RAEC 細胞では、ERK の活性化のみが認められた。これらの結果は C-ペプチドが血管内皮細胞に直接作用すること、その効果が大動脈と微小血管の内皮細胞では異なることを示している。微小血管内皮細胞においては LEII 細胞と同様に C-ペプチドが p38MAPK~CREB/ATF1 経路によって何らかの遺伝子発現の制御に関わっていると思われる。一方、ERK 経路は血管内皮細胞の機能に重要な内皮型 NO 合成酵素(eNOS)などの遺伝子発現に関与することが知られている。そこで第四章では、RAEC 細胞における eNOS の発現に焦点を絞って解析した。RAEC 細胞を C ペプチドで刺激すると、eNOS の mRNA と蛋白質の発現量が増加し、NO 産生量も約 2 倍となった。これらの変化は ERK 経路の阻害剤でほぼ完全に抑制されたことから、C-ペプチドは ERK 経路を介して eNOS 遺伝子の発現を促進すること、それに伴い血管保護・血管弛緩作用をもつ NO 産生を増大させることが明らかとなった。

以上のように、本研究は、血管内皮細胞に対する C-ペプチドの作用を分子レベルで明らかにしたものであり、生物医科学・基礎獣医学の発展に大きく寄与する成果である。よって、審査員一同は、上記学位論文提出者北村剛規氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。