学位論文題名

Hepatocyte growth factor in vascular cell function:
regulation of endothelial isoform of
nitric oxide synthase and its physiological significance

（肝細胞増殖因子による血管機能の調節：
内皮型一酸化窒素合成酵素 eNOS の活性化と細胞機能への関与）

学位論文内容の要旨

肝細胞増殖因子(HGF)は肝部分切除後に起こる肝再生のための増殖因子として精製され、クローニングの結果、繊維芽細胞や癌細胞が分泌する細胞分散因子(Scatter factor)と同一の分子であることが明らかとなった。その後、HGF は種々の組織の修復再生や乳腺の発達、管腔の形成にも関わるが見出され、それには HGF と特異受容体 c-Met の結合と、それに引き続く受容体チロシンキナーゼによる mitogen-activated protein kinase (MAPK:ERK)経路や phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase)経路の賦活化が重要であるとされている。

これらに加えて、HGF は強い血管新生作用を持つこと、実験的血管障害モデルでは障害部位に HGF が発現することや、HGF を投与すると障害の発生・進展が抑制されることが知られており、ヒトにおいては血管の閉塞等による循環器障害の改善を目指して HGF 遺伝子治療が試みられている。しかしながら、HGF の血管機能調節に関わる分子メカニズムは詳細については不明な点が多い。

一酸化窒素 (NO) は内皮細胞機能の維持や血管の弛緩、血管平滑筋細胞の異常増殖の抑制など様々な役割を持つ。本学位論文では、HGF の血管内皮細胞機能に対する作用について内皮型一酸化窒素合成酵素 eNOS への効果に焦点を絞って解析を行い、血管障害や機能破綻の端緒と考えられている炎症性サイトカインによる細胞接着因子の発現に及ぼす影響を調べた。

ウシ血管内皮細胞株(BAEC)を HGF で刺激すると、その濃度に依存して eNOS 酵素活性が上昇し NO 生成が増加した。酵素活性の上昇と並行して HGF は eNOS 活性化に関与する部位特異的リン酸化を惹起した。このリン酸化は PI3-kinase の阻害剤(wortmannin)で完全に抑制され、MAPK 経路の阻害剤は影響し

なかった。また PI3-kinase によって活性が調節される eNOS リン酸化酵素 protein kinase B/Akt (Akt)のドミナントネガティブ cDNA の細胞への導入は eNOS のリン酸化を抑制した。細胞を wortmannin で処理すると HGF による eNOS 酵素活性の上昇が部分的に抑制されたので、HGF は少なくとも一部は PI3-kinase/Akt 経路を介する eNOS のリン酸化を介して NO 産生を増大させることが明らかとなった。さらに Akt の活性化には HGF による細胞内 Ca^{2+} の増加が必要であることが示唆された。eNOS の酵素活性発現にも細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が必須であることから、HGF による eNOS 活性増大には eNOS のリン酸化に加え細胞内 Ca^{2+} の変化が関与するものと考えられた。

近年、血管内皮細胞は同一の幹細胞に由来するものの、大動脈、微小血管あるいは静脈を構成する内皮細胞は各々異なる性質を示すことが明らかにされつつある。次に HGF に対する応答が血管内皮細胞の種類によって影響を受けるか否かを明らかにするために、微小血管内皮細胞のモデルとして瀕用されるヒト臍帯静脈由来内皮細胞 HUVEC とウシ大動脈由来の BAEC を用い比較検討した。HUVEC を HGF で刺激すると、BAEC 同様に Akt および ERK の活性化と eNOS 酵素活性の上昇が観察された。しかしながら、BAEC とは異なり HUVEC では HGF により p38MAPK も活性化された。すなわち微小血管内皮では大動脈内皮とは異なる HGF 応答が惹起されうること、微小血管においても eNOS 活性を変化させることで HGF の機能が発現されることが示唆された。

上記のような HGF の血管系に対する作用の生理的意義を明らかにするため、炎症時に発現が増大する細胞接着因子 E-selectin の動態に及ぼす影響を HUVEC を用いて調べた。腫瘍壊死因子 TNF- α で細胞を刺激すると強い E-selectin mRNA の発現がみられたが、細胞を HGF で予め処理すると、その濃度に依存して TNF- α の作用が抑制された。また HUVEC においても HGF は eNOS 活性を増加させ、その効果は NO 合成阻害剤 L-NAME や wortmannin で抑制された。また HGF の TNF- α による E-selectin mRNA の発現に対する抑制効果も、L-NAME や wortmannin によって阻害された。つまり HGF は NO 産生の促進を介して TNF- α による細胞接着因子発現を抑制することが示された。

以上のように本研究では、HGF が血管内皮細胞の種類に係らず一酸化窒素 NO の産生を eNOS のリン酸化を促進して増大させること、その NO 産生を介して血管障害の最初のステップである細胞接着因子の発現を抑制することを明らかにした。これらの新知見は、HGF の血管保護機構の一端を明らかにしたものであり、HGF あるいはその遺伝子を用いた血管障害の治療に寄与すると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齊 藤 昌 之
副 査 教 授 安 居 院 高 志
副 査 助 教 授 稲 波 修
副 査 助 教 授 木 村 和 弘

学 位 論 文 題 名

Hepatocyte growth factor in vascular cell function: regulation of endothelial isoform of nitric oxide synthase and its physiological significance

(肝細胞増殖因子による血管機能の調節：
内皮型一酸化窒素合成酵素 eNOS の活性化と細胞機能への関与)

肝細胞増殖因子(HGF)は肝臓を始めとして種々の組織の修復再生や乳腺の発達、管腔の形成に関わる増殖因子であるが、強い血管新生作用を持つことが知られている。本博士論文は、HGF の血管機能調節の分子メカニズムについて、血管の弛緩や内皮細胞の機能維持に関わる一酸化窒素(NO)とその合成酵素 endothelial isoform of nitric oxide synthase (eNOS) に焦点を絞って検討したものである。

第1章では、ウシ大動脈血管内皮細胞株(BAEC)を用いて、HGF 刺激によって濃度・時間依存的に eNOS 酵素活性が上昇し NO 生成が増加することを見出し、この eNOS 活性の上昇と並行して eNOS 部位特異的リン酸化が起こることを確認した。HGF 刺激による eNOS リン酸化と活性化は、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase)の阻害剤(wortmannin)や、PI3-kinase によって活性が調節される eNOS リン酸化酵素 protein kinase B/Akt (Akt)のドミナントネガティブ cDNA の細胞への導入によって抑制されたが、mitogen-activated protein kinase (MAPK:ERK)経路の阻害剤では影響されなかった。さらに、Akt の活性化には HGF による細胞内 Ca^{2+} の増加が必要であることが示された。eNOS の酵素活性発現に細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が必須であることを考え併せて、HGF による eNOS 活性増大には Akt による eNOS のリン酸化と細胞内 Ca^{2+} の増加が重要であると結論した。

血管内皮細胞は同一の幹細胞に由来するものの、大動脈、微小血管あるいは静脈を構成する内皮細胞は各々異なる性質を示すことが知られている。そこで第2章では、HGF に

対する応答が各内皮細胞で異なるか否かを明らかにするために、ヒト臍帯静脈由来内皮細胞 HUVEC を用いて検討した。HUVEC を HGF で刺激すると、BAEC と同様に Akt および ERK の活性化と eNOS 酵素活性の上昇が観察された。しかし BAEC とは異なり HUVEC では HGF により p38MAPK も活性化された。このように、HGF は HUVEC においても eNOS を活性化しうるが、BAEC とは異なる応答も惹起することが明らかになった。

血管内皮細胞に対する HGF 作用の生理的意義を明らかにするために、第 3 章では HUVEC を用いて炎症時に発現する細胞接着因子 E-selectin に及ぼす影響を調べた。腫瘍壊死因子 TNF- α で細胞を刺激すると E-selectin mRNA 発現が著しく増加し、実際に好中球の接着が起こったが、予め HGF で処理するとその濃度に依存して TNF- α に対する応答が抑制された。この HGF の抑制効果は、NO 合成阻害剤 N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) や wortmannin で解除された。なお、これら 2 種類の阻害剤が HGF による eNOS 活性化を抑制することも確認した。これらの結果から、HGF は NO 産生の促進を介して TNF- α による細胞接着因子の発現を抑制すると結論した。

以上のように本博士論文は、HGF が血管内皮細胞での eNOS のリン酸化を促進して NO の産生を増大させ、血管障害誘発の初期反応である細胞接着を抑制することを明らかにした。これらの成果は、HGF の血管保護メカニズムの一端を明らかにしたものであり、獣医学の発展に大きく寄与するものである。よって審査委員一同は、Makondo Kennedy 氏が博士（獣医学）の学位を受けるに充分の資格があると認めた。