



Lysophosphatidyl Choline Inhibits Endothelial Cell Migration and Proliferation via Inhibition of Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway

力武，良行

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2000-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2118

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002118>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	りき たけ よし ゆき 力 武 良 行	(佐賀県)
博士の専攻 分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	博い第1261号	
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当	
学位授与の日付	平成12年3月31日	
学位論文題目	Lysophosphatidylcholine Inhibits Endothelial Cell Migration and Proliferation via Inhibition of Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway (リゾフォスファチジルコリンはERK経路の抑制を介して内皮細胞の遊走と増殖を抑制する。)	
審査委員	主査 教授 横山光宏 教授 春日雅人 教授 久野高義	

論文内容の要旨

[緒言]

血管内皮細胞の遊走、増殖は、血管新生、胎児脈管形成、創傷の修復、癌の転移など、生理的な状況と病的な状況の両者において重要な役割を果たしている。線維芽細胞増殖因子(FGF-2)や血管内皮細胞増殖因子等の増殖因子は、それぞれ特異的な受容体に作用し、種々の細胞内情報伝達経路の活性化を介して、血管内皮細胞の遊走、増殖を制御していると考えられている。FGF-2は、低分子量GTP結合蛋白質のRasを活性化し、Raf-1、MEKの活性化を介して下流のERKを活性化するが、ERK経路が細胞増殖に深く関与することが明らかとなりつつあるのに対し、細胞遊走におけるERK経路の役割に関してはほとんど検討されていない。

酸化低比重リポ蛋白質中の主要リン脂質であるリゾフォスファチジルコリン(lyoPC)は、動脈硬化の病態形成において重要な役割を担う因子の一つである。即ち、lyoPCは血管内皮細胞に作用して、接着因子や増殖因子の遺伝子発現を誘導し、一酸化窒素など内皮由来血管弛緩因子の産生を抑制し、血管内皮細胞の遊走、増殖を抑制することが報告されている。しかしながら、lyoPCによる血管内皮細胞の遊走、増殖の抑制の分子機構は明らかではない。

本研究では、lyoPCが血管内皮細胞の遊走、増殖を抑制する分子機構を明らかにするため、細胞遊走、増殖におけるERK経路の役割について検討するとともに、lyoPCがERK経路に及ぼす影響について検討した。

[方法]

ウシ大動脈から調整した培養血管内皮細胞を用いた。血管内皮細胞の遊走能はBoyden chamberを用いて、増殖能は実際の細胞数を計測して評価した。MEK1の218番目と222番目のアミノ酸SerをGluに置換した活性化型MEK1(MEK1 EE), MEK1の208番目のアミノ酸AspをAlaに置換したドミナントネガティブ型MEK1(MEK1 DN)の各々のcDNAを、サイトメガロウイルスのエンハンサー、ニワトリベータアクチンのプロモーターからなるCAプロモーターに挿入したコスミドを作製し、

293細胞を用いて相同組換えを行ない、組換えアデノウイルスベクターを作製した。これら組換えアデノウイルスベクターを用いて、血管内皮細胞に遺伝子導入を行った。ERKのリン酸化、活性化は全細胞抽出液を用い、それぞれ、リン酸化特異的抗体を用いたイムノプロット法、MBPを基質としたゲル内リン酸化法にて測定した。Rasの活性化は、活性型Rasと特異的に結合するRaf-1のRas結合配列とGSTの融合蛋白による沈降物を、抗Ras抗体を用いたイムノプロット法にて評価した。PLC- γ のチロシンリン酸化は、抗PLC- γ 抗体による免疫沈降物を抗リン酸化チロシン抗体を用いたイムノプロット法にて評価した。

[結果]

1. FGF-2刺激による血管内皮細胞の遊走、増殖に対するMEK阻害剤PD98059の効果

FGF-2刺激による血管内皮細胞の遊走、増殖におけるERKの役割を明らかにするため、ERKの上流にあるMEKの特異的阻害剤PD98059の効果について検討した。FGF-2によるERKの活性化は10–100 μ MのPD98059の前処置により、濃度依存性に抑制された。FGF-2による血管内皮細胞の遊走、増殖は同濃度のPD98059により、濃度依存性に抑制されたことより、ERKがFGF-2刺激による血管内皮細胞の遊走、増殖に関与しているものと考えられた。

2. FGF-2刺激による血管内皮細胞の遊走、増殖に対するMEK1 DN、MEK1 EEの過剰発現の効果

血管内皮細胞の遊走、増殖におけるERKの役割をさらに検討するため、ドミナントネガティブ型MEK1(MEK1 DN)、活性化型MEK1(MEK1 EE)を組換えアデノウイルスベクターを用いて、血管内皮細胞に遺伝子導入した。この際、ベータガラクトシダーゼをネガティブコントロールとして用いた。30moiの感染により、100%の遺伝子導入効率が得られた。MEK1 DNを過剰発現させた血管内皮細胞ではFGF-2によるERKの活性化はほぼ完全に抑制された。一方、MEK1 EEを過剰発現させた血管内皮細胞では、無刺激の状態でもFGF-2刺激とほぼ同程度にERKが活性化された。MEK1 DNを過剰発現させた血管内皮細胞ではFGF-2刺激による遊走、増殖はほぼ完全に抑制され、反対に、MEK1 EEを過剰発現させた血管内皮細胞では、遊走、増殖は無刺激の状態でもFGF-2刺激とほぼ同程度に促進された。以上の結果から、FGF-2刺激による血管内皮細胞の遊走、増殖は主に、ERKを介しているものと考えられた。

3. FGF-2刺激による血管内皮細胞の遊走、増殖に対するlysoPCの効果

FGF-2刺激による血管内皮細胞の遊走、増殖をlysoPCは1–10 μ g/mLの範囲で濃度依存性に抑制した。しかしながら、この濃度においては、無刺激状態での血管内皮細胞の遊走、増殖にはほとんど影響しなかった。

4. FGF-2によるERKの活性化をlysoPCは抑制する。

FGF-2によるERKの活性化に対するlysoPCの効果について検討した。FGF-2により、ERKは刺激後、10分をピークに一過性に活性化されたが、どの時点においてもlysoPCによりERKの活性化は抑制された。FGF-2によるERKの活性化はlysoPC 1–10 μ g/mLの範囲で濃度依存性に抑制されたが、ホルボールエステルによるERKの活性化は抑制されなかった。これらの結果より、lysoPCによる血管内皮細胞の遊走、増殖の抑制にはFGF-2によるERKの活性化を抑制していることが重要

な役割を果たしていることが示唆された。

5. lysoPC は FGF-2 による Ras の活性化を抑制するが、PLC- γ のチロシンリン酸化は抑制しない。

lysoPC が FGF-2 による ERK の活性化を抑制するメカニズムを明らかにするため、ERK の上流に存在する Ras の活性化に対する lysoPC の効果について検討した。FGF-2 による Ras の活性化は lysoPC により抑制された。FGF-2 は FGF 受容体と結合する結果、受容体チロシンキナーゼ活性を刺激し、FGF 受容体と PLC- γ との会合を亢進させる。それにともない、PLC- γ のチロシンリン酸化は亢進する。そこで lysoPC が FGF 受容体のチロシンキナーゼ活性に及ぼす影響を調べるために、PLC- γ のチロシンリン酸化に対する lysoPC の効果について検討した。PLC- γ のチロシンリン酸化は FGF-2 で刺激後、5 分をピークに一過性に亢進したが、lysoPC により影響されなかった。したがって、lysoPC は FGF-2 と FGF 受容体との結合や FGF 受容体のチロシンキナーゼ活性を抑制しないものと考えられた。

[考察]

今回の実験結果より、ERK 活性は FGF-2 刺激による血管内皮細胞の遊走、増殖において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。血管内皮細胞の遊走、増殖は、ともに MEK 阻害剤により濃度依存性に抑制され、また MEK1 DN を過剰発現させた血管内皮細胞では FGF-2 刺激による遊走、増殖はほぼ完全に抑制され、反対に、MEK1 EE を過剰発現させた血管内細胞では、遊走、増殖は無利激の状態でも促進された。従って、ERK の活性は血管内皮細胞の遊走、増殖に必要且つ十分であると考えられた。

ERK 活性が細胞増殖に果たす役割についてはほぼ確立されているのに対し、ERK 活性が血管内皮細胞の遊走を制御するメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。増殖因子により、すみやかに ERK が活性化されるとともに、血管内皮細胞の遊走が開始されることにより、ERK は新たな遺伝子発現を介さずに、遊走に関する細胞内機構を活性化するものと考えられる。Klemke らは、ERK がミオシン軽鎖キナーゼの活性化を介してミオシン軽鎖をリン酸化することにより、細胞遊走を制御していると報告している。一方、Sa は ERK が細胞質型ホスフォリバーゼ A2 を活性化することにより、細胞遊走をもたらすと報告している。ホスフォリバーゼ A2 の作用により産生されたアラキドン酸やその代謝産物は、種々の細胞の遊走に関与していることが報告されており、こうしたミオシン軽鎖キナーゼやホスフォリバーゼ A2 依存性の経路が、血管内皮細胞における ERK 依存性の細胞遊走においても関与しているものと推察される。

本研究から、lysoPC が FGF-2 による ERK の活性化を抑制することが、lysoPC による血管内皮細胞の遊走、増殖の抑制に重要な役割を果たしていると考えられた。ホルボールエステルによる ERK の活性化は Raf-1 を介しており、このホルボールエステルによる ERK の活性化は lysoPC により抑制されなかったことから、lysoPC は FGF-2 による Ras の活性化を抑制することにより、ERK の活性化を抑制しているものと考えられた。さらに、lysoPC は FGF-2 による PLC- γ のチロシンリン酸化を抑制しなかったことより、lysoPC は FGF-2 と FGF 受容体との結合や FGF 受容体のチロシンキナーゼ活性を抑制するのではなく、FGF 受容体から Ras の活性化に至る経路を阻害するか、あるいは RasGAP の活性化を介して Ras の不活性を亢進させている可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

血管内皮細胞の遊走、増殖は、血管新生、胎児脈管形成、創傷の修復、癌の転移など、生理的な状況と病的な状況において重要な役割を果たしている。線維芽細胞増殖因子（FGF-2）や血管内皮細胞増殖因子等の増殖因子は、それぞれ特異的な受容体に作用し、種々の細胞内情報伝達経路の活性化を介して、血管内皮細胞の遊走、増殖を制御していると考えられている。FGF-2は、低分子量GTP結合蛋白質のRasを活性化し、Raf-1、MEKの活性化を介して下流のERKを活性化するが、ERK経路が細胞増殖に関与することが明らかとなりつつあるのに対し、細胞遊走におけるERK経路の役割に関してはほとんど検討されていない。

酸化低比重リポ蛋白質中の主要リン脂質であるリゾフォスファチジルコリン（lysoPC）は、動脈硬化の病態形成において重要な役割を担う因子の一つであり、多彩な生物作用を示すことが報告されている。

本研究では、lysoPCが血管内皮細胞の遊走、増殖を制御する分子機構を明らかにするため、細胞遊走、増殖におけるERK経路の役割について検討するとともに、lysoPCがERK経路に及ぼす影響について検討した。

ウシ大動脈から調整した培養の血管内皮細胞を用い、細胞の遊走能はBoyden chamberを用いて、増殖能は実際の細胞数を計測して評価した。ERKのリン酸化、活性化は全細胞抽出液をリン酸化特異的抗体を用いたイムノプロット法、MBPを基質としたゲル内リン酸化法にて測定した。Rasの活性化は抗Ras抗体を用いたイムノプロット法にて評価した。PLC- γ のチロシンリン酸化は、抗PLC- γ 免疫沈降物を抗リン酸化チロシン抗体を用いたイムノプロット法にて評価した。

以下の結果を得た

1. FGF-2による血管内皮細胞の遊走、MEKの特異的阻害剤PD98059により、濃度依存性に抑制されたことから、ERKがFGF-2刺激による血管内皮細胞の遊走、増殖に関与していることが判明した。
2. 血管内皮細胞の遊走、増殖におけるERKの役割をさらに検討するため、ドミナントネガティブ型MEK1(MEK1 DN)、活性化型MEK1(MEK1 EE)を組換えアデノウイルスベクターを用いて、血管内皮細胞に遺伝子導入した。MEK1 DNを過剰発現させた血管内皮細胞ではFGF-2によるERKの活性化と遊走、増殖はほぼ完全に抑制された。一方、MEK1 EEを過剰発現させた血管内皮細胞では、無刺激の状態でもFGF-2刺激とほぼ同程度にERKが活性化され、遊走、増殖も促進された。以上の結果から、FGF-2刺激による血管内皮細胞の遊走、増殖は主に、ERKを介しているものと考えられた。
3. FGF-2刺激による血管内皮細胞の遊走、増殖をlysoPC(1-10 μ g/mL)は濃度依存性に抑制した。しかしながら、この濃度においては、無刺激状態での血管内皮細胞の遊走、増殖にはほとんど影響しなかった。
4. ERKはFGF-2刺激後、10分をピークに一過性に活性化されたが、どの時点においてもlysoPCによりERKの活性化は抑制された。一方lysoPCはホルボールエステルによるERKの活性化を抑制しなかった。これらの結果により、lysoPCによる血管内皮細胞の遊走、増殖の抑制にはFGF-2によるERKの活性化を抑制していることが重要な役割を果たしていることが示された。
5. lysoPCがFGF-2によるERKの活性化を抑制するメカニズムを明らかにするため、Rasの活性

化に対する lysoPC の効果について検討した。FGF-2 による Ras の活性化は lysoPC により抑制された。FGF-2 は FGF 受容体と結合する結果、受容体チロシンキナーゼ活性を刺激し、FGF 受容体と PLC- γ との会合を亢進させる。それにともない、PLC- γ のチロシンリン酸化は亢進する。そこで PLC- γ のチロシンリン酸化に対する lysoPC の効果について検討した。PLC- γ のチロシンリン酸化は FGF-2 で刺激後、5 分をピークに一過性に亢進したが、lysoPC により影響されなかった。したがって、lysoPC は FGF 受容体との結合や FGF 受容体のチロシンキナーゼ活性を抑制しないものと考えられた。

本研究は血管内皮細胞における FGF-2 の遊走、増殖のメカニズムと酸化低比重リポ蛋白質中の主要リン脂質であるリゾフォスファチジルコリンの FGF-2 による遊走、増殖を抑制する分子機構を検討したものであるが、FGF-2 による血管内皮細胞の増殖と遊走に ERK の活性化は不可欠であり、リゾフォスファチジルコリンは FGF-2 と FGF 受容体との結合や FGF 受容体のチロシンキナーゼ活性を抑制するのではなく FGF-2 による Ras の活性化を抑制することにより、下流の ERK の活性化を抑制していることを初めて明らかにした。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるとの結論に至りました。