

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	循環病態科学領域 循環病態内科学教育研究分野 氏名 成田 憲紀
(論文題目) Involvement of β-Arrestin in Endothelin Receptor Signaling : A Possible Role in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension (エンドセリン受容体シグナル伝達における β アレスチンの役割:肺高血圧症の新たな病態解明に向けて)	
【背景】 エンドセリン(ET)は強力な血管収縮物質であり、G 蛋白質共役受容体(GPCR)スーパーファミリーに属するエンドセリン受容体(ET-R)を介してその生理作用を発揮する。ET-R には A 型および B 型の 2 つのサブタイプがある。A 型は血管収縮作用および強心作用を有し、一方、B 型は A 型の作用に拮抗することが知られている。 β -Arrestin (β -Arr)は GPCR の再利用に関与する分子として発見されたが、近年、 β -Arr が G タンパクとは別の、独自のシグナル伝達経路においても重要な役割を担っていることが報告され、世界中で多くの研究がなされている。さらに ET-R は肺高血圧症 (PAH) の病態にも深く関与している。本研究の目的は、ET-R シグナル伝達における β -Arr の役割を明らかにし、肺高血圧症(PAH)の新たな病態を解明することである。	
【方法】 1. siRNA を用いて HEK293 細胞の β -Arr1 または β -Arr2 をノックダウンし、ET 刺激 (10nM)による extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 のリン酸化をウエスタンブロット法で測定した(n=10)。 2. アンジオテンシン II 受容体(ATR)や β アドレナリン受容体(β AR)において、リガンドによる受容体の活性化は、G タンパクのみならず β アレスチンを介した Epidermal growth factor receptor (EGFR)の活性化によってもその生理作用を発揮する。本研究では、ET-R における EGFR の活性化(transactivation)の有無を調べるため、HEK293 細胞に緑色蛍光タンパク質(GFP)が付加された EGFR のプラスミドをリポフェクタミン 2000 を用いてトランスフェクションし、その細胞内の局在を ET の刺激(10nM)前後で共焦点顕微鏡を用いて観察した。 3. EGFR の transactivation を、EGFR 阻害薬 AG1478 を用いてウエスタンブロット法で確認した。AG1478(1 μ M)または G タンパクの下流シグナルである Protein kinase C (PKC)の阻害薬 Ro318425(1 μ M)の前投与下に HEK293 細胞を ET(10nM)で刺激し、ERK1/2 のリン酸化をウエスタンブロット法で測定した(n=8)。 統計的有意性は、GraphPad Prism 7 ソフトウェアを用いて、Tukey の補正を用いた二元分散分析 (ANOVA) により決定した。P 値<0.05 を統計学的有意とした。	
【結果】 1. β -Arr1 または β -Arr2 のノックダウンによって ET 刺激後 5 分後および 10 分後における ERK 1/2 のリン酸化が亢進した。 2. EGFR は、ET 刺激前は細胞膜に局在していたが、ET 刺激後には細胞内へ移動	

(internalization)し、集簇化していた(transactivation)。陽性コントロールとして EGF (10ng/ml)を用いた。

3. AG1478 または Ro318425 の前投与により、ET 刺激による ERK1/2 のリン酸化は抑制された。

【考察】

本研究では HEK293 細胞の ET-R において、 β -Arr1 または β -Arr2 のノックダウンが ET 刺激による ERK1/2 のリン酸化を亢進させ、また ET-R の活性化によって EGFR が transactivation されることを示した。

β -Arr のノックダウンによって、アゴニストの刺激による ERK1/2 のリン酸化が亢進するか抑制されるかは、受容体によって異なる。 β AR では β -Arr1 または β -Arr2 のノックダウンによって ERK1/2 のリン酸化は抑制される。一方、ATR では β -Arr2 のノックダウンにより ERK1/2 のリン酸化が抑制されるのに対して、 β -Arr1 のノックダウンでは ERK1/2 のリン酸化が亢進する。本研究では β -Arr1 または β -Arr2 のノックダウンによって ERK1/2 のリン酸化が亢進したが、その機序として ET-R の脱感作が抑制されたことが考えられる。GPCR はアゴニストの結合によって活性化されるとすぐに GPCR-related kinase によって C 末端がリン酸化されることによって速やかに脱感作される。脱感作には β -Arr が必要とされており、ET-R においては β -Arr がノックダウンされることによって ET-R の脱感作が抑制された。その結果として G タンパク、PKC を介した経路の活性化が促進して、ERK1/2 のリン酸化が亢進したと推測される。

EGFR は EGF や Transforming growth factor- α 、Heparin-binding EGF-like growth factor によって活性化され、Akt や ERK1/2 をはじめとする mitogen-activated protein kinase の活性化を介して抗アポトーシス作用や線維化の促進をもたらす。本研究では ET-R の活性化によって EGFR が transactivation されることを 2 つの実験系によって示した。

PAH は肺動脈の進行性の狭窄、線維化を特徴とする難治性の疾患であり、現在 ET-R 拮抗薬を含む治療薬が臨床で使用されているが、その効果は必ずしも満足のいくものではない。本研究においては、ET-R において β -Arr および EGFR がそのシグナル伝達機構に含まれ、ERK1/2 のリン酸化に関与することが示された。ERK1/2 のリン酸化は組織の線維化を促進することが過去の報告から示されており、 β -Arr が PAH の病態形成、進行に関与している可能性がある。これらの結果は、PAH の病因に新たな知見をもたらし、今までとは異なる新たな視点から治療薬の開発に貢献する可能性がある。ET-R における β -Arr の役割、および PAH の病態形成におけるその関与を解明するために、さらなる研究が必要である。