

血管リモデリングに関する新規創薬ターゲット分子の解明

堀之内 孝広 [北海道大学大学院医学研究科細胞薬理学分野／助教]

背景・目的

社会の高齢化や食生活の欧米化に伴って、糖尿病や肥満といった生活習慣病の罹患者が、急増している。動脈硬化症などの慢性的な血管疾患の発症リスクを高める生活習慣病の発症・進展を抑制するために、生活習慣の改善や薬物による代謝改善に重点を置いた対策が取られている。しかし、動脈硬化症をはじめとする大血管症の発症リスクは、これらの対策を講じても軽減しないといった重大な問題が存在している。

本研究では、血糖やコレステロールなどの代謝関連因子ではなく、動脈硬化症の発症・進展に関与する G タンパク質共役型受容体(GPCR)及び GPCR 連関シグナル分子に着目し、動脈硬化症の病態基盤となる血管リモデリングの抑制に貢献できる新規創薬ターゲット分子を提唱することを目的とした。

内容・方法

代表的な GPCR であるエンドセリン A 型受容体(ET_{AR})刺激によって活性化されるシグナル分子を明らかにするため、細胞内 Ca²⁺濃度測定装置及び細胞外酸排出速度測定装置(Cytosensor™ Microphysiometer)を用いて、ET_{AR} を介して引き起こされる細胞内 Ca²⁺濃度上昇反応ならびに酸排出速度上昇反応に関与する細胞内情報伝達機構の解析を行った。また、これらの反応において、重要な役割を担っていることが示唆された p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) の活性化状態を Western blot 法により解析した。さらに、[³H]thymidine 取り込み実験を行い、ET_{AR} 刺激によりもたらされる細胞増殖促進反応について、検討した。

この他、ヒト ET_{AR} の C 末端と細胞内で直接相互作用するシグナル分子を単離・同定するため、ヒト心臓 cDNA ライブライマーを用いた酵母 two-hybrid 法を行った。

結果・成果

ヒト ET_{AR} を強制発現させた CHO 細胞に蛍光性 Ca²⁺指示薬である fura-2 を負荷し、ET-1 による細胞内 Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i) 変化を測定した。ET-1 刺激前の [Ca²⁺]_i は、約 60 nM と低いレベルに保たれているが、0.3 nM ET-1 刺激によって [Ca²⁺]_i は約 360 nM まで上昇した。ET-1 による [Ca²⁺]_i 上昇反応は二相性を示し、一過性の [Ca²⁺]_i 上昇反応に引き続いて、顕著な持続性の [Ca²⁺]_i 上昇反応が認められた。このうち、血管リモデリングに関与する持続性の [Ca²⁺]_i 上昇反応に着目した解析を行ったところ、ET-1 によって引き起こされる持続性の [Ca²⁺]_i

上昇反応は、G_{q/11} タンパク質阻害薬及び PLC 阻害薬により顕著に抑制されることが明らかになった。このことから、ET-1 による持続性の Ca²⁺流入に典型的なシグナルカスケードである G_{q/11}/PLC 系が関与していることが示唆された。

さらに、心血管系疾患の発症・進展に関与していると考えられている p38MAPK 及び TRPC(transient receptor potential canonical) チャネルの寄与について検討したところ、ET-1 による持続性の [Ca²⁺]_i 上昇反応は、p38 MAPK 阻害薬及び TRPC チャネル阻害薬により抑制された。これらの知見から、ET_{AR} 刺激により引き起こされる持続性の Ca²⁺流入に、p38MAPK や TRPC チャネルもまた、重要な役割を担っていることが明らかになった。

ところが、[Ca²⁺]_i 上昇反応とは異なり、ET-1 により引き起こされる細胞外酸排出速度上昇反応は、p38MAPK 阻害薬によって抑制されたものの、G_{q/11} 及び PLC 阻害薬による影響は、ほとんど受けなかった。この結果から、G_{q/11}/PLC 系を介さない p38MAPK の活性化機構が、ET_{AR} を介した細胞外酸排出速度上昇反応に関与していることが示唆された。

そこで、Western blot 法により、p38MAPK の活性化機構を解析したところ、ET_{AR} により引き起こされる p38MAPK のリン酸化量の上昇は、G_{q/11}/PLC 非依存性機構を介することが確認された。

この他、[³H]thymidine 取り込み実験を行い、血管リモデリングの分子基盤となる ET-1 の細胞増殖作用について、検討した。その結果、ET-1 を 24 時間処理することによって、濃度依存的に細胞増殖が促進されることが明らかになった。

また、循環器疾患の発症・進展に関与する新規創薬ターゲット分子を単離・同定するために、ヒト心臓 cDNA ライブライマーを用いた酵母 two-hybrid 法を行ったところ、Annexin 2 や Jun activation domain-binding protein (Jab1) をはじめとする 25 種類の分子を得ることに成功した。

今後の展望

今後、GPCR と直接相互作用する Annexin 2 などのシグナル分子や、シグナルカスケードの上流で TRPC チャネルの機能を制御している p38MAPK といった分子が、持続的な [Ca²⁺]_i 上昇を病態基盤とする動脈硬化症などの循環器疾患に対する新たな創薬ターゲットになることが予想される。また、ET-1 刺激により、ET_{AR}/Annexin 2/TRPC チャネル複合体が、細胞膜近傍に存在するカベオラ膜脂質マイクロドメインにおいて形成された結果、持続的な Ca²⁺流入が生じている可能性も十分に考えられる。