

【23】

氏 名 (本籍)	清 <sup>し</sup> 水 <sup>みず</sup> 英 <sup>ひで</sup> 寿 <sup>ひさ</sup> (群馬県)		
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 3570 号		
学位授与年月日	平成 16 年 12 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科		
学 位 論 文 題 目	<b>Study on Protein Tyrosine Phosphatases Involved in Vascular Remodeling</b> (血管再構築に関わるプロテインチロシンホスファターゼに関する研究)		
主 査	筑波大学教授	農学博士	馬 場 忠
副 査	筑波大学助教授	農学博士	宮 崎 均
副 査	筑波大学教授	農学博士	深 水 昭 吉
副 査	筑波大学教授	理学博士	藤 村 達 人

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

動脈硬化に基づく疾患が日本人の死亡原因の 3 分の 2 であることを考えると、その原因の解明は現代の最重要課題のひとつである。動脈は、内膜にある内皮細胞、中膜にある平滑筋細胞、コラーゲンが主要成分となっている外膜の 3 層から構成されている。しかし、血管傷害による内皮細胞のアポトーシスを発端に、平滑筋細胞は脱分化することで収縮能を失い、代わりに遊走能、そこでの増殖能を有するようになり、動脈硬化の典型的な病理像である内膜肥厚が形成される。したがって、このような過程を理解するためには、内皮細胞や平滑筋細胞の細胞レベルで分子機構を解明することが非常に重要であると考えられる。現在までに、内皮細胞や平滑筋細胞の動脈硬化に関係する研究において、タンパク質のチロシン残基をリン酸化するプロテインチロシンキナーゼ (PTK) の研究が活発に進められてきた。しかし、その逆反応を司るプロテインチロシンホスファターゼ (PTP) に着目した研究は、PTK に比べ極めて遅れているのが現状である。そこで本研究では、まず内皮細胞及び平滑筋細胞で発現している PTP の同定を行い、特に両細胞で発現する PTP に焦点を当てることにした。解析の結果、PTP<sub>ε</sub>M、LMW-PTP、及び PTP1B が両細胞で発現していることが確認された。本研究では、受容体型 PTP である PTP<sub>ε</sub>M と細胞質型 PTP である LMW-PTP に着目し、内皮細胞及び平滑筋細胞におけるそれらの機能解析を行うことを目的とした。

PTP<sub>ε</sub> は遺伝子内に 2 つのプロモーター領域を持ち、これを使い分けることにより、受容体型 PTP である PTP<sub>ε</sub>M と細胞質型 PTP である PTP<sub>ε</sub>C の 2 つのアイソフォームを産生する。興味深いことに、内皮細胞においては PTP<sub>ε</sub>M と PTP<sub>ε</sub>C が共に発現していたが、平滑筋細胞では PTP<sub>ε</sub>M のみが発現していた。平滑筋細胞では、PTP<sub>ε</sub>M は PDGF 依存的な p38 の活性化を抑制したが、ERK の活性化には影響を与えなかった。また、DNA 合成及び遊走を PTP<sub>ε</sub>M と p38 の阻害剤は共に阻害することから、PTP<sub>ε</sub>M は p38 の活性化経路を抑制することで DNA 合成、遊走を制御すると考えられる。PDGF をはじめとする各種増殖因子は、受容体と結合することで細胞内に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を発生させ、PTP を不活性化すると報告されている。そこで、PDGF 依存的な H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の産生量を測定した結果、PTP<sub>ε</sub>M は顕著に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の産生を低下させていた。また、これらの作用機序として、PTP<sub>ε</sub>M は PDGF 受容体を直接脱リン酸化することにより H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の産生を阻害し、その結果 p38

の活性化を抑制していることが明らかになった。一方、内皮細胞においては、PTP $\epsilon$ M が c-Src を直接活性化することで、増殖因子非依存的に DNA 合成、遊走、細胞の生存率を上昇させていた。

LMW-PTP は、スプライシングの違いにより IF-1、IF-2 の 2 つのアイソフォームを持つ。また、LMW-PTP にはいくつかの多型の存在が確認されており、それらは PTP 活性に影響をあたえ、心肥大を含め種々の病態と関連することが示唆されている。平滑筋細胞において、両アイソフォーム共に PDGF 依存的な p38 の活性化を抑制したが、ERK の活性化については影響を与えなかった。また、PDGF 刺激による DNA 合成、遊走も、両アイソフォームと p38 の阻害剤で低下した。したがって、LMW-PTP の両アイソフォームは PDGF 依存的に活性化される p38 の経路を抑えることで、DNA 合成、遊走を抑制したと考えられる。また、内皮細胞では少なくとも IF-1 は PDGF 依存的な DNA 合成と遊走を促進した。

以上の結果より、PTP $\epsilon$ M と LMW-PTP は、共に平滑筋細胞の増殖、遊走を負に制御し、逆に、内皮細胞においては、傷害をうけた細胞を修復させる作用を持つことが明らかになった。したがって、両分子は内皮細胞と平滑筋細胞において逆の作用を示すことで血管再構築を抑制し、動脈硬化の発症・進展に対する負の制御因子として働く可能性が強く示唆された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

動脈硬化の典型的な病理像である内膜肥厚は、血管傷害による内皮細胞のアポトーシスを発端とする平滑筋細胞の脱分化、内膜への遊走、そこでの増殖を通して形成される。動脈硬化に関わる内皮細胞や平滑筋細胞の研究では、プロテインチロシンキナーゼの研究が活発に進められてきた。しかし、その逆反応を司るプロテインチロシンホスファターゼに着目したものは、極めて遅れているのが現状である。本博士論文の研究は、内皮細胞および平滑筋細胞で発現する PTP の同定を行い、特に両細胞で発現する受容体型 PTP である PTP $\epsilon$ M と細胞質型 PTP である LMW-PTP に着目して、細胞におけるそれぞれの機能を明確にする目的で行われた。

平滑筋細胞において、PTP $\epsilon$ M は動脈硬化の発症・進展に深く関わる PDGF による DNA 合成と遊走を抑制してきた。この作用機序として、PTP $\epsilon$ M が PDGF 受容体を直接脱リン酸化し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の産生経路を抑制することで p38 の活性化を阻害することが重要であることを明らかにしている。一方、内皮細胞では PTP $\epsilon$ M が c-Src を直接活性化することで、増殖因子非依存的に遊走および細胞の生存率を上昇させていた。また、LMW-PTP はスプライシングの違いにより IF-1 と IF-2 の 2 つのアイソフォームを持つが、平滑筋細胞で両アイソフォームは共に PDGF 依存的な p38 の活性化を抑制し、DNA 合成と遊走を低下させていた。逆に、IF-1 は内皮細胞で PDGF 依存的な DNA 合成と遊走を促進していた。

このように、PTP $\epsilon$ M と LMW-PTP は内皮細胞と平滑筋細胞において逆の作用を示すことで血管再構築を抑制し、動脈硬化の発症・進展に対する負の制御因子として働く可能性を強く示唆している。これらの知見は新規のものであり、動脈硬化の発症・進展に関わる血管研究での PTP 機能の重要性を提示した先駆的研究として高く評価できる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。