

氏 名	すず 鈴 ま 間 きよし 潔
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1804 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Characterization of protein kinase c β isoform's action on retinoblastoma protein phosphorylation, vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation, and retinal neovascularization (Rb5 蛋白のリン酸化, 血管内皮増殖因子依存性の細胞増殖, 網膜血管新生におけるプロテインキナーゼ C β の役割の検討)
論文調査委員	(主 査) 教 授 清 野 裕 教 授 西 川 伸 一 教 授 本 田 孔 士

論 文 内 容 の 要 旨

糖尿病網膜症や未熟児網膜症に代表される虚血性網膜血管新生は失明につながる重篤な病態です。近年, 血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) が虚血性網膜血管新生を起こす主要因子であることが明らかとなり眼科領域でも様々な研究が進んでいます。プロテインキナーゼ C (protein kinase: PKC) は VEGF による血管新生に必要なシグナルを伝えることが知られていますが isoform 特異的なシグナル伝達についてはあまり分かっていないのが現状です。そこでまず遺伝子操作マウスの虚血網膜血管新生モデルを用いて in vivo での効果を検討しました。

高酸素を負荷し未熟な網膜血管を消退させると, 大気中で虚血網膜から VEGF が過剰に産生され VEGF 依存性に網膜血管新生が起こります。このモデルに PKC β 過剰発現マウス (TG マウス) と PKC β ノックアウトマウス (KO マウス) を用いたところ野生型と比較して TG マウスに severe な, KO マウスに mild な網膜血管新生を認めました。新生血管細胞を定量すると KO マウスでは野生型の半分に血管新生が抑制され, TG マウスでは3倍に増加していました。網膜から RNA を抽出しノザン解析で検討したところ VEGF とそのレセプターである Flk-1 の発現は野生型と同レベルでした。すなわち PKC β は VEGF やレセプター自体の発現レベルを変えず, 細胞内で VEGF のシグナルを強めることにより網膜血管新生を増強すると考えられました。

PKC β の血管新生促進作用のメカニズムを細胞レベルで検討するためウシ網膜血管内皮細胞に PKC 各 isoform をアデノウイルスで過剰発現させ VEGF による細胞増殖, 遊走を検討しました。PKC β は VEGF 依存性の細胞増殖, 遊走を促進し, その優勢変異型は抑制しました。PKC α と δ は少し増殖を抑制する傾向が認められました。VEGF による細胞増殖, 遊走には古典的 MAP-kinase である ERK が重要なので各 PKC isoform の ERK のリン酸化への影響を検討したところどの isoform でもリン酸化の亢進を認めたことから isoform による作用の違いは ERK を介するのではなく他の target を介して起こる可能性が示唆されました。

細胞増殖は細胞周期の調節により制御されている事実から Rb 蛋白に PKC がどう影響を及ぼすのかを検討しました。Rb は retinoblastoma の原因遺伝子として有名でその機能障害があると細胞周期が制御不能になり腫瘍が多発します。Rb は普段は転写因子である E2F ファミリーに結合してその働きを抑制することにより細胞周期を止めています, リン酸化されることにより不活性化され E2F から離れることにより E2F が活性化され細胞周期が進むようになります。PKC β を過剰発現させると VEGF 依存性の Rb のリン酸化が亢進しました。PKC δ は抑制する傾向が見られました。さらに PKC β が直接 Rb をリン酸化する可能性が免疫沈降と in vitro phosphorylation により示唆され, luciferase assay では PKC β により E2F の転写活性が有意に増加しました。この E2F の転写活性は VEGF 依存性の細胞増殖に必要不可欠でした。すなわち PKC β は Rb 蛋白をリン酸化することにより細胞増殖を促進している可能性が示唆されました。

結論として, PKC β は ERK と Rb-E2F 経路を活性化することにより増殖性糖尿病網膜症などの VEGF 依存性の虚血性網膜血管新生を増悪させると推測されました。

論文審査の結果の要旨

血管内皮増殖因子（VEGF）が増殖性糖尿病網膜症などの虚血性網膜血管新生を起こす主要因子であり、プロテインキナーゼ C（PKC）が VEGF の下流で血管新生に必要な不可欠なシグナルを伝達すると報告されているが PKC のどの isoform が主要な役割を果たすのかは明らかではない。

そこでまず、PKC β 過剰発現マウスと PKC β 欠損マウスを用いて VEGF 依存性の網膜血管新生を誘導したところ、野生型と比較して過剰発現マウスで 3 倍の、欠損マウスでは 1/2 の網膜血管新生が観察された。PKC β は細胞内で VEGF のシグナルを強めることにより網膜血管新生を増強すると考えられた。

次にウシ網膜血管内皮細胞に PKC 各 isoform をアデノウイルスで過剰発現させて isoform 特異性を検討した。PKC β は VEGF 依存性の細胞増殖、遊走を促進し、その優勢変異型は抑制した。PKC α と δ は増殖を抑制する傾向が認められた。PKC β は VEGF 依存性の Rb のリン酸化を亢進させた。さらに PKC β が直接 Rb をリン酸化する可能性が免疫沈降と in vitro phosphorylation により示唆された。

以上より、PKC β は Rb-E2F 経路を活性化することにより VEGF 依存性の虚血性網膜血管新生を増悪させると結論した。

以上の研究は増殖性糖尿病網膜症における PKC β の isoform 特異的な役割の解明に貢献し、治療薬の作用メカニズムの理解に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は平成15年1月20日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。