

氏 名	むら 村 上 とも 智 昭
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2950 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Angiopoietin-1 attenuates H ₂ O ₂ -induced SEK1/JNK phosphorylation through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in vascular endothelial cells (アンジオポエチン 1 は、血管内皮細胞において、phosphatidylinositol 3-kinase/Akt 経路を介して、過酸化水素により引き起こされる SEK1/JNK のリン酸化を抑制する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 野 田 亮 教 授 山 中 伸 弥 教 授 鍋 島 陽 一

論 文 内 容 の 要 旨

近年、糖尿病の血管障害及び糖尿病網膜症において、酸化ストレスの重要性が指摘されている。そこで、酸化ストレスによる網膜血管障害を制御可能か検討する為に、酸化ストレスによる網膜血管内皮細胞のアポトーシスを血管内皮細胞の生存因子である Angiopoietin1(Ang1)が抑制可能か、また、そのメカニズムを解析した。

まず、ブタ網膜血管内皮細胞(PREC)に H₂O₂ を負荷し、TUNEL 法、アポトーシス最終実行因子である caspase-3 の活性測定を用いて、アポトーシスについて検討した。H₂O₂ で誘導される TUNEL 陽性細胞と caspase-3 の活性を Ang1 は用量依存性に抑制した。次に、様々なストレスによるアポトーシスを仲介する c-Jun N-terminal kinase (JNK) の関与を検討する為、dominant negative (DN) 型 JNK 及び、siRNA を用いて JNK を阻害したところ、H₂O₂ による TUNEL 陽性細胞が減少し JNK を介した系の存在が示された。

さらに、細胞内シグナル伝達の観点から、詳細なメカニズムの解析を行った。まず、PREC に H₂O₂ を負荷し JNK のリン酸化が誘導されることを確認し、Ang1 により、JNK のリン酸化が抑制されることを示した。さらに、Ang1 が、その受容体である Tie2 をリン酸化し、また、PI3-kinase を介して Akt をリン酸化することを示した上で、この PI3-kinase/Akt 経路が、JNK リン酸化に及ぼす影響を検討した。PI3-kinase 特異的阻害剤 LY294002 と wortmannin を負荷したところ、Ang1 の JNK リン酸化抑制作用が打ち消され、また、DN 型 Akt でも同様に、Ang1 による抑制作用が打ち消された。以上より、Ang1 は、PI3-kinase/Akt 経路を介して、JNK のリン酸化を抑制することが示された。

次に、JNK の上流の分子である SAPK/Erk kinase 1 (SEK1) の Thr261 のリン酸化についても、同様に検討したところ、PI3-kinase 特異的阻害剤、DN 型 Akt の両者で、Ang1 の SEK1 のリン酸化抑制作用がなくなった。つまり、Ang1 は、SEK1 の Thr261 のリン酸化抑制もまた、PI3-kinase/Akt 経路を介していることが示された。

近年、cell line において Akt により SEK1 の Ser80 がリン酸化され、SEK1 の活性化が抑制されることが示されている。そこで、血管内皮細胞においても Ang1 により Ser80 がリン酸化され、さらに、PI3-kinase 特異的阻害剤と DN 型 Akt、siRNA による阻害実験により、そのリン酸化は抑制されることを示した。以上より、Ang1 は、PI3-kinase/Akt 経路を介して SEK1 の Ser80 をリン酸化することが示された。

以上をまとめると、Ang1 は、PI3-kinase/Akt 経路を介して、SEK1/JNK リン酸化を抑制し、また、アポトーシスを抑制する。今後の糖尿病網膜症の治療法への応用が期待される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究において、ブタ網膜血管内皮細胞を用いて、Angiopoietin1 (Ang1) が酸化ストレスによるアポトーシスを抑制す

るか、また、細胞内シグナル伝達の観点から分子メカニズムを検討した。

まず、TUNEL 法、caspase-3 活性測定を用い、過酸化水素によるアポトーシスが c-Jun N-terminal kinase (JNK) を介することを確認した。また、Ang1 はそのアポトーシスを濃度依存性に抑制した。

次に、Ang1 が PI3-kinase/Akt 経路を介して過酸化水素による SEK1/JNK 経路を抑制することを、PI3-kinase の特異的薬理的阻害剤 (LY294002, wortmannin)、及び、dominant negative(DN)-Akt を用いて示した。

以上の研究は、近年糖尿病、及び、糖尿病網膜症にて注目されている酸化ストレスの観点から、網膜血管障害の分子生物学的機序、及び、Ang1 の網膜血管障害の抑制作用の詳細な作用機序の解明に貢献し、今後進展するであろう分子生物学的知見に基づいた糖尿病網膜症の治療法開発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18年2月1日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。