The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	FAS SIGNALING INDUCES AKT ACTIVATION AND UPREGULATION OF ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE EXPRESSION
Author(s)	竹村, 幸宏
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45359
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名　竹村幸宏（たけむら ゆきひろ）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　18464　号

学位授与年月日　平成16年3月25日

学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当

医学系研究科生体制御医学専攻

学位論文名　FAS SIGNALING INDUCES AKT ACTIVATION AND UPREGULATION OF ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE EXPRESSION
（Fasのシグナルは Akt の活性化を誘導し、内皮型一酸化窒素合成酵素の発現を上昇させる）

論文審査委員　（主査）
教　授　荻原　俊男

（副査）
教　授　長田　重一　　教　授　辻本　賀英

論文内容の要旨

【目的】FasはTNF-α受容体ファミリーに属するI型膜蛋白質で、Fasリガンド（FasL）が結合してアポトーシスを誘導する。Fasは、心血管系の細胞を含むほとんど全ての細胞に発現するが、FasLは主に免疫系の細胞に発現する。しかし、その後、FasLが網膜や睾丸などで発現し、免疫系からの隔離（immune privilege）に関与することや、心筋や血管内皮にもある程度発現することが明らかにされている。ところで、血管内皮は血管の恒常性に重要な役割を果たすため、アポトーシスを介した内皮細胞の消失は、動脈硬化や炎症を惹起することが予想される。しかし、重要なことに、正常では内皮細胞がFasを介したアポトーシスに対して非常に抵抗性を示すことが知られている。また、最近、Fasが圧負荷に対する代償性心肥大の機構に関与することなど、アポトーシス以外の生理作用を有する可能性が報告されている。本研究は、血管内皮においてFasが血管内皮においてアポトーシス以外の生理作用、特に、内皮機能の中心を担う一酸化窒素（NO）の産生機構に関与する可能性を検討することを目的とした。

【方法ならびに結果】

1．内皮細胞は、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用い、アポトーシスの検出は、抗ANNEXIN V抗体を使用したフローサイトメーター法を用いた。リコンビナントFasLは、Fas感受性細胞であるJurkatt T細胞にアポトーシスを誘導したが、以前の報告と同様、HUVECに対してはアポトーシスを誘導しなかった。しかし、FasLは、HUVECにおいて内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）の発現を促進した（Western blot法）。重要なことに、Aktの上流シグナルphosphatidylinositol 3-kinaseに対するinhibitor存在下では、FasLによるeNOSの発現促進作用は消失し、アポトーシスが誘導された。この結果は、用いたHUVECに内在するアポトーシス機構が正常に機能すること、PI3キナーゼ/Akt系が内皮細胞におけるFasを介した生理作用を決定する上で重要な役割を果たす可能性を示す。実際、Aktの活性化を示すリン酸化がFasL作用後5－60分の一過性に誘導された。また、マウスの大動脈を用いた器官培養系において、アゴニスト作用を有する抗Fas抗体Jo2がAktのリン酸化を血管内皮に誘導した（ABC法を用いた免疫組織染色）ことから、in vivoの血管内皮においてもFasを介したAktの活性化が誘導されることが推察された。

2．eNOS は血圧の調節機構に重要な役割を持つため、次に Fas 欠損マウス（*Ipr*）と野生型マウスにおける血圧を動脈内にカテーテルを挿入して比較したところ、*Ipr* が野生型に比し若干高血圧であることが明らかになった。さらに、NO 合成阻害薬 N^G-nitro-L-arginine（L-NAME）（5 mg/kg/day）を 6 週間飲水から投与することによって内因性の NO 産生を慢性的に抑制すると、野生型マウスの血圧は大きく上昇したが、*Ipr* では血圧のさらなる上昇が認められなかった。

3．*Ipr* の血圧上昇のメカニズムをさらに検討する目的で、両群マウスから摘出した大動脈標本を用いて血管の収縮や拡張反応性を比較した。その結果、phenylephrine に対する収縮反応性に差はなかったが、NO の産生を示す acetylcholine による内皮依存性血管拡張反応が、*Ipr* では野生型マウスに比べ有意に減弱することが明らかになった。これらの結果より、in vivo において Fas の活性低下によって eNOS を介した NO の産生が実際に低下することが推察された。

【総括】

本研究は、内皮細胞において Fas の活性化がアポトーシス以外の生理作用、すなわち、eNOS の発現を生存シグナル Akt 依存性に誘導することを初めて明らかにした。また、Fas 欠損マウスを用いることによって、in vivo においても Fas が eNOS の発現を調節することによって、血管の内皮依存性拡張反応性、さらには、血圧の調節機構にも関与する可能性を示した。eNOS は、血圧の調節だけでなく、動脈硬化、血管新生などの病態に関与することから、本研究により、Fas がこれらの病態における新しい治療ターゲットになる可能性があると推察される。

論文審査の結果の要旨

Fas は Fas リガンドと結合することにより細胞にアポトーシスを引き起こし、細胞死を誘導する I 型膜蛋白質である。しかし、近年の研究で Fas にはアポトーシスと無関係な生物学的作用があることが報告されている。今回竹村幸宏は Fas のアポトーシスと無関係な作用として以下のことを報告した。血管内皮細胞において Fas が Fas リガンドと結合したシグナルがアポトーシスを誘導することなく、生存シグナルである Akt の活性化を誘導し、内皮型一酸化窒素合成酵素の発現を上昇させる。しかし、Akt の上流シグナルであるフォスファチジルイノシトール 3 リン酸の阻害薬の存在下では、内皮細胞は Fas リガンドによって内皮型一酸化窒素合成酵素の発現を上昇ではなくアポトーシスを起こす。このことにより、Fas のシグナルによる内皮型一酸化窒素合成酵素の発現を上昇は Akt 依存性であることが示された。また、血管内皮細胞機能の低下によって生体に生じる変化としては血圧の上昇があるが、生体においては細胞表面で Fas の発現が減少しているマウス（lpr マウス）では、野生型マウスに比べ、血圧の上昇が見られた。さらに、一酸化窒素合成酵素阻害薬である N^G-nitro-L-arginine による長期間の一酸化窒素合成酵素の阻害により野生型マウスの血圧は大きく上昇したが、lpr マウスでは上昇が見られなかった。さらに、アセチルコリンによる大動脈輪の内皮依存性の弛緩反応が、lpr マウスでは野生型のマウスに比べ減少していた。これらの事実より竹村幸宏は内皮細胞において Fas の活性化がアポトーシス以外の生理作用、すなわち、eNOS の発現を生存シグナル Akt 依存性に誘導することを初めて明らかにした。また、Fas 欠損マウスを用いることによって、in vivo においても Fas が eNOS の発現を調節することによって、血管の内皮依存性拡張反応性、さらには、血圧の調節機構にも関与する可能性を示した。eNOS は、血圧の調節だけでなく、動脈硬化、血管新生などの病態に関与することから、本研究により、将来的に Fas がこれらの病態における新しい治療ターゲットになる可能性があることを示し、この論文の内容は学位に値すると考える。