



Title	Mechanism of eNOS activation by estrogen and raloxifene in vascular endothelial cells
Author(s)	久本, 浩司
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46166
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 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	久本浩司
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 19866 号
学位授与年月日	平成 17 年 12 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Mechanism of eNOS activation by estrogen and raloxifene in vascular endothelial cells (血管内皮細胞におけるエストロゲンおよびラロキシフェンによる eNOS 活性化機構)
論文審査委員	(主査) 教授 村田 雄二 (副査) 教授 堀 正二 教授 岡本 光弘

論文内容の要旨

〔目的〕

女性は閉経後に心血管疾患発症のリスクが高くなると考えられており、その原因にはエストロゲンの低下が関与しているといわれている。閉経を境に心血管疾患の発症率が増加する疫学的事実や、多くの基礎的な実験結果より、エストロゲンに心血管保護作用があることは明らかである。

心血管保護作用の一つに血管拡張作用がある。以前より血管拡張因子として EDRF (endothelium-derived relaxing factor) が重要であると考えられており、その中の一つとして NO (一酸化窒素) が 1994 年に同定された。その後、血管内皮細胞においてエストロゲンは eNOS (内皮型 NO 合成酵素) の発現を増加させず、短時間に eNOS を活性化し NO を産生することが報告された。しかし、その作用機序は不明であった。そこで、エストロゲンによる eNOS 活性化機構を解明することを研究テーマとした。

ホルモン補充療法の際の問題点は、エストロゲンによって乳癌や子宮体癌発症のリスクが上昇することである。SERM (選択的エストロゲンレセプターモジュレーター) の一つであるラロキシフェンは、乳腺や子宮内膜には抗エストロゲン作用を示し乳癌や子宮体癌発症のリスクを上昇させず、骨代謝と心血管にはエストロゲン作用を示すことで理想的なプロファイルをもつことで知られている。ラロキシフェンにもエストロゲンと同様に NO 依存性に血管を拡張するという報告はあるが、その作用機序は不明であった。そこで、ラロキシフェンの血管拡張作用にも eNOS が関与しているのではないかと考え、その活性化機構をも検討することとした。

〔方法〕

Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)、SV40-transformed rat lung vascular endothelial cell (TRLEC)、CHO 細胞を使用した。

1. eNOS の活性化は、 ^{14}C で標識したアルギニンからシトルリンへの変換率で検討した。その作用が、核内転写を介した作用であるか否かを検討するために、細胞内に取り込まれないエストロゲンである β -estradiol 17-hemisuccinate : BSA (E2-17-BSA) および核内転写の阻害剤である Actinomycin D を用いて検討した。
2. eNOS は、Akt の基質であるということが報告されている。そこでエストロゲンおよびラロキシフェンによる Akt の活性化を検討した。Akt の活性化は、Akt の基質である GSK3 α のリン酸化により検討した。更に Actinomycin D、

エストロゲンレセプター (ER) の antagonist である ICI-182,780、および Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の阻害剤である wortmannin がエストロゲンによる Akt の活性化に与える影響を検討した。

3. Akt の活性化がエストロゲンによる eNOS の活性化に関与しているか否かを検討するために、TRLEC に Wild-type Akt, constitutively active Akt および kinase-inactive Akt を強制発現させた後にエストロゲンによる eNOS の活性化を検討した。
4. ER には2種類のアイソフォーム (ER α 、ER β) が存在している。Akt の活性化にはどちらのアイソフォームが関与しているかを検討するために、ER の発現していない CHO 細胞に ER α 、ER β を強制発現し検討した。

[成績]

1. エストロゲン、E2-17-BSA およびラロキシフェンは eNOS を短時間および一過性に活性化した。その活性化は、Actinomycin D を前投与しても抑制されなかった。
2. エストロゲン、ラロキシフェンは Akt を短時間および一過性に活性化した。その活性化は、Actinomycin D を前投与しても抑制されなかった。また ICI-182,780、wortmannin を前投与することにより抑制された。
3. Constitutively active Akt を強制発現させた場合、恒常的な eNOS の活性化を認めた。しかし kinase-inactive Akt を強制発現させた場合では、エストロゲンおよびラロキシフェンによる eNOS の活性化を認めなかった。
4. ER α を強制発現させた場合 Akt の活性化を認めたが、ER β を強制発現させた場合には、Akt の活性化を認めなかった。

[総括]

エストロゲンおよびラロキシフェンは Akt を介し、即時的に eNOS を活性化させた。それは短時間に起こる、核内転写因子である ER を介さない non-genomic な作用であった。またこの作用は、ER β ではなく ER α を介した作用であった。

論文審査の結果の要旨

女性は閉経後に心血管系疾患のリスクが高くなると考えられており、その原因にはエストロゲンの低下が関与しているといわれている。閉経を境に心血管疾患の発症率が増加する疫学的事実や、多くの臨床的・基礎的研究から、エストロゲンに心血管保護作用があることは明らかである。

心血管保護作用の一つに血管拡張作用がある。エストロゲンによる血管拡張作用機序には、NO (一酸化窒素) が関与することは解明されていた。その後、血管内皮細胞においてエストロゲンは eNOS (内皮型 NO 合成酵素) の発現を増加させず、短時間に eNOS を活性化し NO を産生することが報告された。しかし、eNOS 活性化の機序は不明であった。そこで、エストロゲンによる eNOS 活性化機構を解明することを研究テーマとした。

ホルモン補充療法の際の問題点は、エストロゲンによって子宮体癌と乳癌発症のリスクが増加することである。しかし SERM (選択的エストロゲンレセプターモジュレーター) の一つであるラロキシフェンは子宮体癌・乳癌発症のリスクを増加させないことで理想的な作用を持つことで注目されているが、心血管に対する効果については解明されていない部分が多い。そこでラロキシフェンについても eNOS 活性化機構を検討した。

その結果、血管内皮細胞においてエストロゲンおよびラロキシフェンは Akt、ERK という経路を介して短時間に eNOS をリン酸化・活性化することを解明し、この2つの報告は Journal of Biological Chemistry に掲載され、学位授与に値するものと考えられる。