

Title	$\beta$ -arrestin-2 in PAR-1 Biased Signaling has a crucial role in endothelial function via PDGF- $\beta$ in stroke
Author(s)	神吉, 秀明
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/72512">https://hdl.handle.net/11094/72512</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 神吉 秀明

	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授 望月 香樹
	副 査	大阪大学教授 岩島 唯久
	副 査	大阪大学教授 山下 俊英

## 論文審査の結果の要旨

トロンピンは脳梗塞の病態を悪化させるが、同じ受容体(PAR-1)に作用する活性化プロテインC(APC)は逆に脳梗塞の病態を改善させる。この相反する作用機序の解明と $\beta$  arrestin-2の関連について検討を行った。培養細胞でトロンピンは早期から内皮細胞を破綻させ、APCは $\beta$  arrestin-2を活性化させ後期時相にかけ細胞を保護した。PAR-1の下流のMAPK42/44はトロンピンで早期に一過性の、APCは後半で持続的な活性化を認め、PDGF- $\beta$ も関与していた。PAR-1のリアルな動態を把握するために、ルシフェラーゼを用いて検討しても同様にトロンピンは早期の活性化、APCは後期で活性化を認めていた。さらに、マウスに高脂肪食を負荷したモデルでは高トロンピンと低APCの状態を示し、実験的な脳梗塞を起こすと、脳梗塞は内皮細胞の破綻により増悪を認め、高脂肪食マウスでは $\beta$  arrestin-2とPDGF- $\beta$ が低値であったことから、 $\beta$  arrestin-2-MAPK42/44-PDGF- $\beta$ が脳梗塞で保護的に作用することを明らかにした。このため本論文は学位の授与に値すると考えられる。

論文内容の要旨  
Synopsis of Thesis

氏名 Name	神吉 秀明
論文題名 Title	$\beta$ -arrestin-2 in PAR-1 Biased Signaling has a crucial role in endothelial function via PDGF- $\beta$ in stroke ( $\beta$ -arrestin-2はPAR-1 biased signalingにおいて脳卒中でPDGF- $\beta$ を介して内皮機能で重要な役割を果たす)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>脳梗塞の治療で出血のリスクが低い抗トロンビン療法が望まれている。トロンビンはG protein-coupled receptor (GPCR)の1であるプロテアーゼ活性化型受容体-1~4 (PAR1~4)を介して作用を発揮する。トロンビンは血液脳関門を破綻し脳梗塞を増悪させるが、同じPAR-1受容体を介して作用する活性化プロテインC (APC)は脳梗塞で機序は不明であるが保護効果を示す。古典的にはGPCRはGPCRキナーゼ (GRK) 依存性リン酸化が生じると<math>\beta</math> arrestinを介して部分的に失活するが、近年<math>\beta</math> arrestin依存性経路の存在が報告された。そこで今回、血管内皮細胞におけるトロンビンと活性化プロテインC (APC)との相反する作用についてPAR-1のbiased signalingの観点から検討した。また、PAR-1はtethered ligandとして作用するためにliving cellにおいてreal-timeイメージング手法を用いてPAR-1受容体の切断活性を解析することでより詳細なPAR-1受容体の動態を検討することとした。さらに、高脂肪食ラットでトロンビン活性を呈することが報告されており、この高脂肪食マウスを用いて、脳虚血時におけるトロンビンとAPCの差異を検討するとともに<math>\beta</math> arrestinの意義についても検討した。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>方法：細胞はBBMC (ウシ脳血管内皮細胞)とHUVECを使用した。<i>In vitro</i>の低酸素モデルはOxygen Glucose Deprivation (OGD)を施行した。内皮細胞の機能評価には透過性アッセイと経上皮電気抵抗を施行した。生物発光イメージング法としてGausia luciferase;GLaseをレポーターとして用いた系を使用した。<i>In vivo</i>モデルには高脂肪食マウスモデルを使用した。通常食マウスと高脂肪食マウスで血清サンプリングを施行し、一過性中大脳動脈閉塞術(filament 60分)を施行した。</p> <p>結果：<i>In vitro</i>の検討では、トロンビンは早期より内皮細胞機能を破綻させる一方で、APCは後期時相に及び内皮細胞機能を安定化し、低酸素による内皮細胞破綻効果を打ち消した。APC負荷やOGD処置によって<math>\beta</math> arrestin-2の発現は増加した。次に、PAR-1の下流にあるMAPK 42/44のリン酸化について検討するとトロンビンでは5分でピークとなりその後元のレベルに戻る一過性リン酸化を示したが、APCでは投与後30分以降から持続的にリン酸化を認めた。さらに下流分子についてprotein arrayを用いて検討したところ6つの候補分子が同定され、最も変化を認めたのがPDGF-<math>\beta</math>であった。PDGF-<math>\beta</math>はOGDにより有意にupregulationされたが、<math>\beta</math> arrestin-2 knock down細胞においてそのupregulationは抑制された。APC負荷によってもPDGF-<math>\beta</math>はupregulationされ、MEK inhibitorでそのupregulationは抑制された。発光系を用いた解析でGLaseを用いた発光系によるPAR-1動態のリアルタイムイメージングに成功し、トロンビンは早期からPAR-1を切断し、APCは比較的ゆっくりと後期時相にPAR-1を切断した。PAR-1 mutantを用いた解析でトロンビンではPAR-1のR41が関与し、APCではPAR-1のR41とR46が関与していた。高脂肪食マウスでは、高脂肪食2週間以降でトロンビン高値、APC低値を認めており、<i>in vivo</i>でのPAR-1 biased signalingを再現しているモデルと考えられた。一過性中大脳動脈閉塞術を施行すると脳梗塞体積の増悪、神経所見の増悪を認め、Evans Blueを用いた解析からBBBの破綻がその一因と考えられた。さらに高脂肪食マウスでは<math>\beta</math> arrestin-2の発現は抑制されており、penumbra領域で<math>\beta</math> arrestin-2とPDGF-<math>\beta</math>のupregulationが通常食マウスで認められたが、高脂肪食マウスではそのupregulationが有意に抑制された。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>APCは<math>\beta</math> arrestin-2を介して内皮細胞機能を安定化させ、MAPK42/44の持続的活性化によるPDGF-<math>\beta</math>の産生が認められた。GLaseを用いたPAR-1動態について発光イメージング法による解析に成功した。高脂肪食マウスは高トロンビンかつ低APCの状態を示し、<i>in vivo</i> PAR-1 biased signalingモデルと考えられ、BBBの破綻により梗塞を増悪させた。</p>	