

# バソインヒビンの受容体、機能探索及びリン酸化プロラクチン生成機序の解明

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-05-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 諸星, 和紀 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10291/21813">http://hdl.handle.net/10291/21813</a>

明治大学大学院農学研究科

2020年度

博士学位請求論文

バソインヒビンの受容体、機能探索及び  
リン酸化プロラクチン生成機序の解明

A study on receptor and functions of  
vasoinhibin, and mechanism of  
phosphorylated prolactin production

学位請求者 生命科学専攻

諸星 和紀

## 目次

序章.....	2
1. はじめに.....	2
2. プロラクチン.....	4
3. バソインヒビン.....	12
4. 周産期心筋症.....	21
5. リン酸化プロラクチン.....	28
6. 本研究の概略.....	30
第一章　バソインヒビンの受容体探索.....	32
1-1 緒言.....	32
1-2 材料と方法.....	36
1-3 結果.....	48
1-4 考察.....	57
第二章　心臓線維芽細胞における Vi の影響解析.....	63
2-1 緒言.....	63
2-2 材料と方法.....	67
2-3 結果.....	73
2-4 考察.....	81
第三章　リン酸化プロラクチンの産生機序解明.....	86
3-1 緒言.....	86
3-2 材料と方法.....	90
3-3 結果.....	100
3-4 考察.....	111
第四章　総合考察.....	116
謝辞.....	120
参考文献.....	121

# 序章

## 1. はじめに

プロラクチンは主に脳下垂体前葉に存在するプロラクチン産生細胞（ラクトロフ）で合成、分泌される分子量約 23kDa のペプチドホルモンである。主な作用として乳汁の合成、乳腺の発達、妊娠の維持等が知られているが、その他に恒常性を維持する機能を中心に 300 を超える機能が報告されている。プロラクチンはプロテアーゼ切断、リン酸化、糖付加、二量体化等、様々な翻訳後修飾を受けることが知られているが、この多岐にわたる作用は翻訳後修飾によって産生される異型プロラクチンによるものと考えられている。本研究では特にプロテアーゼ切断、リン酸化を受けた異型プロラクチンに着目し研究を行った。

プロテアーゼ切断を受け分子量 11-18kDa になった異型プロラクチンはバソインヒビンと呼ばれており、抗血管新生作用、抗血管拡張作用等を持つことが報告されている。これまでにバソインヒビンの作用に関する研究は多数報告されているが、受容体に関する研究は報告されていない。そこで本研究ではバソインヒビンの受容体を探索することを目的とした。

また、近年バソインヒビンが妊娠関連疾患である周産期心筋症に関与する可能性が報告されている。バソインヒビンと周産期心筋症の関連性についての研

究は、その殆どがバソインヒビンの持つ抗血管新生作用によるものである。本研究ではバソインヒビンの心臓線維芽細胞に対する影響を調べ、周産期心筋症との関連性の理解を深めることを目的とした。

リン酸化を受けた異型プロラクチンはリン酸化プロラクチンと呼ばれている。リン酸化プロラクチンは通常のプロラクチンと分子量の差異は無く、等電点が変わる。未修飾のプロラクチンとは異なる作用を持つことが報告されているが、その産生機序は明らかになっていない。本研究ではプロラクチンをリン酸化する酵素の特定を目的とした。

本章では、プロラクチン、バソインヒビンと周産期心筋症、リン酸化プロラクチン、本研究の概略を述べる。

## 2. プロラクチン

プロラクチン (Prolactin: PRL) とは、主に脳下垂体前葉のプロラクチン産生細胞 (ラクトロフ) で合成、分泌される分子量約 23kDa のペプチドホルモンである。ヒト PRL は 199 アミノ酸残基から構成されているが、マウス PRL は 197 アミノ酸残基から構成されていて、ヒト PRL の 8、9 番目に相当するアミノ酸残基が欠失している (Cooke et al. 1981, Cooke et al. 1980, Kohmoto et al. 1984)。ヒト PRL の構造中では、6 つのシステイン (cys) 残基間に 3 つのジスルフィド結合 (cys4-cys11、cys58-cys174、cys191-cys199) が存在する (Cooke et al. 1981)。また、PRL の構造は 4 つの  $\alpha$  ヘリックスに折りたたまれている (Keeler et al. 2003) (Fig. A)。PRL を構成するアミノ酸の 50% は  $\alpha$  ヘリックス中に存在し、残りのアミノ酸はループ構造を形成している。マウス PRL はヒト PRL と 60% の配列が一致しており、ヒト PRL と同様に 3 つのジスルフィド結合と 4 つの  $\alpha$  ヘリックスを持つ。また、成長ホルモン (Growth Hormone: GH)、胎盤性ラクтоゲン (Placental Lactogen: PL) と構造が類似していることから GH/PRL ファミリーに分類されており、魚類から哺乳類まですべての脊椎動物に幅広く分布している。

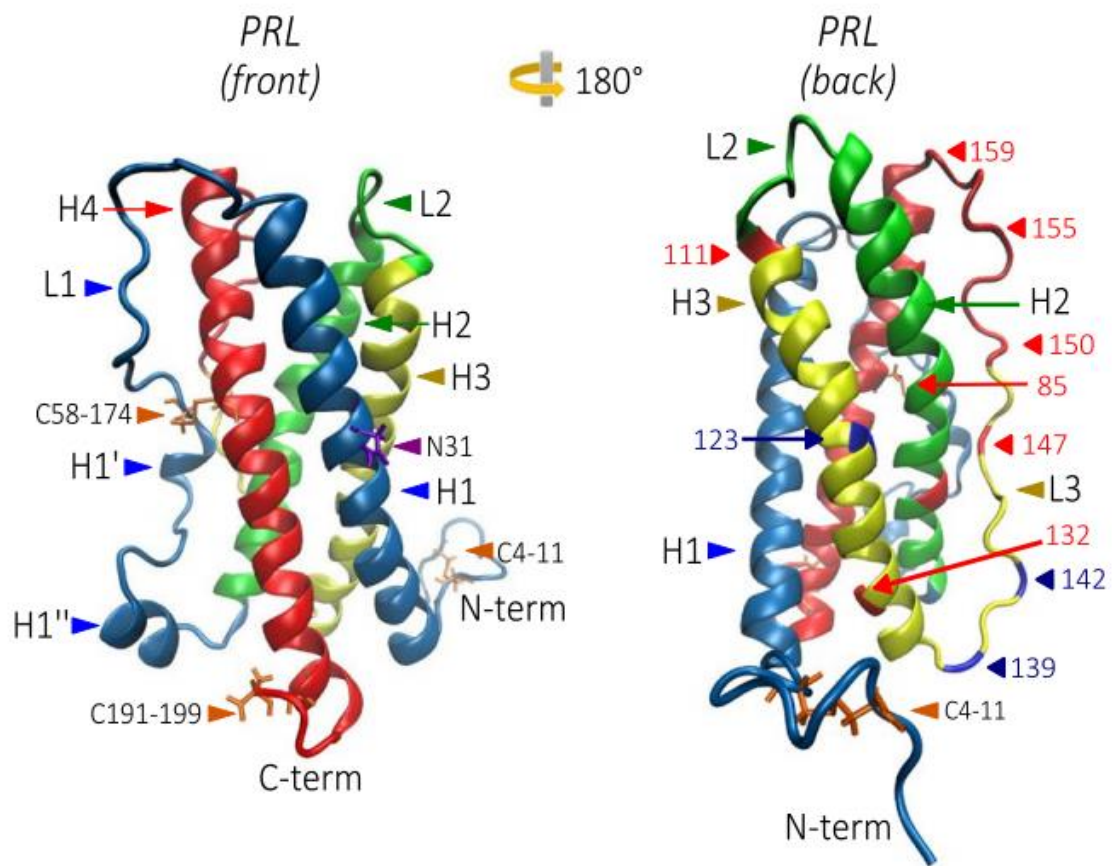


Fig. A PRL の構造

PRL は4つの $\alpha$ ヘリックス構造とそれをつなぐループ構造を持つ。PRL を構成するアミノ酸の50%は $\alpha$ ヘリックス中に存在する。N末端側から第1ヘリックス(青)、第2ヘリックス(緑)、第3ヘリックス(黄)、第4ヘリックス(赤)である。(Robles et al. 2018 より引用)

#### a. 生理作用

PRL は1920年から30年代にかけて下垂体抽出物から乳汁合成を誘発する物質として同定され、その乳汁を合成する作用から、泌乳(lactation)の前に分泌されるという意味でプロラクチン(Prolactin)という名称がつけられた(Riddle et al. 1933)。主な作用は哺乳類の乳腺発達や乳汁の合成促進、妊娠期の黄体維

持作用、母性行動等の生殖に関する作用であるが、現在では 300 を超える機能が報告されており、白血球の増殖促進による免疫作用、魚類の浸透圧調整、両生類の成長、変態、鳥類の就巢行動や育児行動があげられる (Bole-Feysot et al. 1998, Freeman et al. 2000)。さらに PRL は癌や創傷治癒の過程で起こる血管新生に関与することが明らかになっている (Corbacho et al. 2002)。

## b. 受容体とシグナル伝達

前述した PRL の多岐にわたる作用は、PRL の特異的受容体である PRL 受容体 (PRL receptor: PRLR) と結合することでシグナル伝達が起こるとされている。PRLR は一回膜貫通型の受容体で、細胞外領域、膜貫通領域および細胞質領域の 3 つの領域から構成されている。ヒト、マウス、ラット等では細胞質領域の長さが異なる long form と short form が存在する。PRL が PRLR の long form に結合すると、受容体の二量体化が誘導され、PRLR の細胞質領域に恒常的に存在している Janus Kinase 2 (JAK2) が活性化し、PRLR のチロシン残基がリン酸化される。それにより PRLR のリン酸化チロシン残基に Signal Transducers and Activator of Transcription 5 (STAT5) が結合し活性化すると、STAT5 は PRLR から解離し、二量体を形成後、核内へ移行し、遺伝子の転写を制御している (Bernard et al. 2015)。この経路を JAK-STAT 経路と呼び、PRLR はその他に Mitogen-Activated



Protein Kinase (MAPK)、Phosphoinositide 3 Kinase (PI3K)、Src キナーゼを介してシグナル伝達経路が活性化することが報告されている (Lee R. C. H. et al. 1999, Vara et al. 2001)。一方、PRLR の short form は long form と比べると細胞内領域が短く、JAK2 を持たないため、JAK-STAT 経路によるシグナル伝達が行われず、MAPK や PI3K によるシグナル伝達が行われる (Binart et al. 2010) (Fig. B)。

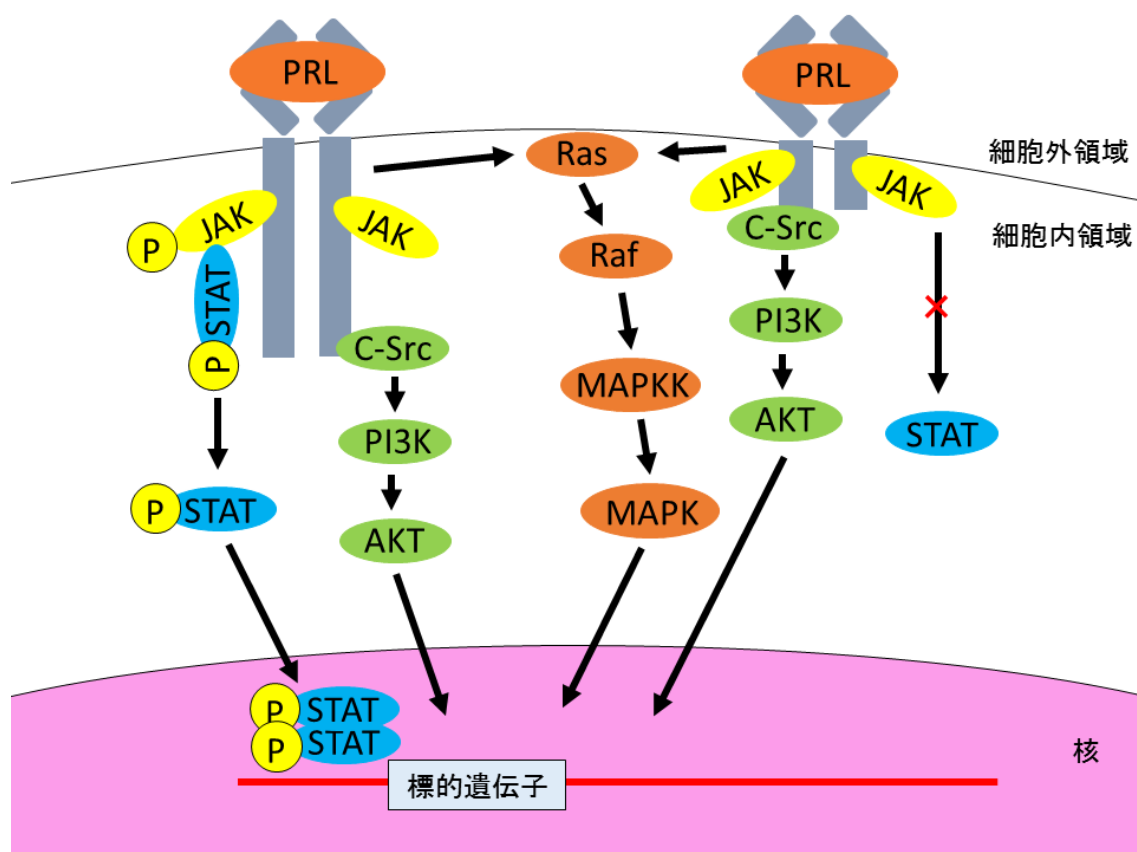


Fig. B PRL 受容体とシグナル伝達

PRLR には long form と short form が存在し、活性化させるシグナル経路が異なる。PRLR long form は JAK-STAT 経路が主なシグナル伝達経路であるが、PRLR short form はその構造上、JAK-STAT 経路によるシグナル伝達が行われず、MAPK や PI3k によるシグナル伝達が行われる。

### c. 分泌制御

PRL の分泌は視床下部から放出される PRL 放出因子 (Prolactin Releasing Factors: PRF) と PRL 抑制因子 (Prolactin Inhibiting Factors: PIF) によって制御されている。下垂体における分泌は通常、視床下部から放出される PIF により抑制制御を受けているが、特定の条件下では視床下部から放出される PRF により分泌が亢進される。視床下部から放出される PIF としてドーパミン、ソマトスタチン、GABA ( $\gamma$ -Gaminobutyric acid)、PRF として甲状腺ホルモン放出ホルモン、オキシトシン、ニューロテンシン、エストロゲンが報告されている (Freeman et al. 2000)。主に、視床下部における PRL の分泌抑制はドーパミンがラクトトロフのドーパミン D2 受容体に結合することで制御されている (Freeman et al. 2000)。PRL の分泌は性周期による影響を受けることも知られており、発情前期から発情期にかけて分泌量が増加する。この分泌促進はエストロゲンがラクトトロフのエストロゲン受容体に結合することで制御されている (Caron et al. 1978) (Fig. C)。

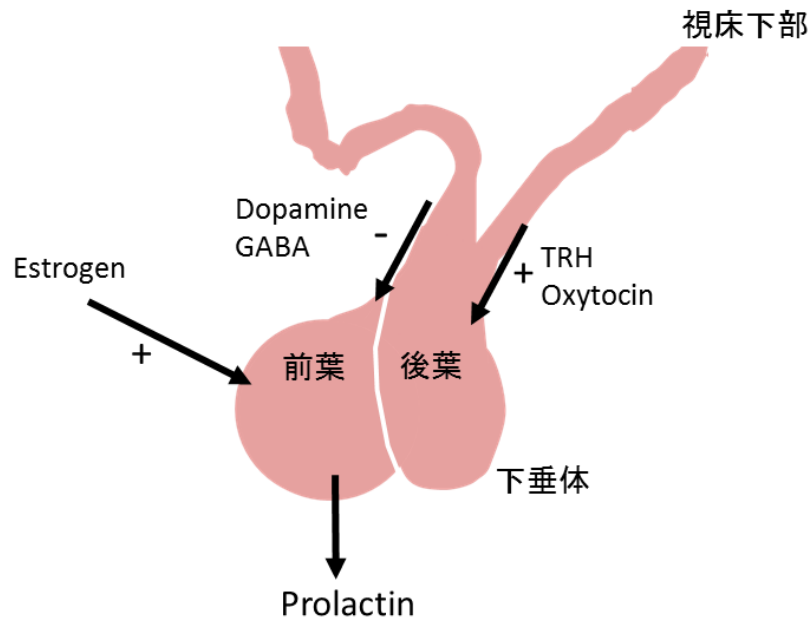


Fig. C PRL の分泌制御

PRL の分泌は視床下部から分泌される PRF と PIF によって制御されている。ドーパミンや GABA、TRH やオキシトシンにより PRL の分泌が制御される。また、下垂体に存在するエストロゲン受容体を介して、エストロゲンにより PRL 分泌を促進される。

#### d. 異所性 PRL と異型 PRL

前述した通り、PRL の生理作用は多岐にわたり、現在では 300 以上の機能が報告されている (Freeman et al. 2000)。これらの機能は未修飾の PRL で引き起こされているだけでなく、異所性、および異型 PRL が存在することにより機能の多様性を持つとされている。PRL は主に下垂体前葉のラクトロフで産生されるが、それ以外の組織細胞中で産生される異所性 PRL が存在する。これまでに、脳

組織、乳腺、胎盤、膵臓、脾臓等で PRL の発現が報告されている (Emanuele et al. 1992, Harigaya et al. 1997, Horiguchi et al. 2004, Meuris et al. 1983, Steinmetz et al. 1993)。これらの組織では PRLR の発現も確認されており、自己分泌、傍分泌により作用することができ、これにより血中の PRL 濃度に関係なく、PRL の作用を発現することが出来ると考えられている (Bernichtein et al. 2010)。また、PRL には翻訳前後に修飾を受けることで構造が変化した異型 PRL の存在も報告されている (Sinha 1995)。主な修飾としてリン酸化、プロテアーゼ切断、糖付加、重合、選択的スプライシングが挙げられる (Table A)。構造が変化することで安定性や半減期、受容体結合、生理作用への影響を与えることが考えられ、PRL の機能の多様性の一端を担っていると考えられている。

Table A 種々の異型 PRL

PRL は翻訳前後に修飾を受けることで構造が変化することが知られており、この構造が変化した PRL を異型 PRL と呼ぶ。

異型 PRL の種類	
プロテアーゼ切断	プロテアーゼにより切断
リン酸化	リン酸化酵素によりリン酸化
糖付加	糖が付加
重合	分泌顆粒内で重合、二量体を形成
選択的スプライシング	選択的スプライシングにより切断される

### 3. バソインヒビン

バソインヒビン (Vasoinhibin: Vi) とは PRL がプロテアーゼによって切断された異型 PRL の一種であり、抗血管新生作用、抗血管透過誘導作用、抗血管拡張作用を持つことが知られている。これらの機能から脈管新生を意味する Vasogenesis と阻害を意味する Inhibition から Vasoinhibin(バソインヒビン) と名付けられた(Clapp et al. 2006)。バソインヒビンと名付けられる以前は、通常の分子量よりも小さい PRL という意味で 16kDa PRL や切断 PRL と呼ばれていた。選択的スプライシングによる異型である可能性も考えられたが、PRL と異なる mRNA から合成されるものではないことが報告された(Mittra 1980)。現在では、バソインヒビンは単一の種ではなく、PRL がプロテアーゼによって切断され産生される N 末端側 11-18kDa のタンパク質と定義されている(Clapp et al. 2006)。さらに、PRL/GH ファミリーである成長ホルモン (Growth Hormone: GH) や胎盤性ラクトゲン (Placental Lactogen: PL) がプロテアーゼにより切断される N 末端側の断片も同様の作用を持つことが確認されている(Struman et al. 1999)。プロテアーゼ切断により C 末端側の断片も産生されるが、これは抗血管新生作用を示さないことが報告されている(Khurana et al. 1999)。

Vi 及び 16kDa PRL はラット・マウス・ヒト下垂体中(Cruz-Soto et al. 2009,

Sinha and Gilligan 1984, Sinha et al. 1985)、ヒト血管内皮細胞(Corbacho et al. 2000)、ヒト・ラット胎盤(Perimenis et al. 2014)、ウシ黄体(Erdmann et al. 2007)、げっ歯類視床下部(Zamorano et al. 2014)、軟骨(Macotela et al. 2006)、網膜(Ge et al. 2007)で検出されている。加えて、ヒトとラットの血清、血漿中、ヒトの羊水、尿でも検出されている。また、in vitro の実験において、げっ歯類では心臓、前立腺、脾臓、肺、腎臓、乳腺(Baldocchi et al. 1993, Clapp 1987, Compton and Witorsch 1984, Hilfiker-Kleiner et al. 2007, Ishida et al. 2014, Wong et al. 1986)、ヒトでは乳腺と胎盤が全長 PRL から Vi 及び 16kDa PRL を産生することが報告されている(Baldocchi et al. 1995, Gonzalez et al. 2007)。また、下垂体における 16kDa PRL と PRL の存在比は一定ではなく、生理状態によって変化する。例えば、メス未経産ラットでは 16kDa PRL/PRL 比率が 0.22 であり、妊娠期においては 9 日目の比率は 0.37、12 日目の比率が 0.77 と増加する(Mittra 1980)。同様に、ヒトにおいても妊娠後期に血漿中 16kDa PRL 濃度が高くなることも明らかになっている(Sinha et al. 1985)。

#### a. Vi 産生酵素

Vi は PRL がプロテアーゼ切断された N 末端側 11-18kDa の断片と定義されて

いるが、この分子量の違いは様々なプロテアーゼにより PRL が切断され Vi が産生されることに起因している。PRL を切断するプロテアーゼにはカテプシン D (Cathepsin D: CathD) (Piwnica et al. 2004)、マトリックスメタロプロテアーゼ (Matrixmetalloproteinase: MMP) (Macotella et al. 2006)、骨形成タンパク質 1 (Bone morphogenetic protein-1: BMP-1) (Ge et al. 2007) が挙げられる。これらのプロテアーゼが全長 PRL の  $\alpha$ -ヘリックスや第 3 ヘリックスと第 4 ヘリックスをつなぐ long loop 内の様々な部位で PRL を切断することで様々な分子量の Vi が産生される (Fig. D)。

CathD とはリソソーム性アスパラギン酸プロテアーゼであり、酸性条件において重鎖と軽鎖が結合した成熟型 CathD となる。成熟型 CathD は 337 個のアミノ酸からなり、重鎖は 196 アミノ酸、軽鎖は 141 個のアミノ酸残基からなる (Faust et al. 1985)。成熟型 CathD は hPRL の N 末端側 132 番目と 133 番目、147 番目と 148 番目、150 番目と 151 番目の間を切断し、それぞれ約 15kDa、16.8kDa、17.2kDa の Vi を産生する (Piwnica et al. 2004)。MMP とは、細胞外基質を分解する酵素の総称である。MMP ファミリーに属する MMP-1、2、3、8、9、13 は hPRL の N 末端側 150 番目と 151 番目、132 番目と 133 番目、124 番目と 125 番目、111 番目と 112 番目の間を切断し、それぞれ約 17.7kDa、16.8kDa、14.1kDa、12.5kDa の Vi を産生する。MMPs が PRL を Vi に切断する切断能比は以下のとおりである；



MMP-8>MMP-13>MMP-3>MMP-1>MMP-2>MMP-9 (Macotela et al. 2006)。BMP-1  
 とは骨組織や軟化の促進作用を有する骨形成因子の一種である。BMP-1 は hPRL  
 の N 末端側 152 番目と 153 番目の間を切断し、約 17kDa の Vi を産生する (Ge et  
 al. 2007)。また、GH はプラスミン、トロンビン、サブチリシン、キモトリプシン  
 によって切断され Vi となり、PL はプラスミンによって切断され Vi になるこ  
 とが明らかになっている (Russell et al. 1981)。

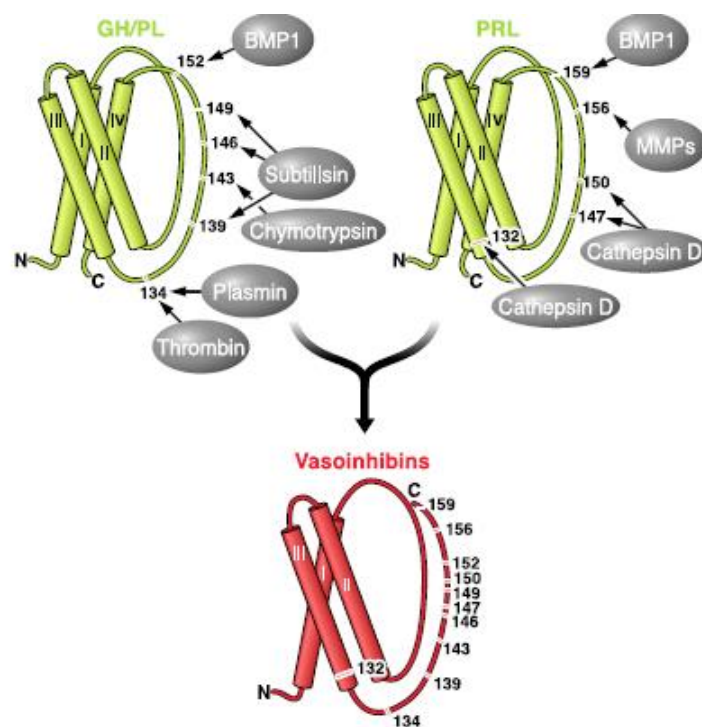


Fig. D PRL/GH/PL ファミリーの切断部位

血管新生作用を持つヒト PRL、GH、PL は種々のプロテアーゼにより切断され、  
 抗血管新生作用を持つ Vi となる。プロテアーゼは、第 3 ヘリックスと第 4 ヘリ  
 ックスを繋ぐ long-loop 内を切断し、様々な分子量の Vi が産生される。(Clapp  
 et al. 2009 より引用)

## b. 生理作用

Vi の作用は名前の由来にもなっている血管新生を抑制する作用が主である。

血管新生とは、既存の血管から新しい血管が分岐することである。血管は、血管平滑筋細胞、周皮細胞からなる壁細胞と血管内皮細胞により構成されている。血管新生は、血管内皮細胞と壁細胞間の接着が緩むことから始まるとされている (Clapp et al. 2009)。この接着のゆるみは、一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase: NOS) を介した一酸化窒素 (nitric oxide: NO) や血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) により引き起こされる。血管内皮細胞と壁細胞間の接着が緩んだ後、血管内皮細胞は細胞外基質分解酵素により基底膜、細胞外基質を分解しつつ、VEGF や線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF) により増殖促進作用を受けることで新たな血管を形成していく。FGF や VEGF は血管内皮細胞に作用することで、血管内皮細胞の増殖を促進することが知られており (Clapp et al. 2008)、Vi はこの細胞増殖を抑制することで血管新生を抑制する。インターロイキン-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ : IL-1 $\beta$ ) は血管内皮細胞の遊走を促進することが報告されており、Vi は IL-1 $\beta$  による細胞遊走を抑制する (Lee S. H. et al. 2007)。血管新生の過程において、血管内皮細胞が増殖、遊走することで新たな血管を形成するが、Vi は血管内皮細胞の増殖、遊走を阻害し、血管新生を抑制することが報告されている

(Clapp et al. 2006)。加えて、Vi は血管内皮細胞のアポトーシスを誘導することも報告されている。

また、Vi は NO の産生を抑制することにより血管拡張の抑制を引き起こすことが知られている。血管内皮細胞における NO の産生には NOS が密接に関係している。NOS にはアイソフォームである、誘導型 NOS (inducible nitric oxide: iNOS)、内皮型 NOS (endothelial nitric oxide synthase: eNOS)、神経型 NOS (neuronal nitric oxide synthase: nNOS) が存在する。Vi は STAT1 を抑制することで iNOS の発現を抑制、eNOS のリン酸化を抑制することで NO 合成を抑制し、血管拡張を抑えることが報告されている (Garcia et al. 2008, Garcia et al. 2014, Lee S. H. et al. 2005)。

### c. シグナル伝達

Vi の抗血管新生作用は血管新生の様々な段階を阻害することによりその作用を示す。現在までに、その様々な作用を引き起こしているシグナル伝達経路の一部が明らかになっている。

VEGF による血管内皮細胞の増殖は Ras が活性化され、それに続く MAPK カスケードによって引き起こされる。Vi は Ras および下流の Raf を抑制することで MAPK を抑制する (Lee S. H. et al. 2007)。加えて、MAPK を抑制する Sprouty-

1 の発現を上昇させる (Sabatell et al. 2010)。MAPK の抑制により、cyclin D1 や cyclin B1 を減少させることで細胞増殖を抑制する。また、cyclin 依存性キナーゼ阻害因子 p21 cip1 や p27 kip1 を刺激することによって、G0 期と G2 期で内皮細胞の細胞周期を停止させることも報告されている (Tabruyn et al. 2005)。

Vi は B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL) を Bcl-extra small (Bcl-xS) へと変換することで caspase-1、caspase-3 を活性化し、アポトーシスを引きこす。また、核内因子 kB (nuclear factor-kappa B: NFkB) の活性化を引き起こし、caspase-8、caspase-9 を活性化し、caspase-3 によるアポトーシスを引き起こすことが報告されている。

#### d. 受容体

Vi は PRLR と結合するが、その結合は非常に弱く、PRL と同様のシグナル伝達はおこらないと考えられている (Clapp et al. 1989)。PRL の PRLR に対する結合は PRL の第 4 ヘリックスが主要結合部位であるが、Vi ではその第 4 ヘリックスがプロテアーゼにより切断され欠損しているため、PRLR に対する結合が弱くなっていると考えられる。これまでに、Vi と高い親和性を持つタンパク質として 52kDa と 32kDa のタンパク質がウシ脳微小血管内皮細胞において同定されてい

るが(Clapp and Weiner 1992)、その後、Vi の受容体に関する報告は少なく、受容体は未解明のままである。近年の報告において、マウスの血漿中で内在性 PAI-1 と Vi が複合体を形成することが報告されている(Bajou et al. 2014)。血管内皮細胞表面で、PAI-1/urokinase-type plasminogen activator (uPA)/uPA 受容体 (uPAR) 複合体と共局在し、その複合体形成が Vi の抗血管新生作用に必要であることが報告されている(Bajou et al. 2014)。しかし、Vi のすべての作用を説明出来る特定の受容体は未だ発見されておらず、異なる細胞表面受容体が存在する可能性が考えられる。

#### e. Vi と疾病

PRL-Vi がもたらす拮抗した血管新生作用が崩壊することで、疾病が引き起こされる可能性が明らかになっている。糖尿病性網膜症は糖尿病の合併症のひとつであり、視野狭窄や視力の低下、失明を招く疾患である。この網膜症は眼底の血管から脆弱な毛細血管が新生することで、網膜の圧迫や硝子体内への出血を起こす。この患者血中では Vi 濃度が低いことが示された(Triebel et al. 2009)。また Vi は直接的に網膜血管形成に作用し、血管の成長と拡大を妨げて、アポトーシスによって脈管後退を促進する(Garcia et al. 2008)。これにより Vi は糖尿病性網膜症と関連した網膜血管形成と脈管透過性を防ぎ、症状の改善と予防

を促進する。この糖尿病性網膜症のように PRL-Vi の均衡の崩壊によって疾患が引き起こされる例があり、PRL の分泌が昂進する周産期心筋症に Vi が関与する可能性が考えられている。

## 4. 周産期心筋症

周産期心筋症（peripartum cardiomyopathy: PPCM）とは、心疾患の既往がなかった女性が、妊娠、出産を機に突然心不全を発症する妊娠関連疾患である。心不全に見られる全身浮腫や呼吸困難を主な病態とし、心臓の形態は拡張型心筋症と似た左心室の肥大、拡張を示す。重症の場合は死に至るため、欧米では産褥婦間接死亡原因の上位にあり、日本においても難治性疾患に指定されている。

1971年に提唱されたPPCMの定義は「1. 出産1ヵ月前から出産5ヶ月後の間に新たに心不全が発症する」、「2. 心不全の確定的な原因がない」、「3. 心疾患の既往がない」とされている(Demakis et al. 1971)。また欧州心不全協会によるPPCMの定義は、「1. 他に原因がないにもかかわらず妊娠末期、または分娩数か月以内に左室機能収縮障害による心不全を呈する特発性心筋症」、「2. 左室駆出率(LVEF)が45%未満」とされている。この定義に基づくドイツ人PPCM患者の研究において、妊娠早期(28週以前)にPPCMを発症する患者もいたことから、PPCMは妊娠の周期に関係しているというよりも、母体の生理状態に関係している可能性が示唆された(Haghikia et al. 2013)。

## a. 発症率と危険因子

2011年に神谷らは(Kamiya et al. 2011)、左室駆出率50%以下、もしくは左室短縮率30%以下という心機能障害の閾値を含め、日本国内調査を行った。この結果では、約2万出産に1例の確率であり、高齢出産においては約1万出産に1例であることが明らかになった(Kamiya et al. 2011)。2007年の米国内調査では全体の発症率が約4,000出産に1例であり、人種別で見ると黒人(1/1,400)、アジア人(1/2,400)、白人(1/4,100)、ヒスパニック(1/9,900)の順で発症率が高く人種により発症率に差があることが分かっている(Brar et al. 2007)。また、年齢による発症率の差も報告されており、発症の50%以上が30歳以上であることが報告されている。妊娠中にタンパク尿や高血圧といった症状を示す疾患である子癩前症や高血圧がPPCMの発症に強く関与することも報告されており、約1,000症例を対象にした調査では子癩前症患者が22%、高血圧患者が37%の割合で存在した。PPCMは多胎妊娠時に頻繁に見られ、PPCM患者の9%が双子を妊娠した患者であり、報告数は少ないが、三つ子を妊娠した際にPPCMを発症した事例も報告されている(Arany and Elkayam 2016)。

その他にも薬物乱用、貧血、喘息、長期的な子宮収縮抑制剤の摂取、糖尿病、肥満、栄養失調等がPPCMの危険因子と考えられているが、これらは十分に検証されていない。



## b. 発症原因

PPCM が重篤な妊娠合併症として認識され始めたのは 18 世紀ごろと言われて  
いるが、現在に至るまで明確な発症原因は明らかになっていない。今日に至るま  
で多くの研究が行われ、発症の原因として拡張型心筋症の一病型説、異常免疫反  
応説、ウイルス性心筋炎説、遺伝的な要因、内分泌異常などが発症原因と提唱さ  
れている (Ntusi and Mayosi 2009, Sliwa et al. 2010)。

### b-i. 拡張型心筋症の一病型説

PPCM は病態として左心室の拡張が起こることから、妊娠時に拡張型心筋症が  
発症した状態であるとされていた。しかし、PPCM は出産 1 ヶ月前から分娩後 5  
ヶ月の産褥期に起こる疾病であり、拡張型心筋症であれば血流のストレスが最  
もかかる妊娠中期に起こることが妥当であること、PPCM は約 30%の患者で心機  
能が完全に回復するが、拡張型心筋症では殆どが回復しないことから、病状の進  
行と予後が異なるため、現在は否定されている (Bollen et al. 2015)。

### b-ii. 免疫異常説

異常な自己抗体の産生が PPCM の原因になると考えられている。妊娠中は体内  
にいる胎児への拒絶反応が起こらないよう、母体では免疫機能が低下した状態

になっているが、出産後には低下した免疫力が回復する。この免疫機能の回復が過剰に起こると心臓への障害を引き起こすと考えられている。この出産後の免疫回復は出産後 1 ヶ月前後で起こるため、PPCM の発症時期と一致している。PPCM 患者に心筋タンパク質に対する抗体、心不全に関与する  $\beta$  アドレナリン受容体の抗体が存在することが報告されている (Liu et al. 2014)。

#### b-iii. ウイルス性心筋炎説

心筋炎とは心筋細胞が炎症した病態のことであり、心臓の収縮をつかさどる心筋細胞で広範囲に炎症が起こると心臓の収縮能が低下する。多くの心筋炎はウイルスにより引き起こされることが報告されており、妊娠期は免疫機能が低下しているので、ウイルス性心筋炎への罹患率が上昇する時期である。PPCM では約 30%の患者に心筋炎が見られることが報告されており (Oconnell et al. 1986)、30%の患者からウイルスゲノムが検出されている (Bultmann et al. 2005)。

#### b-iv. 遺伝的な要因

PPCM の発症には遺伝が関与している可能性があることが報告されており、拡張型心筋症とした遺伝子に変異が起こることが明らかになっている (van Spaendonck-Zwarts et al. 2014)。また、PPCM 患者では副甲状腺ホルモン関連

タンパク質近傍の領域に一塩基多型が存在することも明らかになっている (Horne et al. 2011)。

#### b-v. 内分泌異常

心筋細胞特異的に STAT3 をノックアウトしたマウスでは PPCM と同様に、妊娠、出産を経ることで PPCM 様の左心室拡張が確認された (Hilfiker-Kleiner et al. 2007)。Signal Transducers and Activator of Transcription 3 (STAT3) は活性酸素除去酵素マンガンスーパーオキシドジスムターゼ (manganese superoxide dismutase: MnSOD) の発現を制御する因子で、酸化ストレスから心筋を保護する作用があるが、このマウスでは STAT3 が欠損したことにより、妊娠時の心臓への保護が無くなり、MnSOD が減少することで心筋への酸化ストレスが上昇する。それにより心筋での CathD が増加し、妊娠や泌乳により増加した PRL を切断し、Vi が生成される。産生された Vi の持つ抗血管新生作用により微小循環に障害を与えることで PPCM が発症する。さらに、このマウスにドーパミン DA2 型受容体のアンタゴニストであるブロモクリプチンを投与し PRL 分泌抑制処置をすることで妊娠、出産を経ても PPCM 様の症状が現れず、Vi が PPCM に関与する可能性が示された (Hilfiker-Kleiner et al. 2007)。また、このマウスは PPCM のモデルマウスとしても有用である可能性が考えられている。

また、ミトコンドリア生合成に関与し、心臓を含む多くの組織の代謝に関与している転写子補助因子であり、VEGF 産生を促進することが知られている peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) を心筋特異的にノックアウトしたマウスでも、PPCM と同様の症状を示したことが報告されている (Patten et al. 2012)。心筋細胞から PGC-1 $\alpha$  をノックアウトすると、STAT3 をノックアウトした心筋細胞と同様に酸化ストレスが上昇することで Vi が産生され、この Vi によって PPCM が引き起こされると報告されている。このマウスに対し、VEGF を単独で投与しても PPCM の発症は抑制されないが、プロモクリプチンと同時に投与することで PPCM の発症が抑制されることを明らかにした。

PI3K/Akt シグナリングは妊娠中の機械的な負荷やエストロゲンによって活性化され、妊娠中の心臓肥大や保護に関与している。しかし、心筋特異的な Akt 過剰発現マウスは PPCM と同様の症状を示し、STAT3 ノックアウトと Akt 過剰発現を組み合わせたマウスでは単独で過剰発現させる場合よりも心臓の線維化と炎症が増加することが報告されている (Ricke-Hoch et al. 2014)。

さらに、Vi が血管内皮細胞に作用すると、NF- $\kappa$ B 活性化を介した micro RNA の産生、micro RNA 含有エクソソームの放出を促進することが明らかになっている (Halkein et al. 2013)。この血管内皮細胞由来の micro RNA は心筋細胞の代謝

活性を低下させること、健常妊娠女性と比較して PPCM 患者の血中には高濃度の microRNA が存在することも明らかになっていることから、micro RNA を介した Vi の血管新生阻害作用、心筋細胞傷害作用により PPCM が引き起こされるという仮説が立てられている (Halkein et al. 2013)。

## 5. リン酸化プロラクチン

リン酸化プロラクチン (phosphorylated PRL: PPRL) は異型 PRL の一種であり、リン酸化酵素によりリン酸化された PRL の総称である。ラット、ヒト (Oetting et al. 1986)、ウシ (Brooks et al. 1990) の下垂体において、PRL のリン酸化が同定され、PRL の主要な翻訳後修飾としてリン酸化があるとされている。現在までの PPRL 解析では、リン酸化部位や PPRL 量は種特異性があるとされている (Brooks et al. 1990)。最も多く研究されているのが、ラットとヒトにおいてであり、ラットでは 177 番目のセリン、ヒトでは 179 番目のセリンがリン酸化部位であることが報告されている (Wang and Walker 1993)。また、ラットでは 58 番目もしくは 63 番目のスレオニンもリン酸化されている可能性があり (Kim and Brooks 1993)、ウシ PRL では 179 と 180 番目のセリンがリン酸化されることが報告されている (Wang et al. 1996)。

### a. 生理作用

PPRL の生理作用として、非リン酸化 PRL に対してアンタゴニストとして作用することが PRL の生理活性を測定する方法である Nb2 リンパ細胞増殖アッセイによって確認されている (Krown et al. 1992)。また、PPRL は非リン酸化 PRL の

自己分泌を調整する機能があり、GH3 細胞からの非リン酸化 PRL 分泌を抑制している (Chen et al. 1998)。その作用が PPRL の濃度依存的に変化するという報告があり、高濃度の時は、非リン酸化 PRL のアゴニストとして作用し、低濃度の時はアンタゴニストとして作用する。

PPRL は様々な癌細胞に対する作用が報告されている。PPRL はヒト前立腺癌細胞において JNK、c-fos、c-jun を活性化することでアポトーシスを誘導する (Du and Wu 2012)。また、PPRL はヒト乳がん細胞においてビタミン D 受容体及び p21 を介して細胞増殖を阻害することが報告されている (Xie et al. 2010)。加えて、PPRL は皮膚がんの主要な発がん物質である太陽光の紫外線に対する感受性を低下させる傾向にあり、紫外線による皮膚癌の発症を抑制していることが報告されている (Guzman et al. 2008)。これらの作用から、PPRL は癌に対して抑制的に働いている可能性が示唆されている。

## b. リン酸化酵素

抽出した非リン酸化 PRL を cAMP dependent kinase (PKA)、p21-activated kinase 2 (PAK2) によりリン酸化処理を行うと、リン酸化 PRL が合成されることが報告されている (Horiguchi et al. 2007)。しかし、現在までに生体内における PRL をリン酸化する酵素は同定されていない。

## 6. 本研究の概略

PRL の作用は乳汁の合成をはじめ、300 を超える機能が報告されている。その機能の多様性を担っているのが異所性 PRL と異型 PRL である。本研究では特に異型 PRL である Vi とリン酸化 PRL に着目し、その作用や合成機序を明らかにすることを目的とした。

Vi 研究では受容体探索と新規作用の解明を目指した。Vi は血管新生に関わる作用を中心に様々な作用が報告されているが、Vi の受容体については未解明である。本研究では生成過程が Vi と類似しているエンドスタチンの受容体であるインテグリンを Vi の受容体候補に挙げ、受容体探索を行った。その結果、Vi はインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を介して作用することを明らかにした。また、Vi は妊娠関連疾患である PPCM との関連性が報告されている。PPCM の病態として心臓の線維化が知られているが、現在までに心臓の線維化に関する研究は行われていない。そこで本研究では Vi により心臓の線維化が起こる可能性があると予想し、心臓線維芽細胞に対する Vi の影響解析を行った。その結果、Vi は心臓線維芽細胞の線維化マーカーである  $\alpha$ -smooth muscle actin の発現量を増加させることを確認した。

リン酸化 PRL 研究ではリン酸化酵素の同定を目指した。未修飾の PRL が PAK2、



PKAによりリン酸化されることは *in vitro* 実験で確認されているが、*in vivo* での実験は行われていない。本研究ではマウス下垂体組織における PRL とリン酸化酵素の局在を組織化学的に解析した。その結果、PAK2 と PRL の共局在が観察された。その後、下垂体において PAK2 が PRL のリン酸化を担っているか確認するため、下垂体細胞の PAK2 をノックダウンさせ、その影響を確認した。その結果、PAK2 をノックダウンさせた下垂体細胞中ではリン酸化 PRL の生成量が減少することを明らかにした。このことから、下垂体における PRL のリン酸化を担う酵素が PAK2 であることを同定した。

# 第一章 バソインヒビンの受容体探索

## 1-1 緒言

本章では、現在までに明らかになっていない Vi 受容体を特定することを目的とした。

Vi は PRL がプロテアーゼ切断されることで生成する異型 PRL の一種である。その作用は主に、抗血管新生作用であることが報告されている (Ferrara et al. 1991)。Vi の前駆体である PRL は血管新生作用を持つことが報告されており (Struman et al. 1999)、PRL と Vi は拮抗した作用を持つ。PRL は PRLR に結合し、シグナル伝達が起こることが報告されているが、Vi は PRLR に対する結合能を持っているものの、その結合力が弱く、PRL と同様のシグナル伝達は起こらないと考えられている (Clapp et al. 1989)。PRL は構造中に 4 つの  $\alpha$  ヘリックスを持ち、その第 1 ヘリックスと第 4 ヘリックスが PRLR と結合することが知られている。そのうち第 4 ヘリックスが PRLR と主に結合する部位であることが明らかになっている。しかし、Vi は CathD などのプロテアーゼにより PRLR との結合を担っている第 4 ヘリックスが欠損し、構造が変化しているため、PRLR との結合が起こらないと考えられている。また、Vi が血管内皮細胞において VEGF 誘導

性の ras やその上流の raf を抑制することで MAPK 経路を抑制すること、caspase-1 や caspase-3 を活性化させることでアポトーシスを誘導する等の作用に関わるシグナル伝達経路の解明が報告されている (Lee S. H. et al. 2007, Tabruyn et al. 2003)。このことから Vi には PRLR とは異なる Vi 受容体が他に存在することが示唆されているが、現在まで発見に至っていない。

抗血管新生因子として知られるエンドスタチンやアンジオスタチンはその生成過程や作用に Vi と類似する点を持つことが報告されている。エンドスタチンは CathD、CathB、CathL や MMP-7 等のプロテアーゼにより 18 型コラーゲンが切断されることで生成される。また、アンジオスタチンは MMP-3、MMP-7、MMP-9 によりプラスミノゲンが切断されることで生成される (Lijnen et al. 1998, Patterson and Sang 1997)。これらの抗血管新生因子を産生するプロテアーゼは、序章で述べた通り、PRL を Vi へと切断することが知られているプロテアーゼと同種である。また、前駆物質である 18 型コラーゲンやプラスミノゲンは血管新生作用を持つことが報告されている。このエンドスタチンやアンジオスタチンはインテグリンという受容体に結合することで抗血管新生作用を引き起こすことが報告されている。

インテグリンとは、細胞と細胞外マトリクス (extracellular matrix: ECM) との接着や細胞同士の接着において非常に重要な役割を担う膜貫通型の受容体

である。インテグリンは通常  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の 2 種類のサブユニットから構成され、非共有結合によりヘテロ二量体として存在している。哺乳類では 18 種類の  $\alpha$  鎖と 8 種類の  $\beta$  鎖が存在し、それらが組み合わさることで現在までに 24 種類のヘテロ二量体が同定されている (Humphries et al. 2006)。インテグリンサブユニットは、細胞外領域と膜貫通領域、細胞質領域を持つ (Nermut et al. 1988)。細胞質領域では、Talin、Vinculin、Focal adhesion kinase (FAK)、 $\beta$ -actin、Integrin-linked kinase などの細胞骨格分子やシグナル伝達因子と結合しており、細胞外領域ではコラーゲンやフィブロネクチン、ラミニンなどの ECM 分子と結合している。インテグリンは数多くのリガンドと結合能を持つことが知られているが、インテグリンの多くは ECM のアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) 配列を認識し、結合している。しかし、近年 RGD 配列を有していないエンドスタチンとインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$ 、タムスタチンと  $\alpha v \beta 3$  との結合が報告された (Sudhakar et al. 2003)。エンドスタチンはインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を介して FAK のリン酸化を抑制し、Ras の活性化を抑制することで細胞遊走を抑制している (Urbich et al. 2002)。また、タムスタチンはインテグリン  $\alpha v \beta 3$  を介して FAK のリン酸化を抑制し、PI3K の活性化を抑制することで細胞増殖を抑制している (Maeshima et al. 2002)。インテグリンの基本シグナル経路は VEGF といった増殖因子と同じであり、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  に結合するエンドスタチンは内

皮細胞において cyclinD1 を抑制することでアポトーシスを引き起こす (Digtyar et al. 2007)。インテグリンは細胞接着に関与する因子と知られていたが、近年では細胞増殖や細胞遊走などに関与する受容体であることが示唆されている。

エンドスタチンやアンジオスタチンを生成する酵素がカテプシンファミリーや MMP であること、前駆物質と拮抗的な作用を持つこと、またシグナル因子である Ras を介して血管新生を抑制することに加え、Vi がエンドスタチンと同様に RGD 配列を持たないことから、本研究ではインテグリンを Vi の受容体の候補とし、Vi と結合能の評価を行った。

Vi との結合能の評価は固相結合解析により評価した。また、共免疫沈降法により Vi とインテグリンが複合体を形成するかを検証した。免疫中和実験ではインテグリン抗体を用いることにより、Vi が有するアポトーシスや細胞増殖抑制作用を中和するかを TUNEL 法及び BrdU 染色によって評価した。

## 1-2 材料と方法

### <リコンビナント Vi の作製>

本実験に用いる Vi としてリコンビナント Vi (rVi) を作製した。この rVi はマウス PRL の N 末端から 145 番目までのアミノ酸残基で構成されている。当研究室において、Vi の配列を組み込んだ pET49b(+) を大腸菌 DH5  $\alpha$  へ形質導入し、目的タンパク質の発現および精製まで北山ラベス株式会社 (Japan) に委託し作製した。大腸菌内毒素であるエンドトキシン含量は体内への投与および添加実験が可能な値の 3 分の 1 程度であるため、添加実験に悪影響なく使用できると判断した。本実験で使用したこのリコンビナント Vi は、以降 rVi と表記している。Vi は 50mM Na-Phosphate Buffer (Vi Buffer, pH8.0) に溶解されているため、本実験では Vi のコントロールとして Vi Buffer も使用した。

### <Biotin 付加>

固相結合解析に使用する rVi、Fibronectin (FN, BD Bioscience, USA)、Collagen (COL1, Sigma Aldrich, USA) リコンビナントマウス PRL (rmPRL, National Hormone & Peptide Program, USA) は EZ-Link™ NHS-PEG4-Biotinylation Kit (Thermo Scientific, USA) を用いて Biotin 付加を行った。

Kit の取り扱い説明書に従い、目的タンパク質に Biotin を付加した後、2-D Quant Kit (GE healthcare, USA) を用いて濃度測定を行った。

### <固相结合解析>

1mM MnCl<sub>2</sub>および 1mM CaCl<sub>2</sub>を含む Tris-Buffered Saline (TBS, Tris-HCl 3g, KCl 0.2g, NaCl 8g, up to milliQ 1000ml, pH7.4) で懸濁した Recombinant Human インテグリン β1 (Abnova, Taiwan)、α5β1 (R&D Systems, USA)、αvβ3 (R&D Systems)、α1β1 (R&D Systems) を 96well プレート (Thermo Scientific) に 100ng/well で添加し 4°C オーバーナイトでプレートに固相した。翌日、過剰なリコンビナントインテグリンを除去し、DELTA PLATEWASH (PerkinElmer, USA) で Wash Buffer (1mM MnCl<sub>2</sub>, 0.05% Tween20 in TBS) を用いてプレートを洗浄した。洗浄後、Blocker™ BSA in TBS (10X) Concentrate (Thermo) を TBS で 10 倍希釈にしたものを 50 μl/well 添加し 2 時間ブロッキングを行った。プレート洗浄後、あらかじめ Biotin を付加した rVi、FN、rmPRL をそれぞれ 0, 10, 100nM/well で添加し、3 時間室温で反応させた。プレートを洗浄後、Streptavidin conjugated with Peroxidase (ImmunoBioScience, USA) を 50 μl/well 添加し室温で 30 分反応させた。再び、プレートを洗浄後、1-Step™ Ultra TMB ELISA (Thermo) を 50 μl/well 添加し、室温で 20 分間反応させた。その後、1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

(WAKO) を  $50 \mu\text{l/well}$  添加して反応を停止させ、遮光後 Enspire Multimode Plate Readers (PerkinElmer) を用いて  $450\text{nm}$  における吸光度を測定した。

### <共免疫沈降法>

共免疫沈降法は immunoprecipitation kit (proteinG) (Roche, Switzerland) の方法に則って行った。 $1.1\mu\text{g}$  の rVi、Recombinant Mouse PRL (rPRL, National Hormone & Peptide Program, USA) を  $1\text{mM MnCl}_2$  を含むリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline: PBS) で希釈し調製し、それぞれ  $100\text{ng}$  の Recombinant Human Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  (R&D Systems) と混合し、 $4^\circ\text{C}$  で一晩ローテーターで振盪させながらインキュベートさせた。また、proteinG agarose  $40\mu\text{l}$  に Mouse Anti-Human Integrin alpha5beta1 Monoclonal Antibody (インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  抗体, Merck Millipore, Germany)  $2\mu\text{g}$  を加え、 $4^\circ\text{C}$  で一晩ローテーターで振盪させながらインキュベートさせ、proteinG agarose にインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  抗体を固定させた。ネガティブコントロールとして、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  抗体の代わりにマウス IgG を proteinG agarose に固定させた。翌日、抗体を固定させた proteinG agarose にマウス IgG  $2\mu\text{g}$  を加え、 $4^\circ\text{C}$  で2時間ローテーターで振盪させながらインキュベートし、ブロッキングを行った。その後、この混合液に前日に調製したインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  混合液を加え、 $4^\circ\text{C}$  で1時間ロ



ローターで振盪させながらインキュベートさせた。混合液を 4°C、12,000g、1 分で遠心後、上清をアスピレーターで除去した。その後、1mM MnCl<sub>2</sub>を含む洗浄バッファー1 (150mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, 50mM Tris-HCl, pH 7.5) 1ml を加え、ビーズを懸濁し、4°Cで 20 分間ローターで振盪させながらインキュベートさせた。再度同じ操作を繰り返した後、4°C、12,000g、1 分で遠心後、上清をアスピレーターで除去した。その後、1mM MnCl<sub>2</sub>を含む洗浄バッファー2 (500mM NaCl, 0.1% Nonidet P40, 0.05% sodium deoxycholate, 50mM Tris-HCl, pH 7.5) 1ml を加え、ビーズを懸濁し、4°Cで 20 分間ローターで振盪させながらインキュベートさせた。再度同じ操作を繰り返した後、4°C、12,000g、1 分で遠心後、上清をアスピレーターで除去した。その後、1mM MnCl<sub>2</sub>を含む洗浄バッファー3 (0.1% Nonidet P40, 0.05% sodium deoxycholate, 10mM Tris-HCl, pH 7.5) 1ml を加え、ビーズを懸濁し、4°Cで 20 分間ローターで振盪させながらインキュベートさせた。4°C、12,000g、1 分で遠心後、上清をアスピレーターで完全に除去した。その後、2-メルカプトエタノールやドデシル硫酸ナトリウムを含んだ 2X Sample Buffer 50μl を加えよく混合した後、95°Cで 5 分間加熱処理を行い、proteinG agarose からタンパク質を溶出させた。室温、12,000g、1 分で遠心後、上清を回収し、その後の SDS-PAGE で使用した。

### <SDS-PAGE>

共免疫沈降法で得られたサンプルと分子量マーカー (Precision Plus Protein WesternC Standards, Bio-Rad, USA) を各ウェルにそれぞれ 15 $\mu$ l、5 $\mu$ l 添加し、270V、30mA、140 分で泳動した。この時、ポジティブコントロールとして、rVi、rPRL を同時に添加し泳動した。rVi と rPRL の検出には、15% Polyacrylamide Gel を使用した。なお、泳動バッファーには Tris-Glycine Buffer (Tris 3.0g, Glycine 14.4g, 10% SDS 10.0ml, milliQ to 1,000ml) を用いた。

### <Western blotting>

SDS-PAGE 後、Polyacrylamide Gel はセミドライ式転写装置 (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad, USA) を用いて、PVDF メンブレン (pore size 0.45 $\mu$ m, Merck Millipore, Germany) にタンパク質を転写した。転写条件は 0.2A、10V、30 分で行った。転写バッファーには、Tris-Glycine Buffer (Tris 3.0g, Glycine 14.4g, Methanol 200ml, milliQ to 1,000ml, pH 8.3) を用いた。転写後、メンブレンは Tween 20 を含むトリス緩衝生理食塩水 (Tris Buffered Saline with Tween 20: T-TBS) で室温で 15 分間振盪しながら洗浄し、EzBlock Chemi (ATTO, JAPAN) を用いて室温で 30 分間振盪しながらブロッキングを行った。ブロッキング後、T-TBS で室温で各 5 分、3 回振盪しながら洗浄した。その後、一次抗体

を 4°Cで一晩振盪させながら反応させた。翌日、T-TBS で室温で各 5 分、3 回振盪させながら洗浄した。その後、二次抗体を室温で 30 分間振盪させながら反応させた。反応後、T-TBS で室温で各 5 分、3 回振盪しながら洗浄した。その後、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore, Germany) をメンブレン 1cm<sup>2</sup>あたり 0.1ml の割合でメンブレンに注ぎ、遮光下で室温 5 分間反応させた。反応後のメンブレンは、LAS-4000 (GE healthcare, USA) を用いて検出を行った。一次抗体は Rabbit 由来 PRL-N 末端認識抗体 ( $1.0 \times 10^{-3}$ , 当研究室作製)、二次抗体は peroxidase Labeled anti-rabbit IgG ( $1.0 \times 10^{-4}$ , Vector Laboratories, USA) を使用した。なお、一次抗体、二次抗体ともに、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution (TOYOBO, Japan) を用いて希釈を行った。また、分子量マーカーの検出には Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate (Bio-Rad, USA) を使用した。

Table. B 共免疫沈降法から Vi 検出までの実験手法まとめ

1. Vi とインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  の結合  
1.  $1\mu\text{g}$  Vi or PRL と  $100\text{ng}$  インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を  $4^\circ\text{C}$  0/N で反応  
↓
2. ビーズとインテグリン抗体の結合  
 $40\mu\text{l}$  アガロースビーズと  $2\mu\text{g}$  インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  抗体を  $4^\circ\text{C}$  0/N で反応  
※ネガティブコントロールには  $2\mu\text{g}$  マウス IgG を使用  
↓
3. ブロッキング  
抗体が結合したアガロースビーズと  $2\mu\text{g}$  マウス IgG を  $4^\circ\text{C}$  2h で反応  
↓
4. 免疫沈降  
ブロッキング後の抗体が結合したアガロースビーズと 1. で調整した Vi or PRL/インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  複合体を  $4^\circ\text{C}$  1h で反応  
↓
5. 洗浄  
洗浄バッファー1-3 を用いて洗浄  
↓
6. 溶出  
溶出バッファーを用いて溶出  
↓
7. 検出  
溶出したサンプルを SDS-PAGE、その後、PRL-N 末端認識抗体を用いて Western Blotting

#### <細胞培養>

本実験では、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC, DS ファーマバイオメディカル, Japan) を使用した。培養するにあたり、EGM™-2 BulletKit (ロンザジャパン, Japan) を培養培地 (endothelial growth medium: EGM) として使用し、Kit の方法に則って調製した。5% CO<sub>2</sub>、95% Air、37°C で培養し、5 日ごとに  $2.5 \times 10^3$

cells/cm<sup>2</sup>の割合で継代した。実験には、継代数 5-7 代目の細胞を用いた。

#### <TUNEL 法>

TUNEL 法は In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche, Switzerland) を使用し、kit の方法に則って行った。HUVEC を CORNING® BIOCOAT™ CELLWARE RAT TAIL COLLAGEN, TYPE1 8-Well CultureSlides (Corning, USA) に  $1.0 \times 10^4$  cells/well の密度で播種した。その後、5% CO<sub>2</sub>、95% Air、37°C で 24 時間培養して、HUVEC をスライドに接着させた。翌日、培地をアスピレーターで除去し、3.2μg の rVi を含む培地を添加し、24 時間培養した。コントロールとして、Vi buffer を含む培地と培地のみ (EGM) を添加した。翌日、PBS で 1 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド/PBS で HUVEC を室温で 1 時間固定させた。PBS で各 2 分、2 回洗浄後、0.1% Triton X/クエン酸ナトリウムバッファーを用いて氷上で 5 分間反応させ、浸透化処理を行った。PBS で各 2 分、2 回洗浄後、3% Bovine Serum Albumins (Sigma, USA)、20% Normal goat serum (Vector Laboratories, USA) を含む Tris-HCl buffer (pH7.5) を用いて室温で 30 分間ブロッキングを行った。PBS で各 2 分、2 回洗浄後、アポトーシス細胞を染色するために TUNEL 反応混合液を添加し、37°C で 1 時間遮光下でインキュベートした。この TUNEL 反応混合液は、Kit の方法に従い、酵素溶液であるタ

一ミナルトランスフェラーゼ、リコンビナントを標識溶液であるヌクレオチド混合液で 10 倍希釈し調製した。PBS で各 5 分、3 回洗浄後、核の染色のために FLUOROSHIELD™ Mounting Medium With 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Immuno BioScience Corp, USA) を添加し、MICRO COVER GLASS (MATSUNAMI, Japan) をかけて封入後、室温で 30 分以上遮光下で反応させた。その後、共焦点レーザー顕微鏡 FLUOVIEW FV1000 (OLYMPUS, Japan) を用いて蛍光発色を観察し、細胞の写真を撮影した。なお、観察の際のポジティブコントロールとして、DNA 分解を引き起こすために Recombinant DNase I (RNase-free) (Takara, Japan) を用いて DNase 処理した HUVEC を用意した。また観察の際のネガティブコントロールとして、TUNEL 反応試薬を添加しない TUNEL 未染色である HUVEC を用意した。

#### <BrdU 染色>

HUVEC を CORNING® BIOCOAT™ CELLWARE RAT TAIL COLLAGEN, TYPE1 8-Well CultureSlides (Corning, USA) に  $1.0 \times 10^4$  cells/well の密度で播種した。その後、5% CO<sub>2</sub>、95% Air、37°C で 24 時間培養して、HUVEC をスライドに接着させた。翌日、培地をアスピレーターで除去し、3.2µg の rVi を含む培地を添加し、24 時間培養した。コントロールとして、Vi buffer を含む培地と培地のみ (EGM) を添加した。翌日、培地をアスピレーターで除去し、10µM の BrdU (Merck Millipore,

Germany) を含む培地を添加し、24 時間培養した。翌日、PBS で 1 回洗浄し、70% エタノールで HUVEC を室温で 30 分間固定させた。この後の PBS 洗浄後から Detector Antibody 添加までは、BrdU Immunohistochemistry Kit (Merck Millipore, Germany) を使用し、kit の方法に則って行った。PBS で各 2 分、2 回洗浄後、Denaturing Solution を用いて室温で 30 分間反応させ、浸透化処理を行った。PBS で各 2 分、2 回洗浄後、Blocking Solution を用いて室温で 30 分間ブロッキングを行った。その後、Biotin 標識された BrdU 抗体である Detector Antibody を添加し、室温で 1 時間反応させた。PBS で各 2 分、2 回洗浄後、10 倍希釈したブロックエース (大日本住友製薬, Japan) で 500 倍希釈した DyLight® 594 Streptavidin (Vector Laboratories, USA) を添加し、室温で 2 時間遮光下で反応させた。核の染色のために FLUOROSHIELD™ Mounting Medium With 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Immuno BioScience Corp, USA) を添加し、MICRO COVER GLASS (MATSUNAMI, Japan) をかけて封入後、室温で 30 分以上遮光下で反応させた。その後、共焦点レーザー顕微鏡 FLUOVIEW FV1000 (OLYMPUS, Japan) を用いて蛍光発色を観察し、細胞の写真を撮影した。

#### <免疫中和実験>

インテグリン  $\beta 1$ 、 $\alpha 5 \beta 1$  抗体を用いた免疫中和実験を行った。HUVEC を

CORNING® BIOCOAT™ CELLWARE RAT TAIL COLLAGEN, TYPE1 8-Well CultureSlides (Corning, USA) に  $1.0 \times 10^4$  cells/well の密度で播種した。その後、5% CO<sub>2</sub>、95% Air、37°C で 24 時間培養して、HUVEC をスライドに接着させた。翌日、培地をアスピレーターで除去し、PBS で 1 回洗浄後、Mouse Anti-Human Integrin beta1 Monoclonal Antibody (インテグリン β1 抗体, clone 18/CD29 : BD Transduction Laboratories) を  $6.0 \times 10^{-2}$  μg/well 添加、または Mouse Anti-Human Integrin alpha5beta1 Monoclonal Antibody (インテグリン α5β1 抗体, Merck Millipore, Germany) を  $6.0 \times 10^{-2}$  μg/well 添加し、2 時間反応させた。インテグリン抗体の対照としてマウス IgG を使用した。2 時間後、培地をアスピレーターで除去し、3.2μg の rVi を含む培地を添加し、24 時間培養した。コントロールとして、Vi buffer を含む培地と培地のみ (EGM) を添加した。その後の TUNEL 法、BrdU 染色は前述した通りに行った。

### <細胞数計測>

細胞数計測は NIH imageJ software を用いて行った。1well から 100 倍の倍率で 5 か所の写真を撮影し、DAPI 陽性核と TUNEL 陽性核または BrdU 陽性核を合わせた画像を取得した。それぞれの色の核を分節化して認識し、個数計測によりシグナル数を測定した。1well 中の 5 枚の画像それぞれにおいて同様の操作を行



い、DAPI と TUNEL、BrdU シグナルの平均値を算出した。その後、画像内の DAPI シグナルにおける TUNEL シグナルの割合および DAPI シグナルにおける BrdU シグナルを TUNEL 陽性細胞率、BrdU 陽性率として算出した。

#### <統計解析>

TUNEL 法と BrdU 染色から得られた細胞数計測の測定結果は、平均値±標準誤差 (Mean±SEM) で表した。有意差検定には t 検定を用いた。P<0.05 で有意差ありとした。

## 1-3 結果

### *Vi* とインテグリンの結合確認実験

*Vi* がインテグリンに対して結合能を示すかを固相結合解析を用いて検証した。

インテグリン  $\beta 1$  を固相した well に FN を 10nM、100nM 添加した際の吸光度を測定した。その結果、10nM、100nM 共に 0nM と比べて有意に高い吸光度が確認された。また、*Vi* を 10nM、100nM 添加した際も同様に 10nM、100nM 共に 0nM と比べて有意に高い吸光度が確認された。しかし、mPRL を添加した際は濃度に関わらず吸光度の増加は見られなかった。また、全ての添加濃度で FN よりも *rVi* が高い吸光度を示していた (Fig. 1-1a)。

インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を固相した well に FN を 10nM、100nM 添加した際の吸光度を測定した。その結果、10nM、100nM 共に 0nM と比べて有意に高い吸光度が確認された。また、*Vi* を 10nM、100nM 添加した際も同様に 0nM と比べて有意に高い吸光度が確認された。しかし、mPRL を添加した際は濃度に関わらず吸光度の増加は見られなかった。また、全ての添加濃度で FN よりも *rVi* が高い吸光度を示していた (Fig. 1-1b)。

インテグリン  $\alpha 1 \beta 1$  を固相した well に COL1 を 10nM、100nM 添加した際の吸光度を測定した。その結果、10nM、100nM 共に 0nM と比べて有意に高い吸光度が

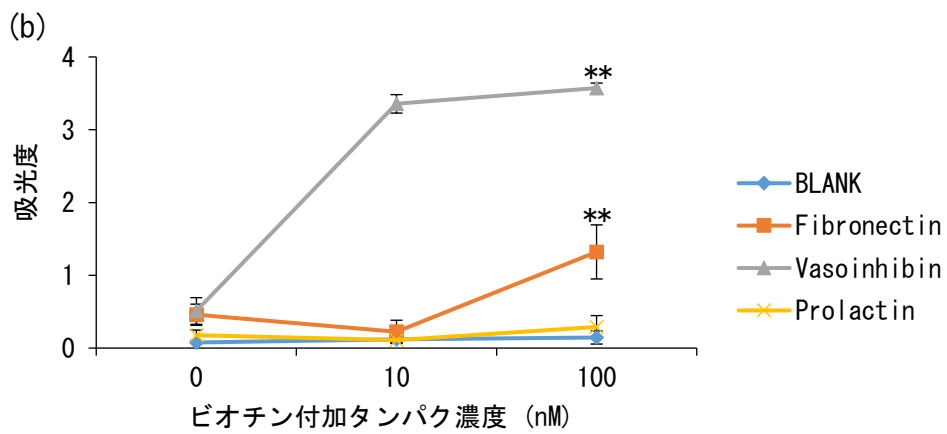
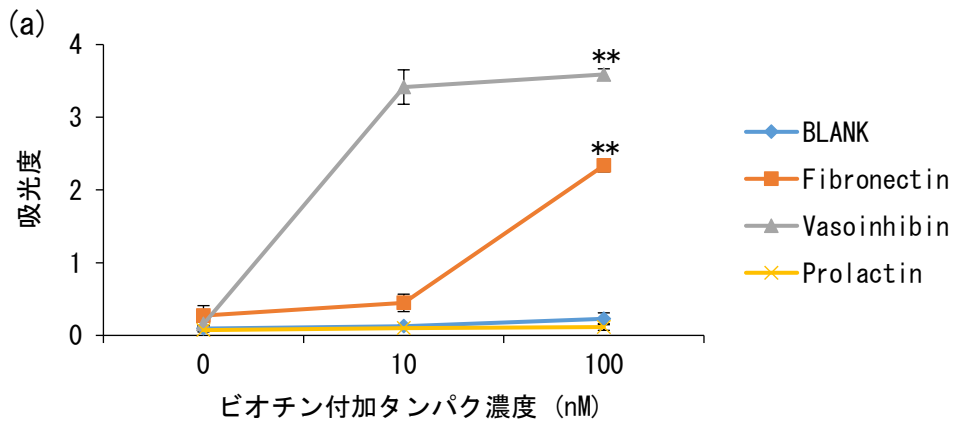


Fig. 1-1 インテグリン $\beta 1$ 及びインテグリン $\alpha 5\beta 1$ の結合能解析  
 0、10、100nMのビオチン付加タンパク質を100ng/wellのインテグリンでコートした96ウェルプレートに添加し、3時間後、吸光度を測定した。

(a) インテグリン $\beta 1$

(b) インテグリン $\alpha 5\beta 1$

(Mean $\pm$ SEM、n=3、\*\*=p<0.01)

確認された。また、Vi を 10nM、100nM 添加した際も同様に 0nM と比べて有意に高い吸光度が確認された。しかし、mPRL を添加した際に吸光度の増加は見られなかった。また、全ての添加濃度で rVi よりも COL1 が高い吸光度を示していた (Fig. 1-2a)。

インテグリン  $\alpha v \beta 3$  を固相した well に FN を 10nM、100nM 添加した際の吸光度を測定した。その結果、10nM、100nM 共に 0nM と比べて有意に高い吸光度が確認された。また、Vi を 10nM、100nM 添加した際も同様に 0nM と比べて有意に高い吸光度が確認された。しかし、mPRL を添加した際に吸光度の増加は見られなかった。また、全ての添加濃度で FN と rVi は同じ程度の吸光度を示していた (Fig. 1-2b)。

### **インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ と Vi の結合実験**

固相結合解析の結果から、Vi との結合をより確実にするため、最も結合能が高いインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  と Vi を用いて、共免疫沈降を行った。その後、Vi を検出する抗体を用いて Western Blotting を行った。Vi とインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  をプラインキュベートした混合液からは Western Blotting により 16kDa 付近にバンドが検出された。一方で、PRL とインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  をプラインキュベートした混合液からは 23kDa 付近のバンドが検出されなかった。また、インテグリン

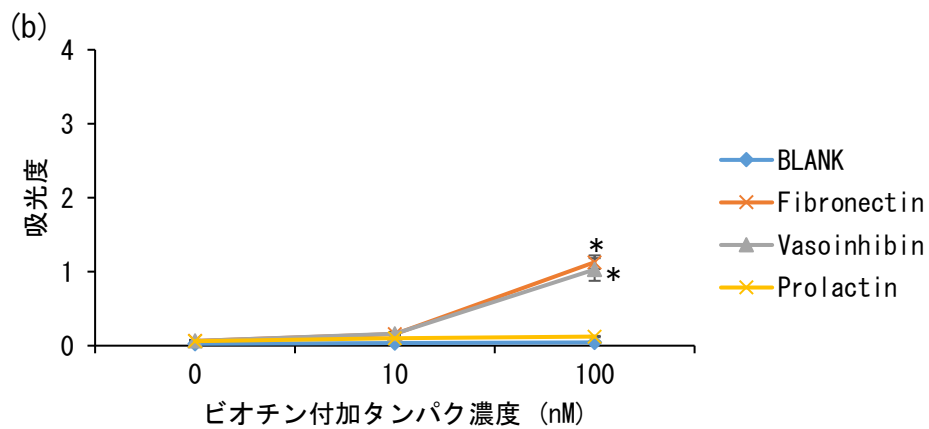
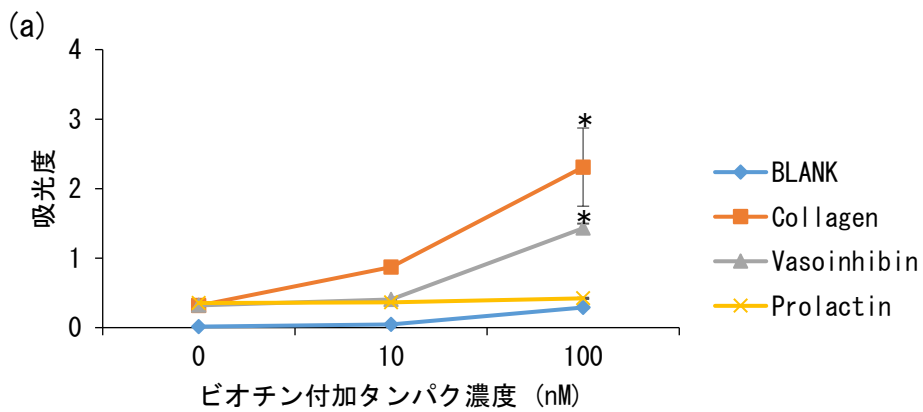


Fig. 1-2 インテグリン  $\alpha 1 \beta 1$  及びインテグリン  $\alpha v \beta 3$  の結合能解析  
 0、10、100nM のビオチン付加タンパク質を 100ng/well のインテグリンコートした 96 ウェルプレートに添加し、3 時間後、吸光度を測定した。

(a) インテグリン  $\alpha 1 \beta 1$

(b) インテグリン  $\alpha v \beta 3$

(Mean  $\pm$  SEM、n=3、\* $=p < 0.05$ )

$\alpha 5 \beta 1$  抗体の代わりにマウス IgG を用いて共免疫沈降を行った結果、Vi、PRL とともに同じ分子量のバンドが検出されなかった (Fig. 1-3)。

### 免疫中和実験

Vi がインテグリンを介して作用しているかを検証するために、HUVEC へ Vi 刺激をする前にインテグリン抗体を添加し、インテグリンを中和することで、Vi の HUVEC に対するアポトーシス促進作用が中和されるかどうかを TUNEL 法を用いて確認した。

抗体非存在下では、Vi により HUVEC の TUNEL 陽性細胞率が 80%を超えており、コントロールと比べ優位に増加したが、インテグリン  $\beta 1$  抗体で中和した条件下では、Vi を添加した際の TUNEL 陽性細胞率上昇が見られず、コントロールとの TUNEL 陽性細胞率に差がなかった (Fig. 1-4)。また、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  抗体で中和した条件下でも、Vi 添加による TUNEL 陽性細胞率上昇が見られず、コントロールとの TUNEL 陽性細胞率に差はみられなかった (Fig. 1-5)。

インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  中和により Vi の細胞増殖作用が抑制されるかを BrdU 染色により評価した。しかし、本研究における 24 時間の Vi 刺激では HUVEC の細胞増殖率に影響を与えなかった (Fig. 1-6)。

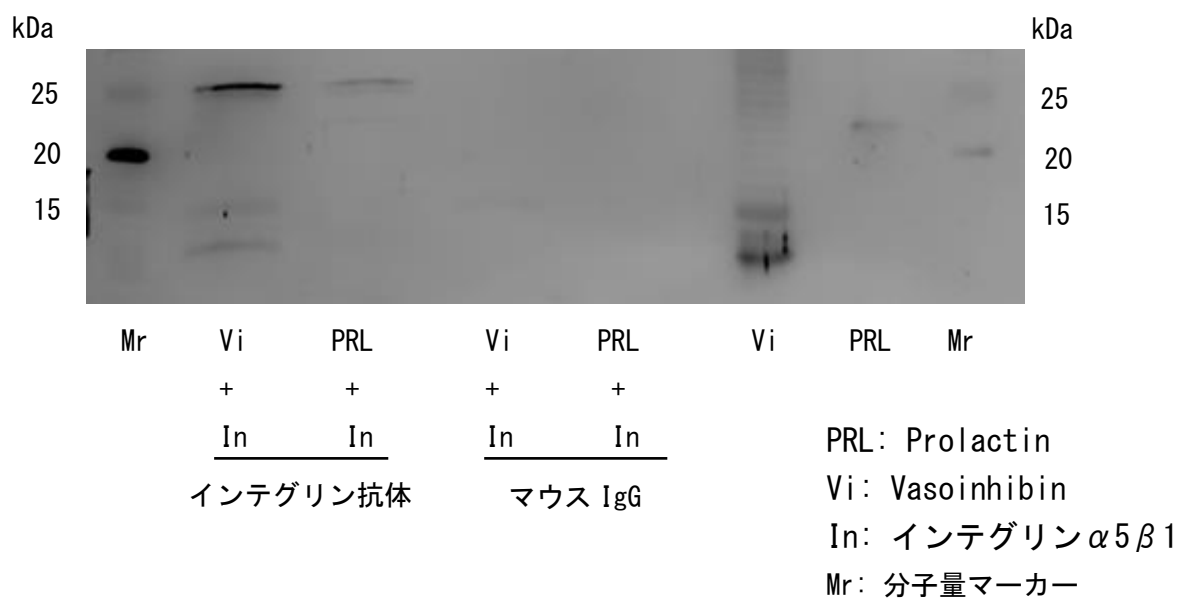


Fig. 1-3 バソインヒビンとインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を用いた共免疫沈降  
 インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を用いた免疫沈降後の rVi と mPRL を PRL 抗体  
 を用いた Western blotting で検出した。マウス IgG は免疫沈降のネ  
 ガティブコントロールとして用いた。

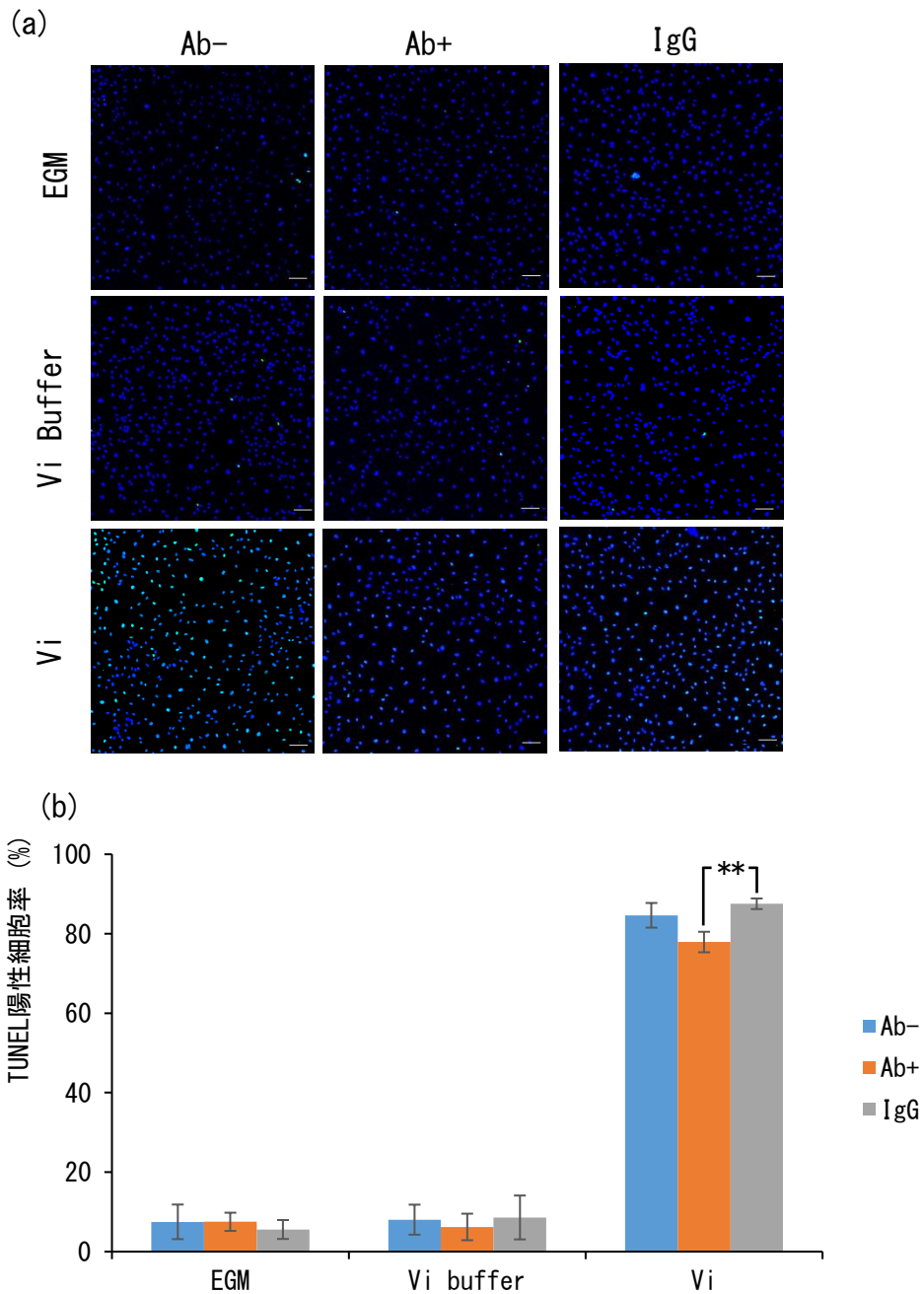


Fig. 1-4 インテグリン $\beta$ 1抗体を用いた免疫中和実験

(a) インテグリン $\beta$ 1抗体を添加したHUVECにViを添加し、24時間培養した後、TUNEL法により染色を行った。青：核、緑：TUNEL陽性細胞

(b) TUNEL陽性細胞率を数値化し、グラフ化した。

(Mean $\pm$ SD、n=3、\*\*=p<0.01)



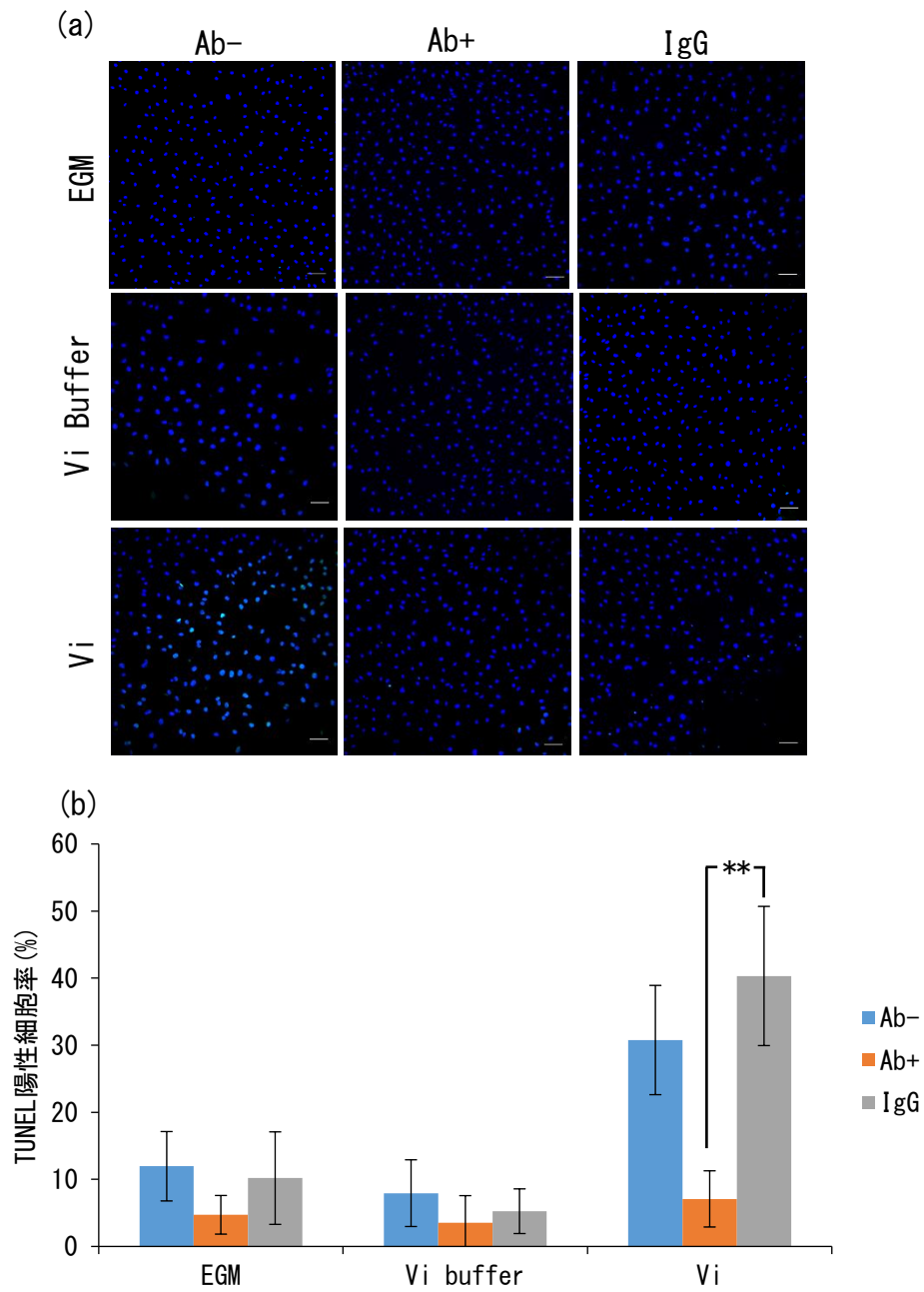


Fig. 1-5 インテグリン $\alpha 5\beta 1$ 抗体を用いた免疫中和実験

(a) インテグリン $\beta 1$ 抗体を添加したHUVECにViを添加し、24時間培養した後、TUNEL法により染色を行った。青：核、緑：TUNEL陽性細胞

(b) TUNEL陽性細胞率を数値化し、グラフ化した。

(Mean $\pm$ SD、n=3、\*\*=p<0.01)

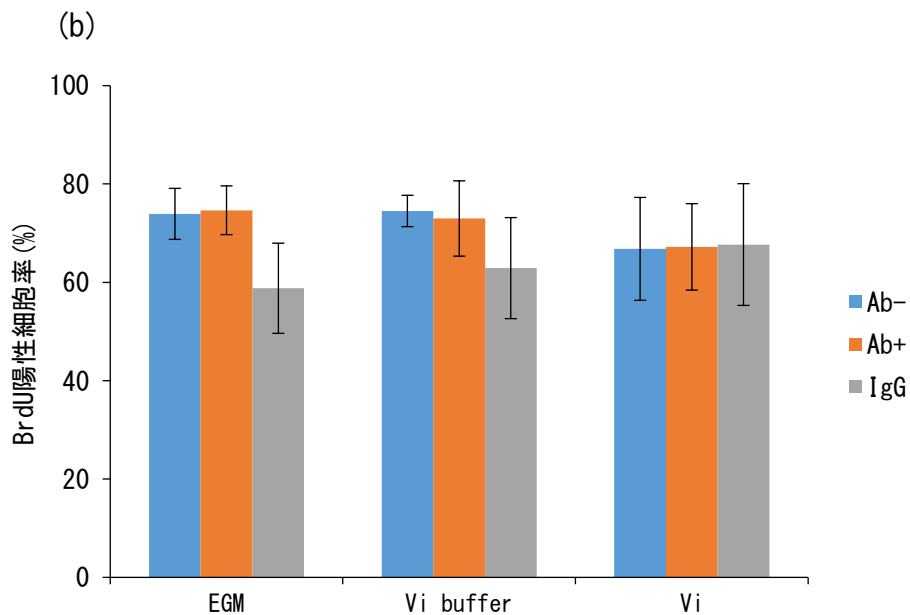
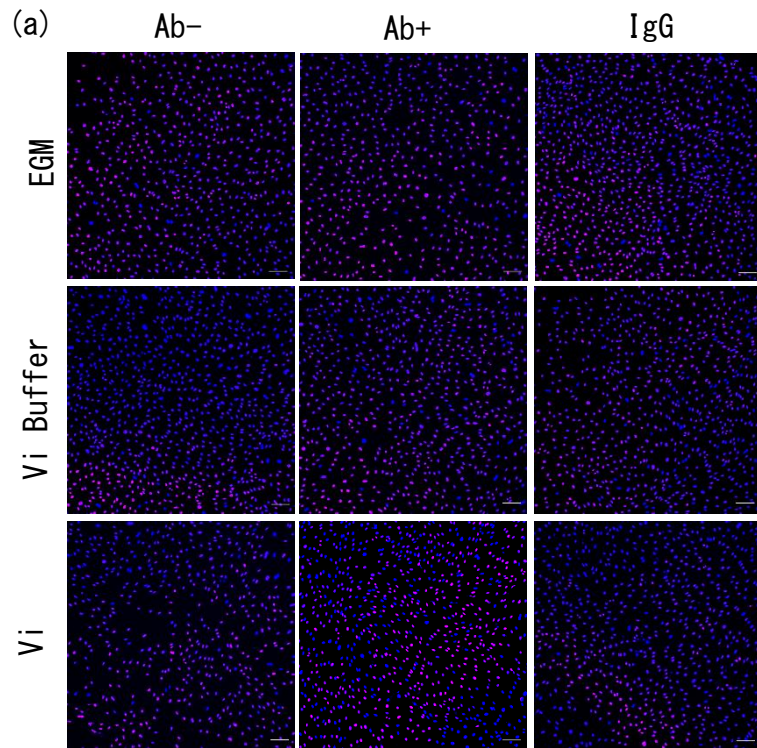


Fig. 1-6 インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  抗体の細胞増殖率に与える影響

(a) インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  抗体を添加した HUVEC に Vi を添加し、24 時間培養した後、BrdU 染色法により染色を行った。青：核、赤：BrdU 陽性細胞

(b) BrdU 陽性細胞率を数値化し、グラフ化した。

(Mean  $\pm$  SD、n=3)

## 1-4 考察

本章では、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  が Vi の受容体である可能性を示唆した。インテグリンは  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の 2 つのサブユニットから構成され、現在までに 24 種類のヘテロ二量体が同定されている (Humphries et al. 2006)。その中でインテグリン  $\beta 1$  鎖は最も多くの組み合わせを持ち、ヘテロ二量体を構成している。そこで、固相结合解析により Vi がインテグリン  $\beta 1$  鎖と結合するかを検討したところ、インテグリン  $\beta 1$  と Vi が結合することが確認された。また、インテグリンは通常二量体として存在するため、インテグリンアイソフォームであるインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$ 、インテグリン  $\alpha 1 \beta 1$ 、インテグリン  $\alpha v \beta 3$  と結合するかを検討した。その結果、検討したすべてのインテグリンアイソフォームに Vi が結合することを示した。特にインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  は他のインテグリンアイソフォームに比べて高い結合能を示していた。この可能性をさらに検証するために、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  と Vi を用いた共免疫沈降を行ったところ、固相结合解析と同様に Vi とインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  が結合することを示した。また、免疫中和実験により、HUVEC に対する Vi の作用がインテグリン  $\beta 1$ 、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  抗体で抑制されるかを検討したところ、TUNEL 染色において免疫中和によるアポトーシス率の低下が見られた。このことから、Vi がインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を介してアポトー

シスを誘導していることを明らかにした。

Vi は PRL と拮抗的な作用を示すことから、PRLR とは異なる受容体が存在する  
と考えられている。共免疫沈降の結果から分かる通り、PRL とインテグリン  $\alpha 5$   
 $\beta 1$  の結合は確認されなかったことから、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  と Vi が特異的な  
作用に関与していることが考えられる。前駆物質である PRL とは結合せず、Vi  
のみと結合する理由は両者の構造の違いによるものであると推測される。その  
生成過程に Vi と多くの類似点を持つ、抗血管新生因子であるエンドスタチンや  
アンジオスタチンなどは前駆物質からの構造変化によりインテグリン結合部位  
が露出し、特異的に結合すると考えられている。その為、Vi も同様に前駆物質  
であるプロラクチンがプロテアーゼにより切断されることで構造が変化し、イ  
ンテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  との結合部位が露出する可能性が考えられる。現在までに Vi  
の詳細な立体構造は明らかにされておらず、本研究では Vi とインテグリン  $\alpha 5$   
 $\beta 1$  との結合部位を明らかにすることは出来なかった。一般的にインテグリンは  
アルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) 配列を認識し、結合することで細胞  
接着に関与することが知られている (Shiokawa et al. 1999)。細胞外マトリク  
スの一種である FN は主にインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  と RGD 配列を介して結合するこ  
とが分かっている (Nagae et al. 2012)。しかし、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  と結合す  
ることが報告されたエンドスタチンには、RGD 配列やその類似配列である GD 配

列も含まれていないことが報告されている (Sudhakar et al. 2003)。また、抗血管新生因子であるタムスタチンは RGD 配列を持っているが、インテグリンと RGD 非依存的に結合し作用することが報告されている (Floquet et al. 2004)。本研究でインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  との結合が確認された Vi は配列中に RGD 配列を持たないため、その結合はエンドスタチンやタムスタチンと同様に、RGD 非依存的な結合であることが考えられる。

インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  抗体を用いた中和実験では HUVEC に対する Vi のアポトーシス促進作用の緩和が確認された。これは Vi がインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を介してアポトーシス作用を促進している可能性を示している。Dhanabal らはエンドスタチンがインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を介して、Bcl-2 発現減少や Caspase3 の発現を増加させることで内皮細胞のアポトーシスを誘導することを報告している (Dhanabal et al. 1999)。また、Tabruyn らは HUVEC において Vi は Caspase-3、caspase-8、Caspase-9 を活性化させアポトーシスを誘導することが知られている (Tabruyn et al. 2003)。このことから Vi のシグナル伝達にはインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  が関与している可能性が考えられる。

過去の研究において、Clapp らは Vi と高い親和性を持つタンパク質として 52kDa、32kDa のタンパク質を同定している (Clapp and Weiner 1992)。しかし、インテグリンの分子量はこれらに比べて大きく、単量体でも  $\alpha$  鎖が 120-170kDa、

$\beta$ 鎖が 90-100kDa 程度である。このことから、Vi とインテグリンの複合体の形成にはその他のタンパク質が関与しており、Vi が複数のタンパク質による複合体を形成するのではないかと推測している。Bajou らは Vi が PAI-1/uPA/uPAR 複合体と共局在し、この複合体が抗血管新生作用に重要であることを報告している (Bajou et al. 2014)。また、Tarui らは uPAR がインテグリンと直接結合し、細胞内シグナル伝達を起こすことを報告している (Tarui et al. 2001)。これらのことから、Vi、インテグリン、PAI-1/uPA/uPAR が複合体を形成し、抗血管新生作用の役割を担っていることが推測できる。Vi、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$ 、PAI-1/uPA/uPAR の関係性については今後検証していく必要がある。

インテグリンは 1 つのリガンドが複数のインテグリンアイソフォームと結合することが特徴として挙げられる。タムスタチンはインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha 3 \beta 1$  と結合する (Sudhakar et al. 2003)。本研究で、Vi はインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha 1 \beta 1$  の複数のインテグリンアイソフォームと結合する可能性が示唆された。これら 3 種類のインテグリンは全て血管内皮細胞での発現が確認されており、抗血管新生作用に関与することが知られている。このことから、Vi は血管内細胞膜に存在するこれらのインテグリンと結合し、抗血管新生作用を引き起こしていると考えられる。

インテグリンは現在 24 種類のアイソフォームが報告されており、そのシグナ

ル伝達は全て同じ経路ではない。インテグリン $\alpha 1\beta 1$ とアレステンが結合すると FAK のリン酸化を抑制し、下流の Raf/MEK/ERK1/2/p38-MAPK 経路を抑制することで血管内皮細胞の遊走、増殖、管形成を阻害する。インテグリン $\alpha v\beta 3$ にタムスタチンが結合すると FAK のリン酸化を抑制し、下流の PI3k/Akt/mTOR/4EBP1 経路を抑制することで細胞増殖阻害を引き起こす (Sudhakar et al. 2003)。インテグリン $\alpha 5\beta 1$ とエンドスタチンが結合すると FAK のリン酸化を抑制し、下流の MAPK 経路を抑制する (Sudhakar et al. 2003)。つまり、インテグリンアイソフォームにより伝達するシグナル経路が異なり様々な作用を誘導していることが分かる。タムスタチンのように複数のインテグリンを受容体としている分子では、抗血管新生作用や抗腫瘍性作用等の作用が異なるシグナル伝達経路で制御されていることが報告されている (Borza et al. 2006)。このことからアポトーシスや増殖阻害、血管拡張阻害等、数多くの機能を持っている Vi は一種類のインテグリンに結合するだけでなく、複数のインテグリンに結合することでこれら作用のシグナル伝達を引き起こしていることが考えられる (Fig. E)。しかし、本研究では固相結合解析で Vi とインテグリン $\alpha v\beta 3$ 、インテグリン $\alpha 1\beta 1$ との結合を示しただけであり、これらのインテグリンが Vi の受容体であると結論付けるには更なる検証が必要である。

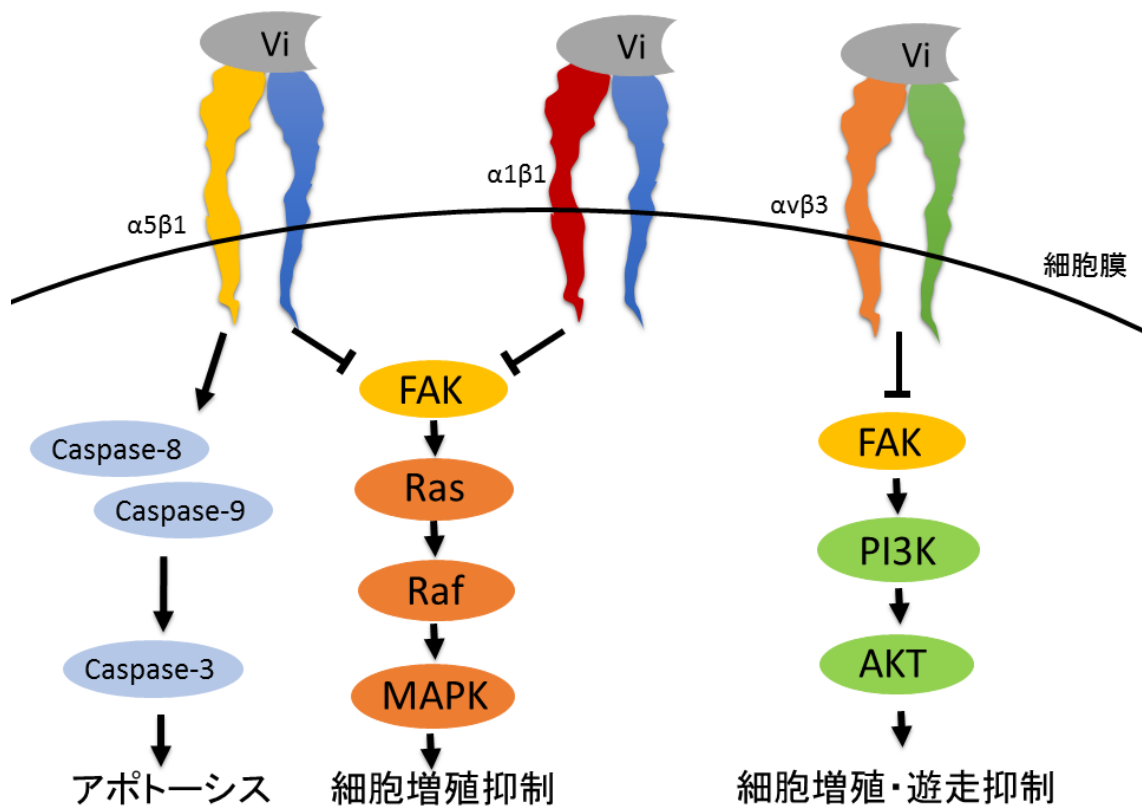


Fig. E Vi とインテグリンアイソフォームのシグナル伝達の仮説

Vi はインテグリンアイソフォームに結合し、異なるシグナル伝達経路を介して様々な作用を発現する。また、同じアイソフォームから異なるシグナル伝達経路を活性化する。



## 第二章 心臓線維芽細胞における Vi の影響解析

### 2-1 緒言

周産期心筋症 (Peripartum cardiomyopathy: PPCM) とは心臓病に罹ったことのない女性が妊娠出産を経て、発症する心疾患である。現在に至るまで、明確な発症原因は不明であるが、PRL がプロテアーゼにより切断され生成される異型 PRL の一種である Vi が関与している可能性があるとして報告された (Hilfiker-Kleiner et al. 2007)。この Vi のもつ抗血管新生作用が妊娠に伴う血管新生を抑制することで、心筋症を発症するのではないかという仮説が立てられている。これらの報告から PPCM の発症原因は Vi ではないかとして様々な研究が行われている。

PPCM の症状は様々なものがあり、その中の 1 つに心臓の線維化が挙げられる。心臓の線維化とは心室中に異常なコラーゲン蓄積が見られる症状のことである。このコラーゲンの蓄積は主に I 型コラーゲンによるものであり (Jugdutt 2003)、心筋細胞の脱落を必要としない反応性線維化と心筋細胞の脱落した隙間を埋めるように起こる修復性線維化の 2 つに分類される (Weber and Brilla 1992)。線維化は心筋細胞の脱落による心臓の破裂を防ぐという重要な役割を担っているが、コラーゲンには心筋細胞の収縮能は無く、線維化が進行すると心臓の硬化が

進み、心機能の低下につながるとされている。この線維化には筋線維芽細胞が関与していることが多く報告されている (Wynn and Ramalingam 2012)。筋線維芽細胞とは、線維芽細胞の活性型細胞であり、組織の線維化において重要な役割を担っている。筋線維芽細胞の発生源については様々な報告がされているが、主な発生源は線維芽細胞の分化である。線維芽細胞が筋線維芽細胞に分化すると  $\alpha$ -平滑筋アクチン ( $\alpha$ -smooth muscle actin:  $\alpha$ -SMA) を高発現し、収縮能が増加することが報告されており、 $\alpha$ -SMA は線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化マーカーとして用いられている (Hinz et al. 2001)。筋線維芽細胞は健常な人の心臓では見られず、損傷した心臓において見られることが報告されている (Souders et al. 2009)。この線維芽細胞の分化を引き起こす主な因子として報告されているのが Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) である。TGF- $\beta$  とは細胞遊走、増殖、分化、アポトーシス、細胞外マトリクス産生など、様々な作用を持つサイトカインである。TGF- $\beta$  は TGF- $\beta$  受容体に結合すると Smad2/3 のリン酸化を引き起こす。リン酸化された Smad2/3 は Smad4 と結合し、Smad 複合体を形成する。この Smad 複合体が核内へ移行し、線維化に関わるシグナル伝達を調節することが報告されている (Lan 2011)。また、TGF- $\beta$  により分化した筋線維芽細胞は、ECM タンパク質の合成促進、線維性コラーゲンの編成に関与する MMP の活性抑制や MMP の阻害剤である組織性メタロプロテアーゼ阻害因子 (Tissu

inhibitors of metalloproteinase: TIMP)の合成により ECM の分解を抑制することで線維化を引き起こすことが報告されている (Vaillant et al. 2001)。

線維化が起こる主な心疾患として心筋梗塞が挙げられる。心筋梗塞とは何らかの原因による冠動脈の狭窄により血流量が減少し、心筋が虚血状態になり壊死してしまう疾患である。この壊死した心筋細胞の穴を埋めるようにコラーゲンの蓄積が起こり、心臓の線維化が起こる。この心筋梗塞患者の血中においても TGF- $\beta$  量が増加していることが報告されている (Sanderson et al. 2001)。

PPCM は Vi の抗血管新生作用により妊娠時に起こる血管新生が抑制され、心筋が虚血状態になることで発症すると考えられている。このことから、PPCM における線維化も Vi の抗血管新生作用によって心筋が虚血状態になり、壊死することで起こっていると考えられる。これら 2 つの機序は「虚血による心筋の壊死」という点で見ると心筋梗塞と類似した機序であると言える。

しかし、PPCM 患者の血中において、心筋梗塞患者で増加する TGF- $\beta$  の血中量が健常妊娠女性と比較して増加していないことが報告されている (Forster et al. 2008)。前述した通り、線維化の主な原因は TGF- $\beta$  が主な原因であると考えられているが、近年、TGF- $\beta$  を介さない線維化の報告がされている (Kaviratne et al. 2004)。

一方で PPCM 患者ではインターロイキン 6 (Interleukin-6: IL-6) の血中量が

増加することが示されている (Forster et al. 2008)。IL-6 は、心臓では血管内皮細胞や線維芽細胞などで産生・分泌される炎症性サイトカインの 1 種であり、ラット心臓線維芽細胞においてコラーゲン量の増加や、筋線維芽細胞への分化に関与することが知られている (Melendez et al. 2010)。また、IL-6 発現の際に NF- $\kappa$ B 経路が活性化することが報告されている (Brasier 2010)。NF- $\kappa$ B とはストレスやサイトカインなどの刺激によって活性化する転写因子の一種である。不活性状態の時はインヒビターであるインヒビター  $\kappa$ B (Inhibitor-kappa B: I $\kappa$ B) と結合して細胞質内に存在している。細胞が刺激を受容すると、インヒビター  $\kappa$ B キナーゼ (Inhibitor-kappa B Kinase: I $\kappa$ K) へシグナル伝達が起こり、I $\kappa$ K が I $\kappa$ B を分解することで NF- $\kappa$ B が活性化する (Ghosh et al. 1998)。活性化した NF- $\kappa$ B は核内に移動し、mRNA の転写を促す。過去の実験において、ウシ副腎皮質毛細血管内皮細胞において Vi が NF- $\kappa$ B を活性化してアポトーシスを誘導することが報告されている (Tabruyn et al. 2003)。

これらのことから PPCM における心臓の線維化機序は TGF- $\beta$  非依存的である可能性が考えられる。本研究では、Vi が心臓線維芽細胞を活性化し、線維化を引き起こすと仮説を立て、Vi を心臓線維芽細胞に添加することで線維化関連遺伝子へ与える影響を解析する。

## 2-2 材料と方法

### <細胞培養>

本実験ではヒト心臓心室線維芽細胞 (Normal Human Cardiac Fibroblast - Venticular: NHCf-V, Lonza Japan, Japan) を使用した。10%ウシ胎児血清含有 Fibroblast Growth Medium-3 (FGM-3, Lonza Japan, Japan) を通常培地として用いた。細胞は 95% Air-5% CO<sub>2</sub>、37°C で培養し、3~4 日毎に NHCf-V は 2,500cells/cm<sup>2</sup> の割合で継代した。

### <リコンビナント Vi の作製>

本実験ではリコンビナント Vi を使用した。作製方法は第一章で記述したのと同様である。

### <NHCf に対する刺激実験>

ノンコート 60mm Dish に 5,000×10<sup>4</sup>cells/cm<sup>2</sup> の割合で NHCf を播種し、95% Air-5% CO<sub>2</sub>、37°C で培養した。24 時間後、50nM の Vi を添加し、24、48 時間刺激した。その後、0.02%EDTA-0.1%トリプシン液を用いて NHCf を Dish から剥がし、抽出 Buffer で懸濁し細胞を回収した。対照群として、Vi Buffer を添加し、24、

48 時間培養した NHCF を回収した。

#### <Total RNA 抽出>

細胞からの total RNA 抽出には RNeasy Mini Kit (Qiagen, Netherlands) を使用し、Kit のプロトコルに則り行った。抽出 Buffer で懸濁した細胞懸濁液を超音波破碎機で破碎後、同量の 70%エタノールを添加しよく混合した。RNeasy スピンカラムに細胞懸濁液を全量添加し、遠心することでカラムに RNA を吸着させた。その後、RNeasy スピンカラムに洗浄 Buffer を添加し、遠心することでカラムを洗浄した。吸着させた RNA は RNase free water で溶出した。RNA 溶液の濃度は Bio spectrometer (Eppendorf, Germany) により 260nm の波長の吸光度を測定することで算出した。

#### <逆転写>

NHCF の cDNA 作製は QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Netherlands) を使用し、Kit のプロトコルに則って行った。450-500ng の RNA を含む溶液にゲノム DNA 除去 Buffer を添加し、42°C、2 分間熱処理することで、ゲノム DNA の除去を行った。その後、Quantiscript Reverse Transcriptase、RT Primer Mix、Quantiscript RT Buffer を添加し、42°C、30 分間熱処理すること

で cDNA を作成した。最後に、95°C、3 分間熱処理することで、Quantiscript Reverse Transcriptase を不活化した。

#### <Real Time PCR>

Real Time PCR は SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, USA) を使用し、Kit に則って行った。cDNA、DNase free water、プライマー、SYBR Select Master Mix を混合して Real Time PCR を行った。No Template Control として cDNA の代わりに DNase free water を混合した。測定機器は Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA) を使用し、トリPLICATE で測定した。内在性コントロールとして GAPDH を使用した。遺伝子発現量は Vi Buffer 処理群を基準とした比率で算出した。本研究では線維芽細胞の分化マーカーである  $\alpha$ -SMA、線維化を引き起こす主要因子として知られる TGF- $\beta$ 、線維化した組織の主要構成因子である Col-I、Col-III、コラーゲンの合成酵素である MMP-1、その阻害酵素である TIMP-1、TIMP-2 の遺伝子発現を確認した。使用したプライマーとその産物塩基数を Table C に示す。

Table C: PCR および Real Time PCR で使用したプライマー

因子名	配列 (5' →3' )		Product size
$\alpha$ -SMA	Forward	CCGACCGAATGCAGAAGGA	88bp
	Reverse	ACAGAGTATTTGCGCTCCGAA	
TGF- $\beta$	Forward	TTATTGAGCACCTTGGGCACT	124bp
	Reverse	TGGGCTTGTTTCCTCACCTT	
Col-I	Forward	CAGCCGCTTCACCTACAGC	83bp
	Reverse	TTTTGTATTCAATCACTGTCTTGCC	
Col-III	Forward	GAAGATGTCCTTGATGTGC	270bp
	Reverse	AGCCTTGCGTGTTGATAT	
MMP-1	Forward	ATTTCTCCGCTTTTCAACTT	168bp
	Reverse	ATGCACAGCTTTCCTCCACT	
TIMP-1	Forward	TTGTGGGACCTGTGGAAGTA	269bp
	Reverse	CTGTTGTTGCTGTGGCTGAT	
TIMP-2	Forward	GCACATCACCTCTGTGACTT	110bp
	Reverse	AGCGCGTGATCTTGCACT	
GAPDH	Forward	ACGGATTTGGTCGTATTGGG	214bp
	Reverse	CGCTCCTGGAAGATGGTGAT	



### <免疫細胞化学(Immunocytochemistry: ICC)>

過去に IL-6 の発現に関与している NF- $\kappa$ B の活性化が心臓線維芽細胞においても関与しているか確認する為、NF- $\kappa$ B の活性化を免疫細胞化学で確認した。培地中に Vi が 50nM となるように調製した。通常培地を除去後、50nM Vi 含有培地を添加し、60min 反応させた。ポジティブコントロールは Endotoxin (Sigma-Aldrich, USA) を 100ng/ml となるよう通常培地で希釈したものを添加した。ネガティブコントロールには DMSO を添加した通常培地を添加した。Vi 添加後の培地を除去し、PBS (-) を添加して洗浄した。PBS (-) を除去後、4%PFA (PFA 40g, PBS up to 1,000ml) を添加して室温で 15 分間固定した。その後、PBS (NaCl 8.50g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 2.87g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.33g, H<sub>2</sub>O up to 1,000ml) で洗浄した。その後、0.1% TritonX/PBS (和光純薬工業株式会社, Japan) に 2 分間浸し、浸透処理を行った。PBS で洗浄した後、非特異結合を防ぐためにブロッカー (大日本住友製薬, Japan) を添加し、室温で 30 分放置した。PBS で 2 回洗浄後、一次抗体として NF- $\kappa$ B p65 Rabbit mAb ( $1.0 \times 10^{-3}$ , cell signaling, USA) を添加し、4°C Overnight で反応させた。ネガティブコントロールには、一次抗体ではなく 10 倍希釈したブロッカーを添加した。翌日 PBS で洗浄後、二次抗体として cy3 conjugated affiniPure Goat anti-rabbit IgG ( $5.0 \times 10^{-2}$ , Jackson Immuno Research, USA) を添加し、室温遮光で 1 時間反応させた。ネガティブコントロ

ールには 10 倍希釈したブロックエースを添加した。PBS で 2 回洗浄後、DAPI 入り封入剤の FLUOROSHIELD with DAPI (Vector, USA) で核を染色し、NEO MICRO COVER GLASS, (松浪硝子工業, Japan) を用いて封入した。最後に共焦点レーザー顕微鏡 FV1000D (OLYMPUS, Japan) で蛍光発色を観察し、組織の写真を撮影した。

#### <統計解析>

数値化した測定結果は、平均値±標準誤差 (Mean±SEM) として示した。有意差検定には t 検定を使用した。P<0.05 で有意差ありとした。

## 2-3 結果

### *心臓線維芽細胞の分化マーカー発現確認*

Vi が心臓線維芽細胞を活性化させ、筋線維芽細胞に分化させるかどうかを確認する為、50nM の Vi を添加し、24、48 時間培養した NHCF-V から抽出した mRNA を用いて、 $\alpha$ -SMA の発現量を Real Time PCR で確認した。その結果、24 時間 Vi 刺激をした NHCF-V では Vi Buffer 添加群との間に有意な差は見られなかったが (Fig. 2-1a)、48 時間 Vi 刺激をした NHCF-V では Vi Buffer 添加群と比べて発現量が有意に増加していた (Fig. 2-1b)。また、Vi の  $\alpha$ -SMA 発現増加に TGF- $\beta$  が関与しているかを確認する為、TGF- $\beta$  の発現量も Real Time PCR で確認した。その結果、Vi 刺激時間に関わらず、Vi 添加群と Vi Buffer 添加群との間に発現量の差は見られなかった (Fig. 2-1a、b)。

### *心臓線維化関連遺伝子の発現確認*

Vi が心臓線維芽細胞における線維化関連遺伝子発現に影響を与えるか確認する為、50nM の Vi を添加し、24、48 時間培養した NHCF-V から抽出した mRNA を用いて、Col-I、Col-III、MMP-1、TIMP-1、TIMP-2 の発現量を Real Time PCR で確認した。その結果、Col-I 発現においては、Vi 刺激時間に関わらず、Vi 添加

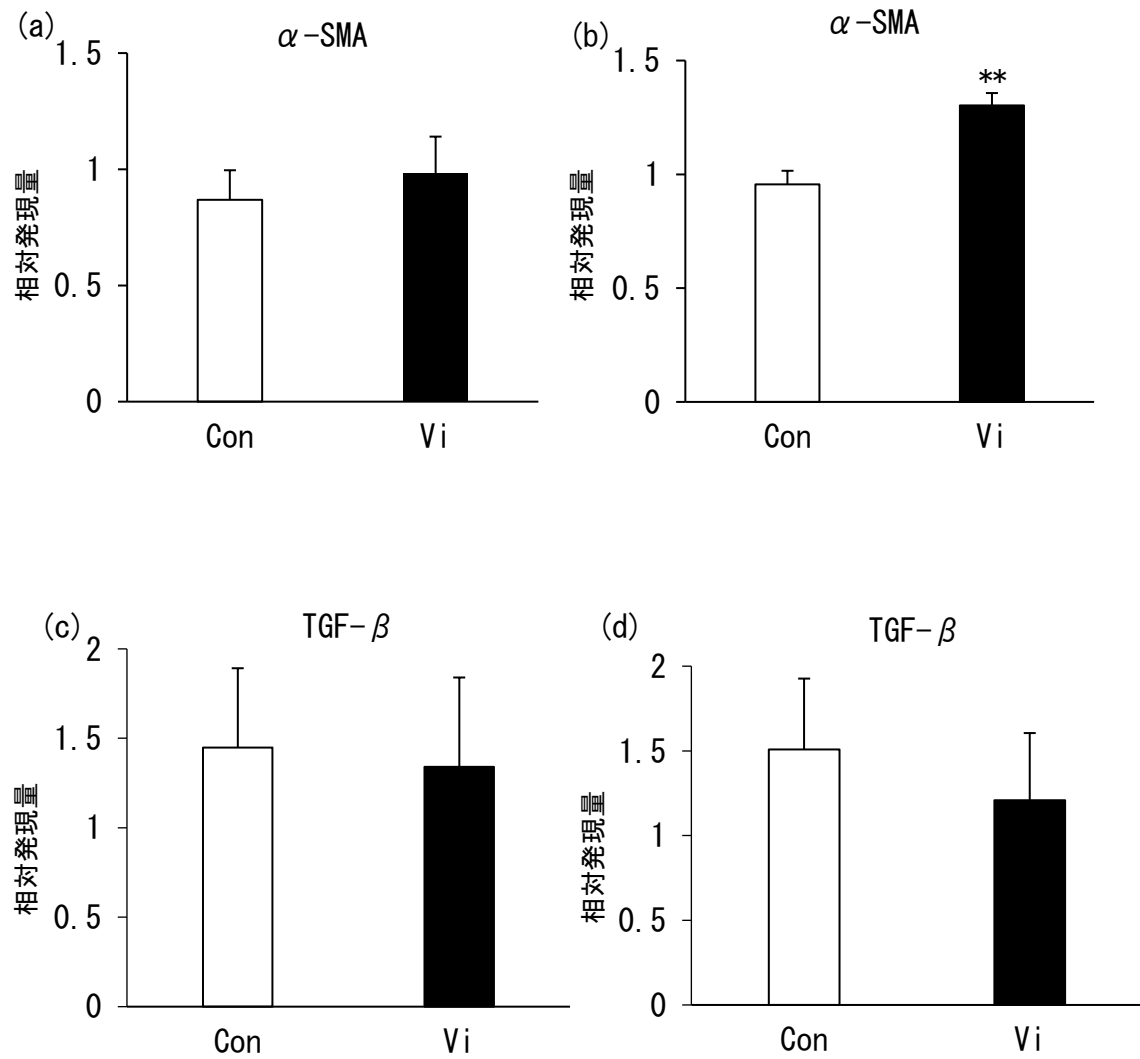


Fig. 2-1 線維芽細胞の分化マーカーに対する Vi の影響

50nM の Vi を添加し、24 時間 (a、c)、48 時間 (b、d) 培養した NHCF における  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$  発現量を Real Time PCR で確認した。(Mean  $\pm$  SEM, n=3, \*\*=p<0.01)

群と Vi Buffer 添加群との間に発現量の差は見られなかったが (Fig. 2-2a、b)、Col-III 発現においては、24 時間の Vi 刺激では Vi 添加群と Vi Buffer 添加群との間に発現量の差は見られなかったが (Fig. 2-2c)、48 時間の Vi 刺激では Vi Buffer 添加群と比べて Vi 添加群で発現量が有意に減少していた (Fig. 2-2d)。また、コラーゲン編成に関与するタンパク質である MMP-1、TIMP-1、TIMP-2 発現は刺激時間に関わらず、Vi 添加群と Vi Buffer 添加群との間に有意な差は見られなかった (Fig. 2-3)。

#### ***TGF- $\beta$ 非依存的な線維化関連遺伝子の発現確認***

TGF- $\beta$  非依存的な線維化機序を確認する為、50nM の Vi を添加し、24、48 時間培養した NHCF-V から抽出した mRNA を用いて、IL-6 発現量を Real Time PCR で確認した。その結果、24 時間刺激、48 時間刺激共に、Vi Buffer 添加群に比べて発現量が有意に上昇していた (Fig. 2-4)。また、過去の研究において Vi による IL-6 増加の際、NF- $\kappa$ B の活性化が確認されている。心臓線維芽細胞でも同様に Vi により IL-6 の発現が増加する際、NF- $\kappa$ B の活性化が起こっているかを免疫組織化学法を用いて確認した。50nM の Vi を添加し、60 分培養した NHCF を 4%PFA で固定し、NF- $\kappa$ B 抗体を用いて染色し、共焦点顕微鏡で観察し、撮影した。その結果、コントロールでは NF- $\kappa$ B が細胞質で発現しているのに対し、Vi 添加後の

NHCF では細胞質で発現している NF- $\kappa$ B だけではなく、NF- $\kappa$ B が核内で凝集していることが確認された (Fig. 2-5)。

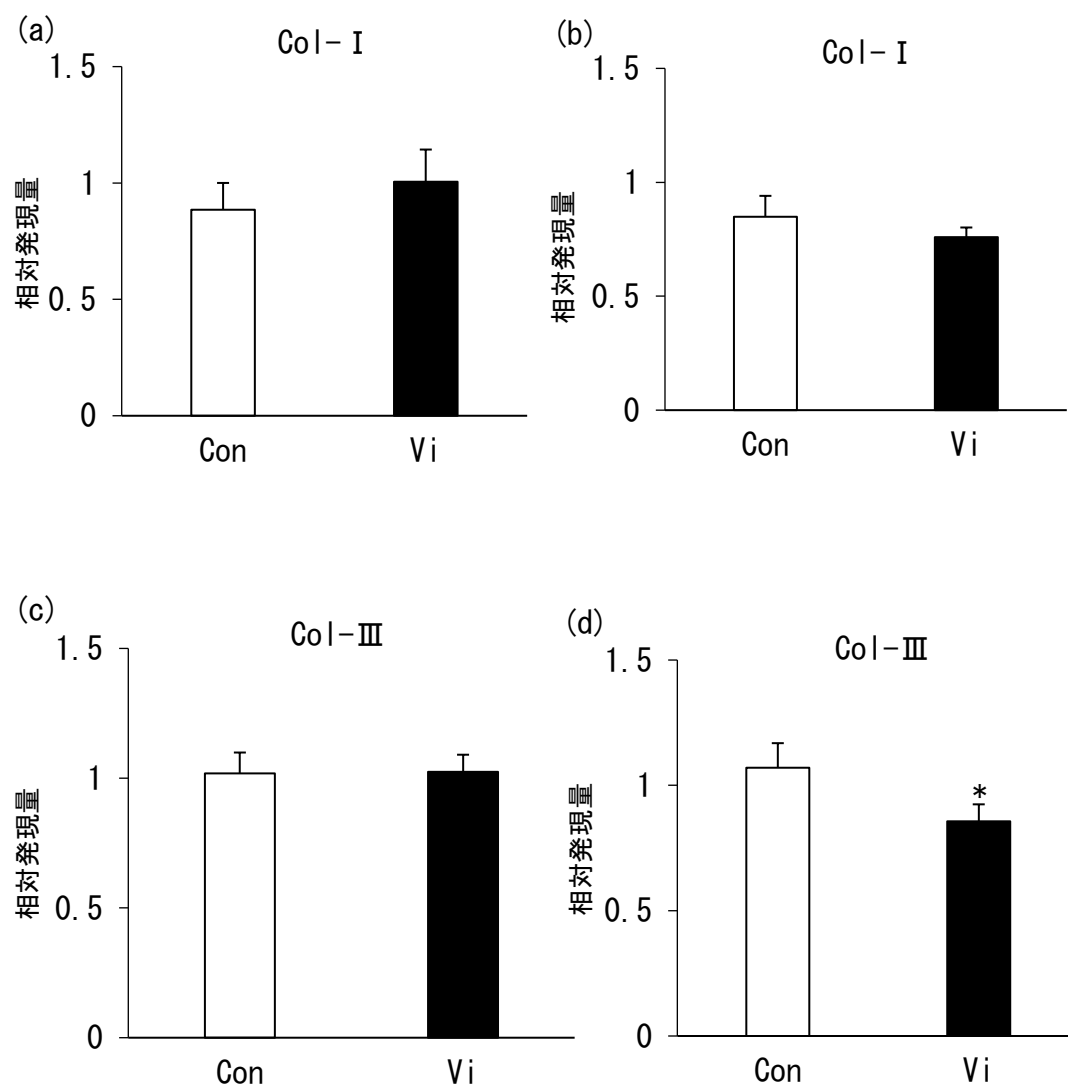


Fig. 2-2 コラーゲン産生遺伝子に対する影響

50nM の Vi を添加し、24 時間 (a、c)、48 時間 (b、d) 培養した NHCF における Col-I、Col-III を Real Time PCR で確認した。(Mean±SEM, n=3, \*p<0.05)

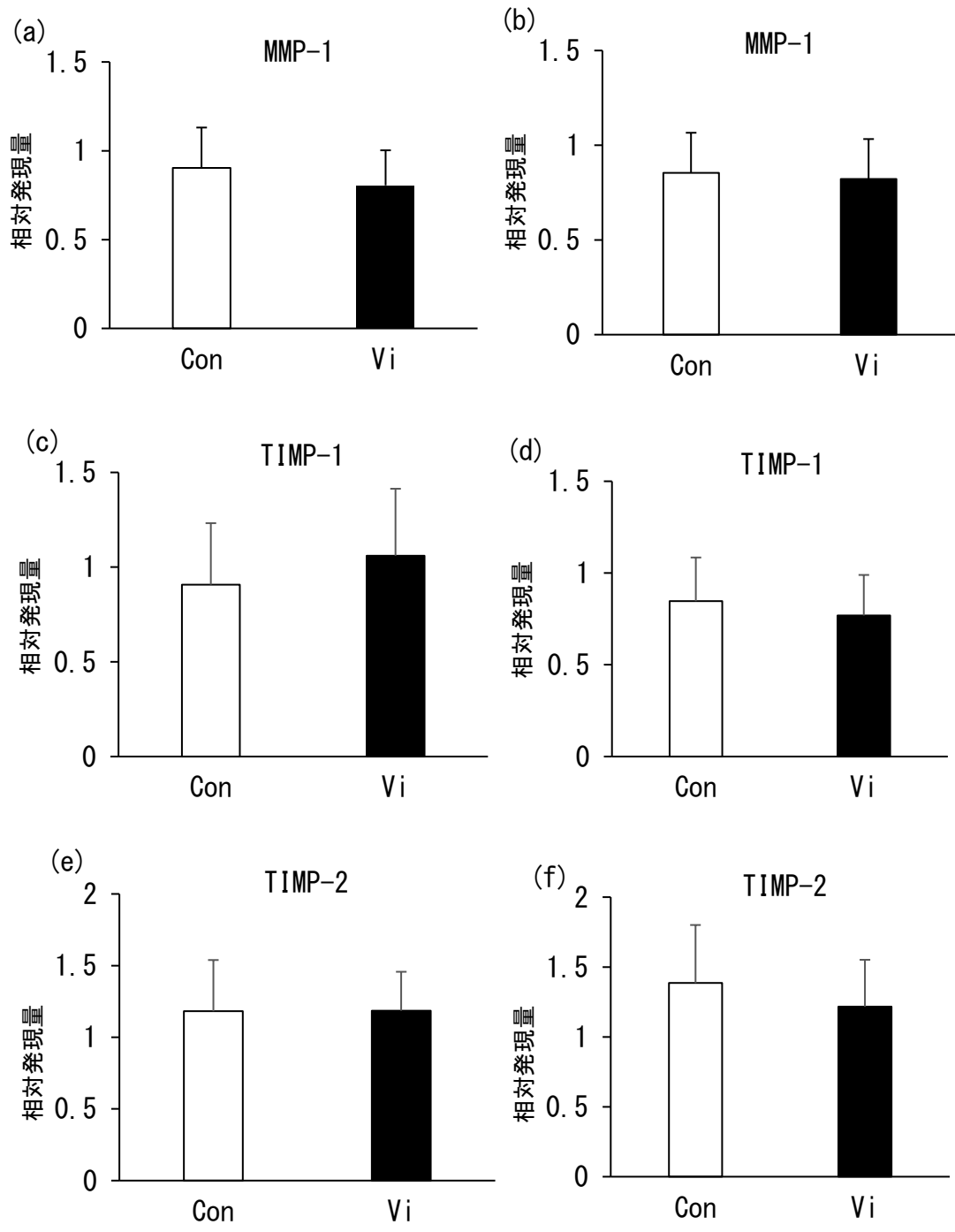


Fig. 2-3 Vi の線維化関連遺伝子に対する影響

50nM の Vi を添加し、24 時間(a、c、e)、48 時間(b、d、f)培養した NHCf における MMP-1、TIMP-1、TIMP-2 を Real Time PCR で確認した。

(Mean±SEM, n=3)



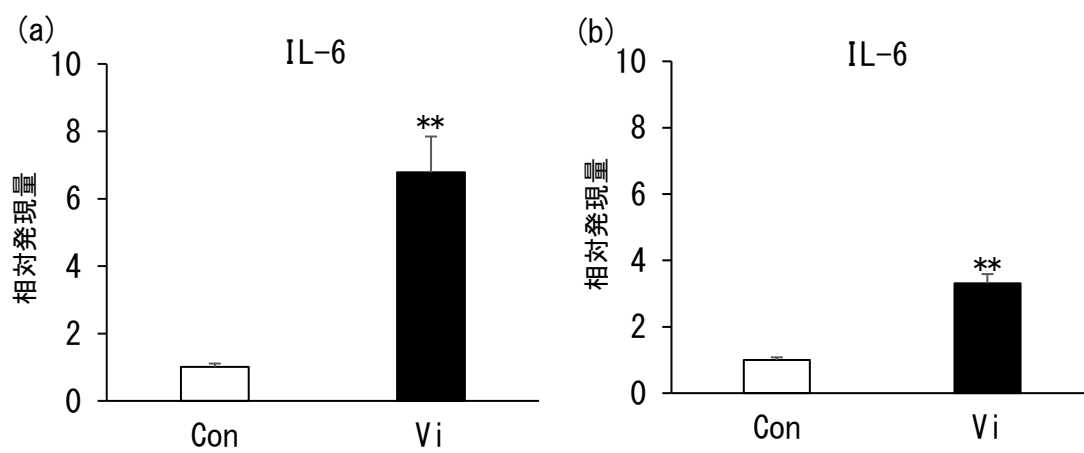


Fig. 2-4 Vi の IL-6 に対する影響

50nM の Vi を添加し、24 時間 (a)、48 時間 (b) 培養した NHCF における IL-6 を Real Time PCR で確認した。(Mean±SEM, n=3, \*\*=p<0.01)

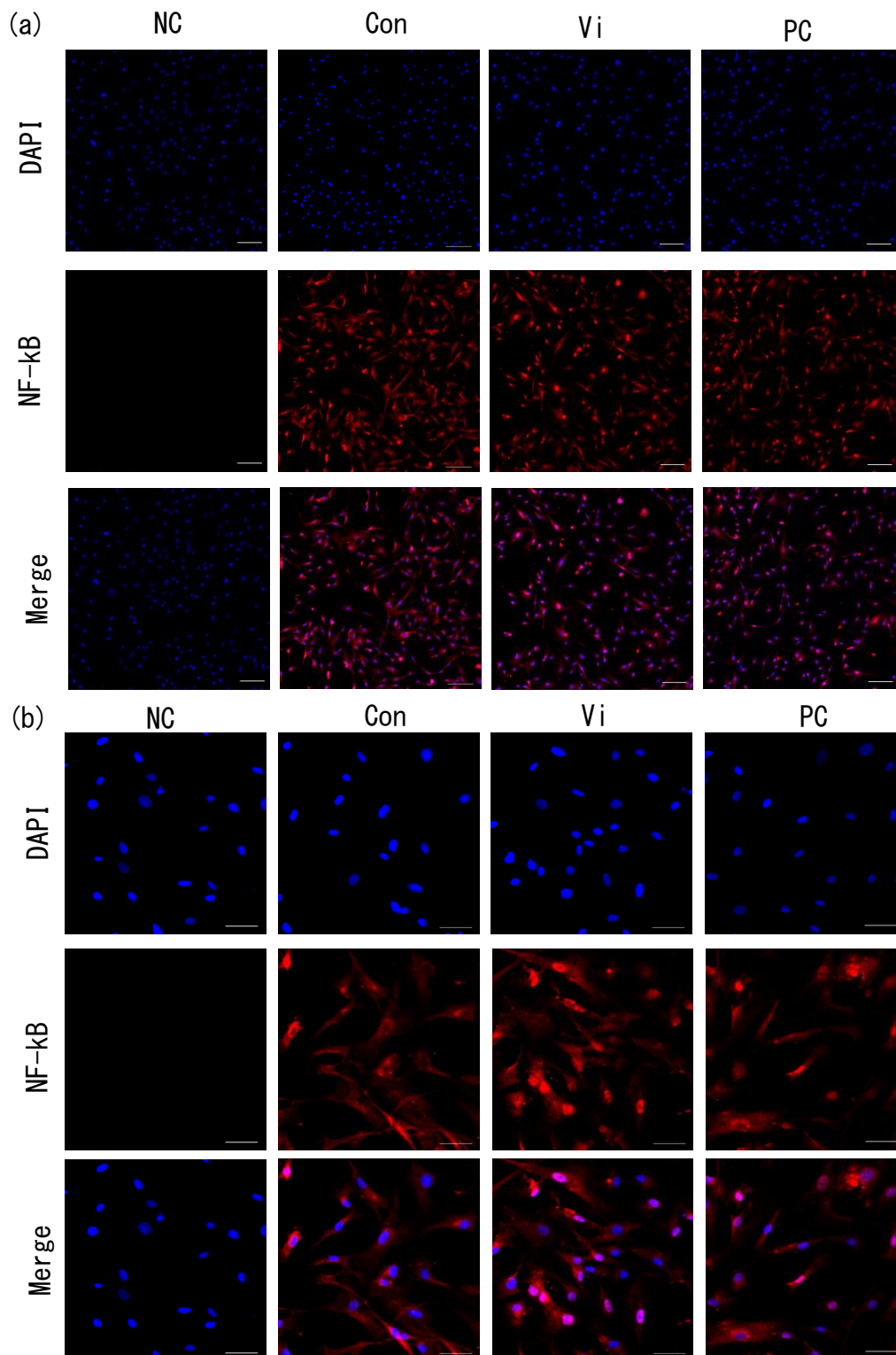


Fig. 2-5 Vi の NF-kB 活性化確認

50nM の Vi を添加し 60 分培養した NHCF における NF-kB 発現を免疫組織化学により確認した。(a) Bar=150µm (b) Bar=50µm

## 2-4 考察

本章では NHCF-V において Vi が TGF- $\beta$  非依存的に  $\alpha$ -SMA 発現を上昇させることを示した。線維芽細胞は分化することで活性型の筋線維芽細胞になる。この筋線維芽細胞では  $\alpha$ -SMA が高発現しており、この  $\alpha$ -SMA は筋線維芽細胞への分化マーカーとして用いられている。筋線維芽細胞は健常な人の心臓では見られず、線維化が起きている心臓で見られることが報告されている。線維芽細胞の分化、線維化を引き起こす主な原因として TGF- $\beta$  が知られている。しかし、近年では TGF- $\beta$  を介さない線維化が報告されている。プロスタグランジン F $2\alpha$  はプロスタグランジン F 受容体を介して、Rho/Rock 経路を活性化させることで TGF- $\beta$  非依存的に線維化を誘導する (Oga et al. 2009)。IL-13 も TGF- $\beta$  非依存的に線維化を誘導することが報告されているが、詳細なシグナル経路は明らかになっていない (Kaviratne et al. 2004)。加えて、Integrin-Linked kinase を介した線維化も報告されている (Li et al. 2009)。Integrin-Linked kinase とは細胞内セリン/スレオニンタンパク質キナーゼであり、下流シグナル因子のリン酸化によりシグナル伝達を制御している。インテグリン  $\beta 1$  サブユニット結合分子として同定されており、細胞接着、生存、分裂、細胞外マトリクスの蓄積に関与している。本論文では第一章で Vi とインテグリン  $\beta 1$  鎖、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  が結

合することを示している。このことから Vi がインテグリンに結合し、Integrin-Linked Kinase を介して TGF- $\beta$  非依存的に  $\alpha$ -SMA の発現を増加させている可能性が考えられる。

また、本研究では Vi により NHCF-V における IL-6 発現の増加及び NF- $\kappa$ B の活性化を引き起こすことを示した。IL-6 は心臓では血管内皮細胞や線維芽細胞で産生、分泌されるサイトカインの一種であり、ラット心臓線維芽細胞においてコラーゲン量の増加や、筋線維芽細胞への分化に関与することが報告されている (Melendez et al. 2010)。また、この IL-6 発現には転写因子である NF- $\kappa$ B の活性化が関与していることが知られている。IL-6 は可溶性 IL-6 受容体 (soluble interleukin-6 receptor: sIL-6R) と結合し、JAK/STAT 経路を介して細胞内でシグナル伝達が起きる (Rose-John and Neurath 2004)。IL-6 のみを添加したラット心臓線維芽細胞ではコラーゲン量は増加しないが、IL-6 と sIL-6R を添加したラット心臓線維芽細胞ではコラーゲン量が増加し、線維芽細胞が筋線維芽細胞へ分化することが報告されている (Rose-John and Neurath 2004)。このことから IL-6 が sIL-6R と結合することで線維化が引き起こされると考えられる。本研究では Vi により IL-6 の発現量が増加したことのみに示しており、Vi によって心臓線維芽細胞及び周辺細胞において sIL-6R 発現が増加するかを調べることで  $\alpha$ -SMA の発現増加機序の解明に繋がると考えられる。本研究では Vi の添加に

より心臓線維芽細胞における NF- $\kappa$ B の活性化を確認している。このことから、Vi が心臓線維芽細胞の NF- $\kappa$ B を活性化し、IL-6 発現を増加させていると考えられる。また、IL-6 の発現量は腫瘍壊死因子  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : TNF- $\alpha$ ) の濃度依存的に調節されていることが報告されている (Brasier 2010)。心臓線維芽細胞の細胞表面には TNF- $\alpha$  受容体 (TNFR1) が存在しており、TNF- $\alpha$  がこの受容体に結合することで、p38 MAPK、Akt、NF- $\kappa$ B などが活性化し、IL-6 が発現する (Saha et al. 2007)。過去の研究において Vi を添加した血管内皮細胞で TNF- $\alpha$  の発現量が増加することが報告されている (Nakajima et al. 2017)。このことから心臓において心臓線維芽細胞の IL-6 発現は血管内皮細胞由来の TNF- $\alpha$  によっても制御されている可能性が考えられる (Fig. F)。

さらに本章では、心臓線維芽細胞におけるコラーゲン性の組織再構築に関わる MMP、TIMP の阻害因子である TIMP、コラーゲン発現に関わる Col-I、Col-III 発現に対する Vi の影響を確認した。心臓線維芽細胞において Vi は MMP、TIMP、Col-I 発現に影響を与えないことを示した。しかし、Col-III の発現量を抑制する傾向が見られた。Col-I や Col-III は細胞外マトリクスの主要構成成分であり、線維化の際に発現量が増加すると仮説を立てていたが、仮説とは異なる結果が得られた。Volk らは (Volk et al. 2011, Volk et al. 2009)、Col-III 遺伝子をノックダウンしたマウスから採取した皮膚線維芽細胞は、ワイルドタイプマウ

スから採取した皮膚線維芽細胞と比較して、収縮能が高く、 $\alpha$ -SMA の発現が促進することを報告している。このことから Vi により Col-III 遺伝子が抑制されることで、 $\alpha$ -SMA の発現量が増加した可能性も考えられる。

Col-I は心筋梗塞後の線維化部位の主要構成成分であることが報告されており、Col-I の発現増加は  $\alpha$ -SMA 発現増加、つまり筋線維芽細胞への分化によるものであると考えられる (Cucoranu et al. 2005, Pan et al. 2013)。しかし、本研究においては  $\alpha$ -SMA の発現量増加は見られたものの Col-I 発現量の増加は見られなかった。本研究では Vi によって  $\alpha$ -SMA の発現量が 1.36 倍に増加したが、TGF- $\beta$  を添加した際の  $\alpha$ -SMA 発現量はより多く増加することが報告されている (Cucoranu et al. 2005)。このことから Vi が Col-I 発現量に影響を与えなかったのは Vi による線維芽細胞の分化が不十分であったことが原因であると考えられる。本研究では NHCF-V に Vi 刺激をする際、血清 10% を含む通常培地を使用した。細胞への刺激を通りやすくするため、刺激前と刺激の際、血清 0.2% を含む低血清培地を使用し、 $\alpha$ -SMA の発現量変化を確認する必要がある。

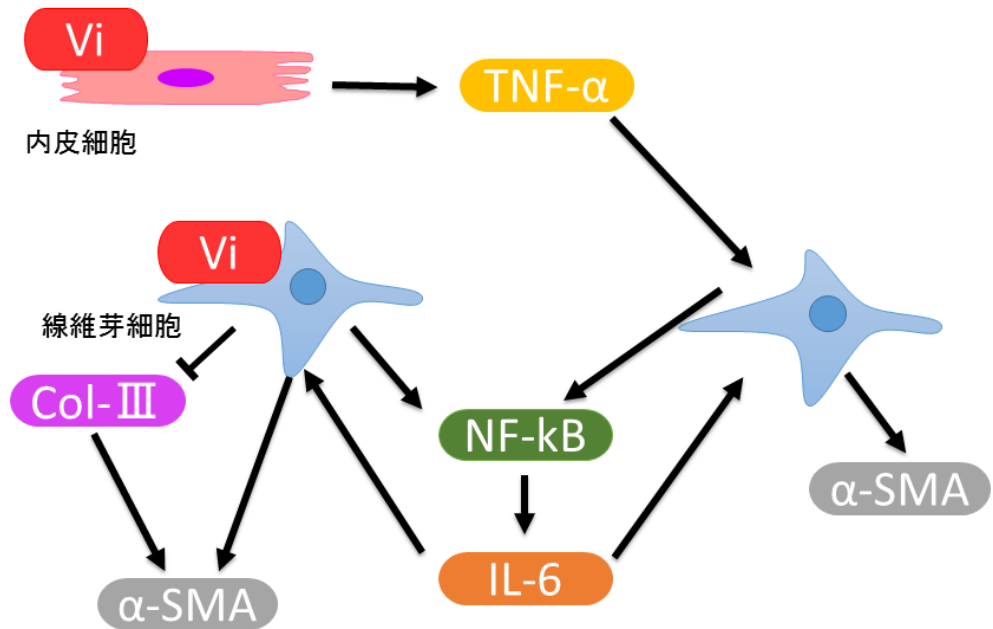


Fig. F Vi による線維芽細胞の活性化機序の仮説

線維芽細胞で IL-6 発現が増加し、傍分泌、自己分泌により活性化する。内皮細胞で発現が増加する TNF- $\alpha$  により IL-6 の発現が促進される。また、Col-III の発現抑制により活性化が起こる。

## 第三章 リン酸化プロラクチンの産生機序解明

### 3-1 緒言

PRL は分子量約 23kDa のペプチドホルモンで下垂体にあるラクトロフから主に合成、分泌される。主な作用は乳汁の合成、乳腺の発達、妊娠の維持等が知られているが、その他に 300 を超える機能を持つことが報告されている (Bole-Feysot et al. 1998, Freeman et al. 2000)。この機能の多様性は翻訳前後に修飾を受け構造が変化した異型 PRL によるものであると考えられている。リン酸化 PRL (Phosphorylated Prolactin: PPRL) もその異型 PRL の一種である。リン酸化 PRL は PRL がある種の酵素でリン酸化されることで生成する (Aramburo et al. 1992, Oetting et al. 1986)。PRL のリン酸化部位は種特異性があり、ラットでは 177 番目のセリン、ヒトでは 179 番目のセリンがリン酸化部位として報告されている (Wang and Walker 1993)。また、ラット PRL の 58 番目、63 番目のスレオニン、ウシ PRL の 179 番目、180 番目のセリンがリン酸化されることも報告されている (Kim and Brooks 1993, Wang et al. 1996)。さらに、エストロゲンを投与したマウス PRL では 133 番目のセリン、58 番目、63 番目のスレオニンがリン酸化され、セリンリン酸化 PRL (PPRLS) とセリン/スレオニンリン酸化



PRL (PPRLT) が産生することも報告されている (Horiguchi et al. 2007a)。エストロゲンを投与したマウスでは下垂体中だけではなく血清中からもリン酸化 PRL が検出されており、エストロゲンはリン酸化 PRL の合成だけでなく分泌も制御する可能性も報告されている (Horiguchi et al. 2007b)。未修飾の PRL と PPRLT の等電点はそれぞれ 5.93、5.67 である。また、PRL のリン酸化は性周期、妊娠の間に生理的に調整されている (Ho et al. 1993)。PPRL の作用は多岐にわたり、細胞増殖抑制、抗血管新生作用、細胞の分化誘導作用などが報告されている (Chen et al. 1998, Guzman et al. 2008, Ueda et al. 2006, Walker 2007, Xie et al. 2010, Xu et al. 2003)。前立腺癌細胞のアポトーシスを誘導する作用も報告されている (Du and Wu 2012)。それ故に、PPRL は生理状態、病理状態共に重要な役割を担っていると考えられる。

PRL のリン酸化は PAK2 を含む分泌顆粒中で起こることが報告されている (Greenan et al. 1989, Wicks and Brooks 1999)。PAK2 はセリン/スレオニンリン酸化キナーゼであり、Rho タンパク質のエフェクターとして知られている。PAK2 は活性型を持ち、その活性は autoinhibitory domain (AID) とよばれる配列により制御されている。PAK2 は不活性状態では二量体を形成しており、AID が互いの自己リン酸化を阻害し、それにより PAK2 のもつキナーゼ活性を抑制している。PAK2 に存在する GTPase 結合ドメインに Rho ファミリー低分子量 G タンパ

ク質が結合すると、二量体化が阻害され単量体になる。単量体になると自己リン酸化が起こり、リン酸化 PAK2 (pPAK2) として知られる活性型の PAK2 となる (Jung and Traugh 2005)。この PAK2 の活性化に関与している分子として Ras-related C3 botulinum toxin substrate (Rac1) や Cell division cycle protein42 (cdc42) が知られている。

Rac1 及び Cdc42 は Rho ファミリー低分子量 G タンパク質に属する分子量約 21kDa の GTP 結合型タンパク質である。広く知られる三量体 G タンパク質と同様、グアニンヌクレオチド三リン酸 (GTP) 結合型が活性状態を示し、グアニンヌクレオチド二リン酸 (GDP) が不活性状態を示すが、サブユニット構造を持たずに単量体として存在する (Rojas et al. 2012)。これら 2 つの活性は Rho guanine nucleotide exchange factor (Rho GEF) と Rho GTPase-activating protein (Rho GAP) により調節されている。GDP 結合型に Rho GEF が作用することによって GTP 結合型となる GDP-GTP 交換反応が引き起こされ、活性型となる (Garcia-Mata and Burridge 2007)。Rho GAP は G タンパク質の持つ GTPase 活性の促進、GTP の加水分解反応を促進することで不活性化状態へ導いている (Tcherkezian and Lamarche-Vane 2007)。

堀口らの研究において卵巣除去雌マウスに E2 投与をしたマウス下垂体中でリン酸化 PRL の増加が確認されている (Horiguchi et al. 2007a)。また、現在ま

でリン酸化酵素の候補として PAK2 や PKA などが挙げられているが、E2 との関係性が明らかになっていない。これらのことから、本章では E2 投与卵巢除去雌マウス下垂体及び E2 投与雌マウス下垂体初代培養細胞を用いて、E2 と PRL リン酸化酵素の関係性を解明することを目的とした。

## 3-2 材料と方法

### <実験動物>

実験動物は当研究室で飼育・繁殖している ICR マウスを使用した。暗期、明期を 12 時間周期、一定温度 ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) で管理されている動物室で、自由給水、自由給餌にて飼育した。70~90 日齢の雌マウスを雄マウスと交配させ、繁殖した。出産した日を 0 日齢とし、実験には 8~9 週齢の雌マウスを使用した。8~9 週齢のマウスは小動物用麻酔器 (Muromachi, Japan) で気化したイソフルラン (麻酔導入 3%、麻酔維持 2%) により麻酔をした。性周期によるエストロゲンの影響を排除するため、麻酔下で卵巣除去処理 (Ovariectomized: OVX) をし、7 日経過した雌マウスに 10mg の  $17-\beta$  エストラジオール (E2, Tokyo Chemical Industry, Japan) を含む 2cm のサイラスティックチューブ (Kaneka, Japan) を頸部皮下に移植、7 日間飼育した。コントロールマウスでは E2 を含まないサイラスティックチューブを頸部皮下に移植した。これらのマウスは解剖前に体重を測定し、下垂体採取後に子宮を採取し、重量を測定した。

### <組織切片の作成>

イソフルラン麻酔下のマウスを開胸し、10ml の PBS を心臓の左心室から灌流

することで全脱血を行い、その後 10ml の 4% PFA (PFA 40g, PBS up to 1,000ml) を同様に心臓の左心室から灌流し、灌流固定を行った。灌流固定後のマウスから下垂体を採取し、4% PFA で 2 時間浸漬固定を行った。浸漬固定後、70%のエタノールで洗浄した下垂体は、自動包埋機 (Sakura Finetek Japan, Japan) により脱水、キシレン透徹、パラフィン浸潤を行った。70%、80%、90%エタノールに 1 時間、100%エタノールに 2 時間 (1 時間×2 回) 浸け、脱水を行った。その後、キシレンに 3 時間 (1 時間×3 回) 浸して、キシレン透徹を行った。その後、恒温槽で溶解したパラフィン溶解液に 3 時間 (1 時間×3 回) 浸し、パラフィン浸潤を行った。その後、パラフィンに包埋し、4°C で保存した。パラフィン包埋した下垂体はマイクロトーム (Carl Zeiss, Germany) で 6 $\mu$ m に薄切した後、約 50°C のお湯で伸展し、スライドガラス (MATSUNAMI, Japan) に組織を貼り付け、50°C のインキュベーターで一晩乾燥させた。

### <免疫組織化学>

薄切した組織切片をキシレンに 15 分 (5 分×3 回) 浸け、脱パラフィンを行った。その後、100%エタノールに 5 分、90%、80%、70%エタノールに 1 分ずつ浸け、親水処理を行い、milliQ で洗浄した。その後、イムノセーバー ( $2.0 \times 10^{-2}$  in milliQ) に浸し、115°C で 5 分間オートクレーブ処理をし、抗原の賦活化を行っ

た。milliQ で洗浄後、PBS で 3 分間×3 回洗浄を行った。その後、0.1% TritonX in PBS に 15 分間浸し、浸透化を行った。PBS で 3 分間×3 回洗浄を行い、抗体の非特異的結合を防ぐため、組織上にブロッケーヌス (Japan) を滴下し、室温で 1 時間ブロッキング処理を行った。PBS で 3 分間×3 回洗浄を行った後、10 倍希釈したブロッケーヌスで希釈した PRL モノクローナル抗体 ( $5.0 \times 10^{-3}$ , Abcam, USA) を滴下し、4°C で一晩反応させた。翌日、PBS で 3 分間×3 回洗浄を行った後、10 倍希釈したブロッケーヌスで希釈した cy3 conjugated anti rabbit secondary antibody ( $5.0 \times 10^{-2}$ , Vector laboratories) を滴下し、室温で 1 時間反応させた。反応後、PBS で 3 分間×3 回洗浄を行い、10% ウサギ血清を滴下し、抗体のブロッキングを行った。ブロッキング後、PBS で 3 分間×3 回洗浄を行い、10 倍希釈したブロッケーヌスで希釈した alexafluor 647 conjugated PAK2 antibody ( $2.5 \times 10^{-2}$ , abcam) を滴下し、1 時間室温で反応させた。PBS で 3 分間×3 回洗浄後、DAPI を含む封入剤 (FLUOROSHIELD with DAPI, Vector laboratories, USA) 滴下し、カバーガラス (MATSUNAMI, Japan) を用いて封入した。FLUOVIEW FV-1000 (Olympus, Japan) で蛍光を観察し、画像を取得した。200 倍の倍率で無作為に 10 ヶ所画像を取得し、それぞれの PRL、PAK2、DAPI 陽性細胞数を Image J (NIH, USA) を用いて数値化した。

### <Total RNA 抽出>

total RNA 抽出には RNeasy Mini Kit (Qiagen, Netherlands) を使用し、Kit のプロトコルに則り行った。下垂体を抽出バッファーに加え、超音波破碎機で破碎後、同量の 70%エタノールを添加しよく混合した。RNeasy スピンカラムに全量添加し、遠心することでカラムに RNA を吸着させた。その後、RNeasy スピンカラムに洗浄 Buffer を添加し、遠心することでカラムを洗浄した。吸着させた RNA は RNase free water で溶出した。RNA 溶液の濃度は Bio spectrometer (Eppendorf, Germany) により 260nm の波長の吸光度を測定することで算出した。

### <逆転写>

cDNA 作製は QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Netherlands) を使用し、Kit のプロトコルに則って行った。450-500ng の RNA を含む溶液にゲノム DNA 除去 Buffer を添加し、42°C、2 分間熱処理することで、ゲノム DNA の除去を行った。その後、Quantiscript Reverse Transcriptase、RT Primer Mix、Quantiscript RT Buffer を添加し、42°C、30 分間熱処理することで cDNA を作成した。最後に、95°C、3 分間熱処理することで、Quantiscript Reverse Transcriptase を不活化した。

### <Real Time PCR>

Real Time PCRはSYBR Select Master Mix(Applied Biosystems, USA)を使用し、Kitに則って行った。cDNA、DNase free water、プライマー、SYBR Select Master Mixを混合してReal Time PCRを行った。No Template ControlとしてcDNAの代わりにDNase free waterを混合した。測定機器はApplied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR System(Applied Biosystems, USA)を使用し、トリPLICATEで測定した。内在性コントロールとしてGAPDHを使用した。

### <SDS-PAGE>

下垂体から抽出したタンパク質を各ウェルにそれぞれ15 $\mu$ g添加し、250V、20mA、80分で泳動した。PAK2の検出には12.5% Polyacrylamide Gelを使用した。なお、泳動バッファーにはTris-Glycine Buffer (Tris 3.0g, Glycine 14.4g, 10% SDS 10.0ml, milliQ to 1,000ml)を用いた。

### <Western blotting>

SDS-PAGE後、Polyacrylamide Gelはセミドライ式転写装置 (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad, USA)を用いて、PVDFメンブレン (pore size 0.45 $\mu$ m, Merck Millipore, Germany)にタンパク質を転写した。転写条件は2mA/cm<sup>2</sup>、10V、



45分で行った。転写バッファーには、Tris-Glycine Buffer (Tris 3.0g, Glycine 14.4g, Methanol 200ml, milliQ to 1,000ml, pH 8.3) を用いた。転写後、メンブレンは Tween 20 を含むトリス緩衝生理食塩水 (Tris Buffered Saline with Tween 20: T-TBS) で室温で 15 分間振盪しながら洗浄し、EzBlock Chemi (ATTO, JAPAN) を用いて室温で 30 分間振盪しながらブロッキングを行った。ブロッキング後、T-TBS で室温で各 5 分、3 回振盪しながら洗浄した。その後、PAK2 抗体 ( $2.5 \times 10^{-2}$ , cell Signaling Technology, USA)、pPAK2 抗体 ( $2.5 \times 10^{-2}$ , Sigma Aldrich, USA) を  $4^{\circ}\text{C}$  で一晩振盪させながら反応させた。翌日、T-TBS で室温で各 5 分、3 回振盪させながら洗浄した。その後、peroxidase-labeled anti-rabbit IgG antibody ( $1.0 \times 10^{-4}$ , Vector laboratories) を室温で 30 分間振盪させながら反応させた。反応後、T-TBS で室温で各 5 分、3 回振盪しながら洗浄した。その後、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore, Germany) をメンブレン  $1\text{cm}^2$  あたり 0.1ml の割合でメンブレンに注ぎ、遮光下で室温 5 分間反応させた。反応後のメンブレンは、LAS-4000 (GE healthcare, USA) を用いて検出を行った。一次抗体、二次抗体ともに、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution (TOYOBO, Japan) を用いて希釈を行った。また、分子量マーカーの検出には Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate (Bio-Rad, USA) を使用した。検出されたバンドは Image J を用いて

数値化し、GAPDH の値で補正した。

### <下垂体初代培養>

8-9 週齢のマウスをイソフルラン麻酔下で OVX 処置をし、7 日間飼育した。7 日経過したマウスをイソフルラン麻酔下で開胸し、5ml の PBS を左心室から灌流することで脱血を行った。脱血後、下垂体を採取し、氷冷 PBS で洗浄した。洗浄後、顕微鏡下で下垂体後葉を除去した。その後、下垂体前葉を solution 1 (1%トリプシン、0.2%コラゲナーゼ in Hanks' balanced Salt Solution, HBSS) に浸し、37°C のウォーターバス中で 15 分振盪させた。振盪後、2,000g で 5 分間遠心し、上清をアスピレーターで除去した。その後、solution 2 (1%トリプシン、0.2%コラゲナーゼ、0.5µg/ml DNase in HBSS) を加え、37°C のウォーターバス中で 5 分振盪させた。振盪後、2,000g で 5 分間遠心し、上清をアスピレーターで除去した。その後、solution 3 (5mM EDTA in HBSS) を加え、37°C のウォーターバス中で 5 分振盪させた。振盪後、2,000g で 5 分間遠心し、上清をアスピレーターで除去した。その後、沈澱した細胞を HBSS で懸濁し、細胞懸濁液をセルストレーナー (corning, USA) で濾過した。濾過した細胞懸濁液の一部を取り、血球計算版で細胞数を計測した。初代下垂体前葉細胞は 8 ウェルチャンバーに  $1.0 \times 10^5$  cells/well の密度で播種し、一晚培養し、接着させた。培地には

10%FBS (Corning)、PenStrep (Sigma Aldrich) を含む Medium199 (Thermo Fisher Scientific) を使用した。細胞接着後、アスピレーターで培地を除去し、100nM の siPAK2 (SI01368647, Qiagen)、siControl (AllStars negative Control siRNA, Qiagen) 及び INTERFERin (Polyplus transfection, France) を含む培地を加え、一晩培養した。その後、終濃度が  $1.0 \times 10^{-8} \text{M}$  になるよう E2 を細胞に添加し、48 時間培養した。Total RNA の抽出は RNeasy mini kit、逆転写による cDNA の作製は QuantiTect Reverse Transcription kit を用いて、kit のプロトコルに則って行った。

### <免疫細胞化学>

E2 処理した下垂体前葉細胞は E2 含有培地をアスピレーターで除去し、PBS で洗浄後、4%PFA を加え、室温で 15 分静置し、固定した。PBS で洗浄後、0.5%TritonX in PBS を加え、室温で 3 分間浸透化を行った。その後、PBS で洗浄し、ブロックエースを加え、室温で 30 分ブロッキング処理を行った。ブロッキング後、PBS で洗浄し、10 倍希釈したブロックエースで希釈した PRL モノクローナル抗体 ( $5.0 \times 10^{-3}$ , Abcam) を滴下し、4°C で一晩反応させた。反応後、PBS で洗浄し、10 倍希釈したブロックエースで希釈した anti-rabbit cy3 secondary antibody ( $5.0 \times 10^{-2}$ ) を滴下し、室温で 1 時間反応させた。反応後、PBS で洗浄し、10%ウサギ

血清を滴下し、室温で1時間反応させた。反応後、PBSで洗浄し、10倍希釈したブロックエースで希釈した alexafluor 647 conjugated PAK2 antibody ( $2.5 \times 10^{-2}$ ) を滴下し、室温で1時間反応させた。PBSで洗浄後、DAPIを含む封入剤 (FLUOROSHIELD with DAPI, Vector laboratories, USA) を滴下し、カバーガラス (MATSUNAMI) を用いて封入した。FLUOVIEW FV-1000 (Olympus) で蛍光を観察し、画像を取得した。

#### <二次元電気泳動>

E2 処理した下垂体前葉細胞から E2 含有培地をアスピレーターで除去し、HBSS で洗浄した。HBSS を除去後、9.8M Urea Sample Buffer (9.8M Urea, 4% CHAPS, 2% IPG Buffer, 40mM DTT, milliQ) を 100 $\mu$ l 加え、細胞を溶解した。細胞溶解液と等量の膨潤バッファー (8M Urea, 2% CHAPS, 2% IPG Buffer, 2.8mg/ml DTT, 0.002% BPB, milliQ) を加え、膨潤用トレイに滴下した。滴下したサンプル上に IPG Dry Strip (pH3-10, GE HealthCare, USA) を載せ、乾燥を防ぐためシリコンオイルを滴下し、12時間静置することでゲルの膨潤及びサンプルの浸潤を行った。膨潤したゲルを二次元電気泳動槽にセットし、電極をゲル両端にセットし、1次元目の電気泳動を行った。泳動条件は最大電力 3,500V で 56,000Vh になるように泳動を行った (500V 2時間、1,000V 1時間、2,000V 1時間、3,000V 1時

間、3,500V 14時間)。電気泳動後の IPG Dry Strip は SDS 平衡化バッファー I (6M Urea, 75mM Tris-HCl, 29.3% Glycerol, 2% SDS, 10mg/ml DTT, 0.002% BPB, milliQ) に浸し、15分振盪した。その後、SDS 平衡化バッファー II (6M Urea, 75mM Tris-HCl, 29.3% Glycerol, 2% SDS, 25mg/ml iodoacetamide, 0.002% BPB, milliQ) に浸し、15分振盪し、平衡化させた。平衡化したゲルを 12.5%のポリアクリルアミドゲルにセットし、定電流 40mA で 5時間泳動した。その後、PRL ポリクローナル抗体を用いた Western Blotting を行った。

#### <統計解析>

各群の数値は平均値±標準誤差 (Mean±SEM) で示した。グループ数が 3 以上のときは Tukey-Kramer test、グループ数が 2 のときは T-test を用いて統計解析を行った。有意水準 5%で有意差ありとした。

### 3-3 結果

#### *PRL とリン酸化酵素の局在確認*

本実験では E2 による PRL のリン酸化機序を解明するため、マウスに E2 を投与した。その E2 投与が正確に行われているかを確認する為、8~9 週齢のマウスに OVX 処置をした後、E2 を投与し、7 日間飼育した。その際の E2 投与マウス下垂体の大きさを確認し、子宮重量を測定した。その結果、E2 処理したマウスではコントロールマウスに比べ、下垂体の肥大が確認された (Fig. 3-1a)。また、E2 処理したマウスの子宮重量はコントロールマウスに比べ有意に増加していた (Fig. 3-1a、b)。また、E2 投与マウス下垂体における PRL 陽性細胞率を免疫組織化学法を用いて確認した。PRL 陽性細胞率は全細胞数 (DAPI 陽性細胞) に対する PRL 陽性細胞数の割合で示した。陽性細胞率 E2 処理したマウスではコントロールマウスに比べ PRL 陽性細胞率が有意に増加していた (Fig. 3-2c)。

PRL と PAK2 及び PKA の下垂体内局在を確認する為、E2 を投与し 7 日間経過したマウスから下垂体を採取し、免疫組織化学法を用いて組織学的に検証した。その結果、PRL と PAK2 は共局在していることが確認されたが (Fig. 3-2b)、PRL と PKA は共局在しないことが確認された (Fig. 3-2a)。また、E2 投与によりその局在に変化があるかを確認したところ、E2 投与による局在の変化は見られなかった

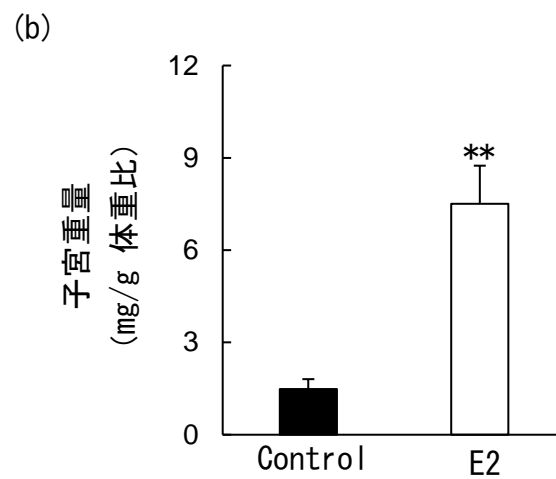
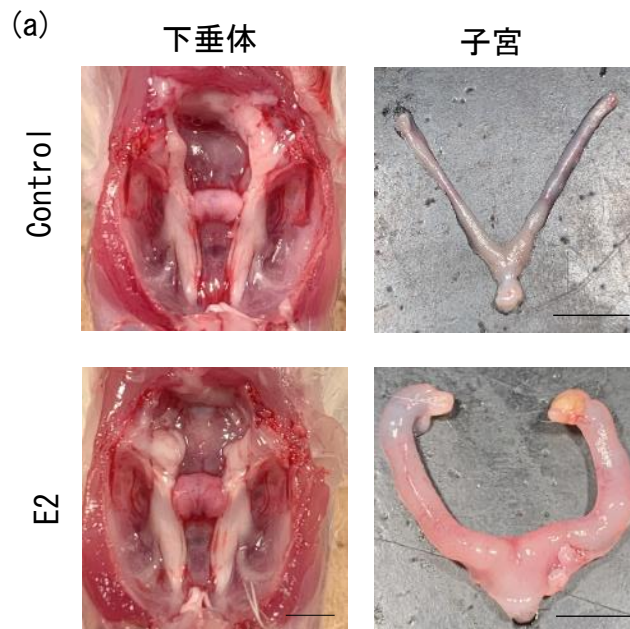


Fig. 3-1 E2 投与による下垂体、子宮重量の変化

(a)OVX 処置後 7 日経過した雌マウスに E2 を投与し、7 日後の下垂体の形態を確認した。(b)同様に子宮重量を測定し、体重比をグラフ化した。(Mean±SEM, n=3, \*\*=p<0.01)

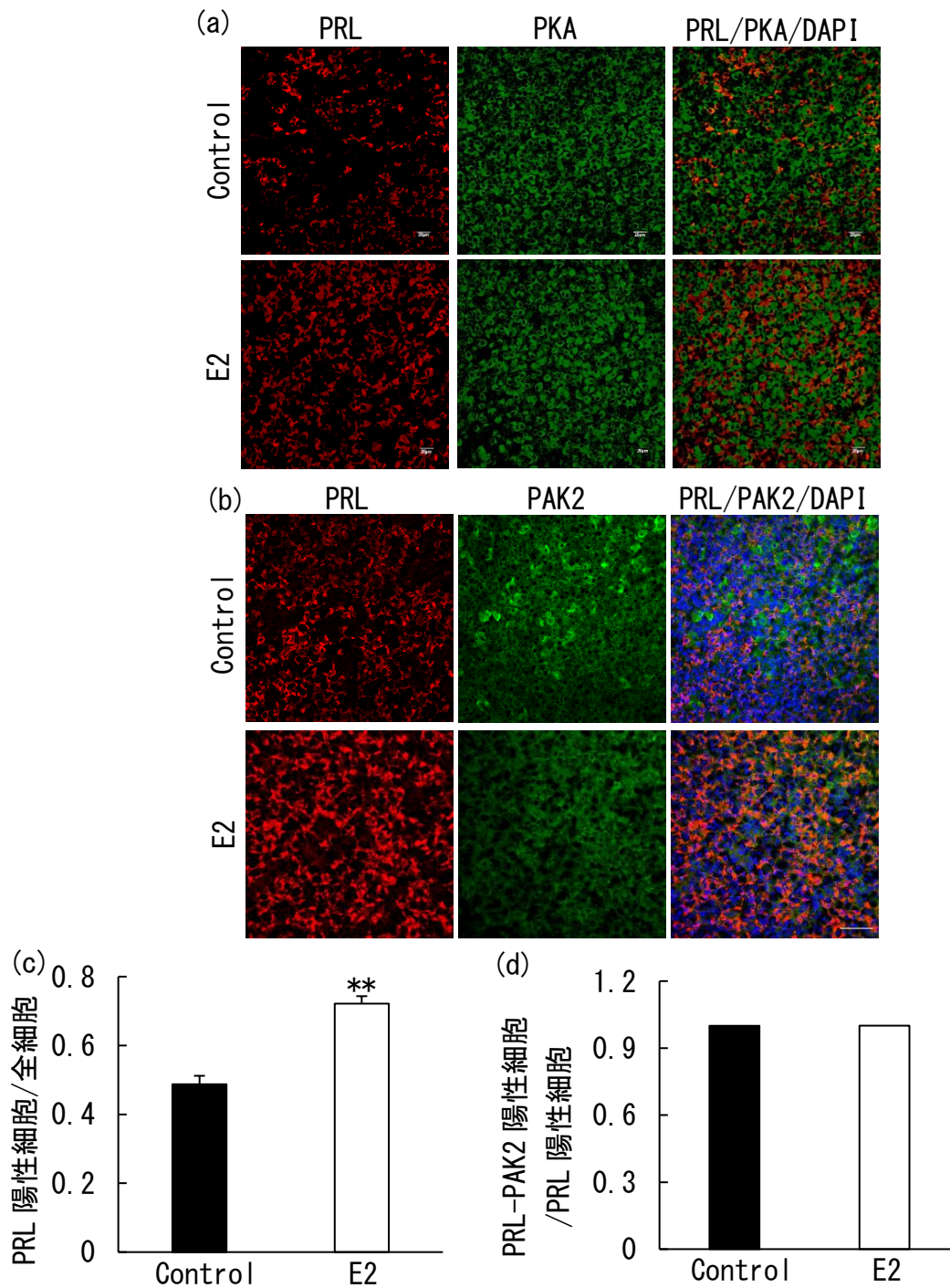


Fig. 3-2 E2 投与による下垂体内の PKA 及び PAK2 局在確認

OVX 処置後 7 日経過した雌マウスに E2 を投与し、7 日経過した下垂体における PRL と (a) PKA 及び (b) PAK2 の局在を免疫染色により確認した。(c) PRL 陽性細胞の割合を数値化してグラフ化した。(d) PRL 陽性細胞中の PRL-PAK 両陽性細胞の割合を数値化してグラフ化した。(Mean ± SEM, n=3, \*\*=p<0.05)



(Fig. 3-2a, b)。また、E2 投与による PRL と PAK2 の局在率の変化を確認した。局在率は PRL 陽性細胞数に対する PRL-PAK2 両陽性細胞数の割合で示した。その結果、PRL と PAK2 の局在率にも変化はみられなかった (Fig. 3-2d)。

### **E2 投与による PAK2 発現への影響解析**

E2 投与がマウス下垂体中における PAK2 発現に影響を与えるか確認する為、E2 投与マウス下垂体における遺伝子、タンパク発現量を Real Time PCR と Western Blotting により確認した。その結果、E2 投与によりマウス下垂体中の Pak2 遺伝子発現が減少することが明らかになった (Fig. 3-3)。また、同様に E2 投与により総 PAK2 タンパク発現量も減少することが明らかになった (Fig. 3-4a, b)。

PAK2 には活性型であるリン酸化 PAK (pPAK2) が存在することが知られているため、E2 投与によって pPAK2 タンパク発現量に影響を与えるかを Western Blotting で確認した。その結果、E2 投与によりマウス下垂体中の pPAK2 タンパク発現量が減少することが明らかになった (Fig. 3-4c, d)。しかし、マウス下垂体における pPAK2/総 PAK2 比率は E2 投与により有意に上昇することを明らかにした (Fig. 3-4e)。

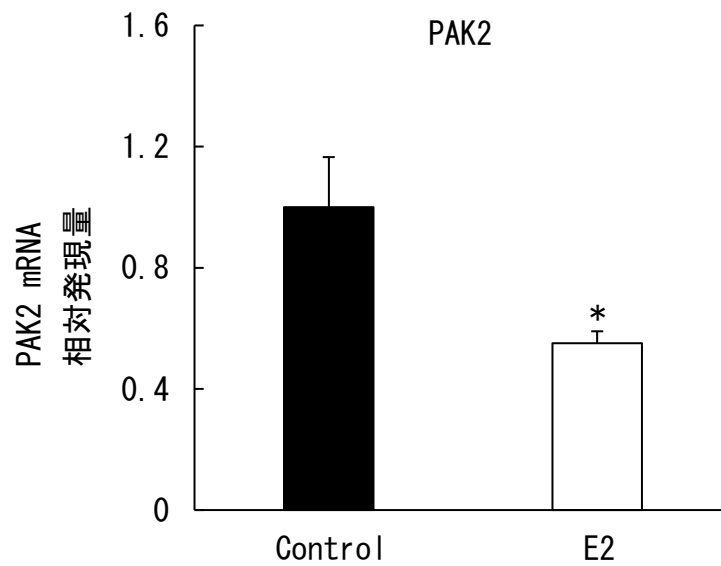


Fig. 3-3 E2 投与による PAK2 遺伝子発現量の変化

OVX 処置後 7 日経過した雌マウスに E2 を投与し、7 日後の下垂体における PAK2 遺伝子発現量を Real Time PCR で確認した。(Mean ± SEM, n=3, \* $p < 0.05$ )

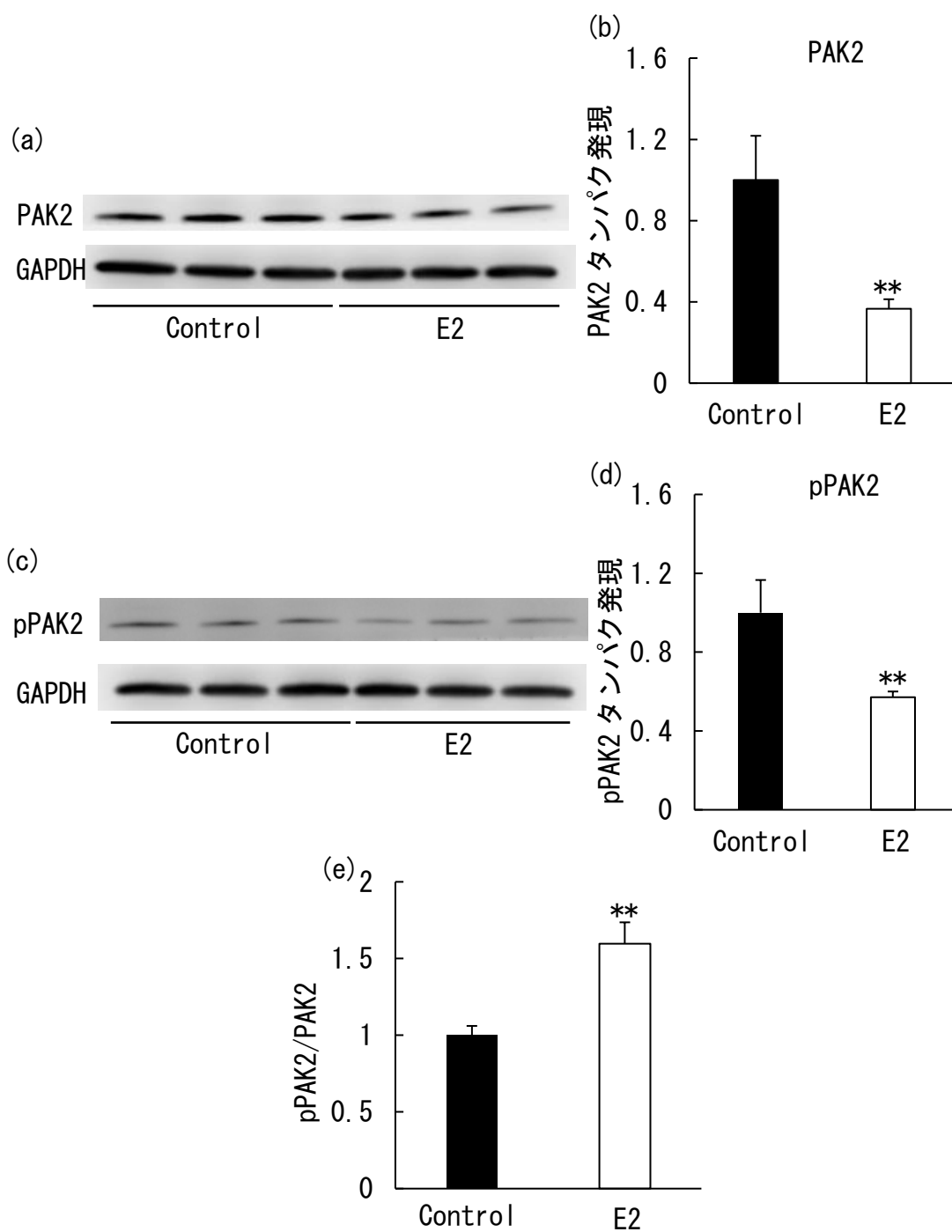


Fig. 3-4 E2 投与による PAK2 タンパク発現量の変化

OVX 処置後 7 日経過した雌マウスに E2 を投与し、7 日後の下垂体における PAK2 (a、b) および pPAK2 (c、d) タンパク発現量を確認した。各値は GAPDH で補正した。(e) pPAK2/PAK2 比率をグラフ化した。

(Mean ± SEM, n=3, \*\*=p<0.01)

### *PAK2* ノックダウンによる *E2* 誘導性 *PRL* リン酸化への影響解析

*E2* によるリン酸化に *PAK2* が関与しているかを確認する為、OVX 処置後 7 日間経過したマウスの下垂体前葉初代培養細胞の *PAK2* 発現を *PAK2* の siRNA (siPAK2) によりノックダウンし、その影響を確認した。その結果、siPAK2 を導入した下垂体前葉初代培養細胞では *PAK2* の発現量が有意に減少していた (Fig. 3-5a)。また、*E2* を添加した初代培養細胞でも *PAK2* の発現量が減少していた。しかし、コントロール siRNA (siControl) を導入し、*E2* を添加した初代培養細胞では *PAK2* の発現量が減少しなかった。また、初代培養細胞に siPAK2 を導入した際の *PAK2* 発現の変化を免疫細胞化学法により確認した。その結果、siPAK2 導入により *PAK2* の蛍光強度の低下することが確認された (Fig. 3-5b)。

siPAK2 によるノックダウンが、*E2* 誘導性の *PRL* リン酸化に影響を与えるか確認する為、siPAK2 を導入した初代培養細胞に *E2* を投与し 48 時間培養し、抽出したタンパク質を用いて二次元電気泳動を行った。二次元電気泳動により、*E2* を添加していない下垂体前葉初代培養細胞における未修飾 *PRL* 及びセリンリン酸化 *PRL* (PPRLS)、セリン/スレオニンリン酸化 *PRL* (PPRLT) の発現が確認された (Fig. 3-6a)。また、*E2* を添加した初代培養細胞において PPRLT と PPRLS の未修飾 *PRL* に対する存在比が有意に増加することが示された (Fig. 3-6b, c)。加えて、*E2* により増加した PPRLS/*PRL* の存在比が siRNA 導入により有意に減少した (Fig. 3-

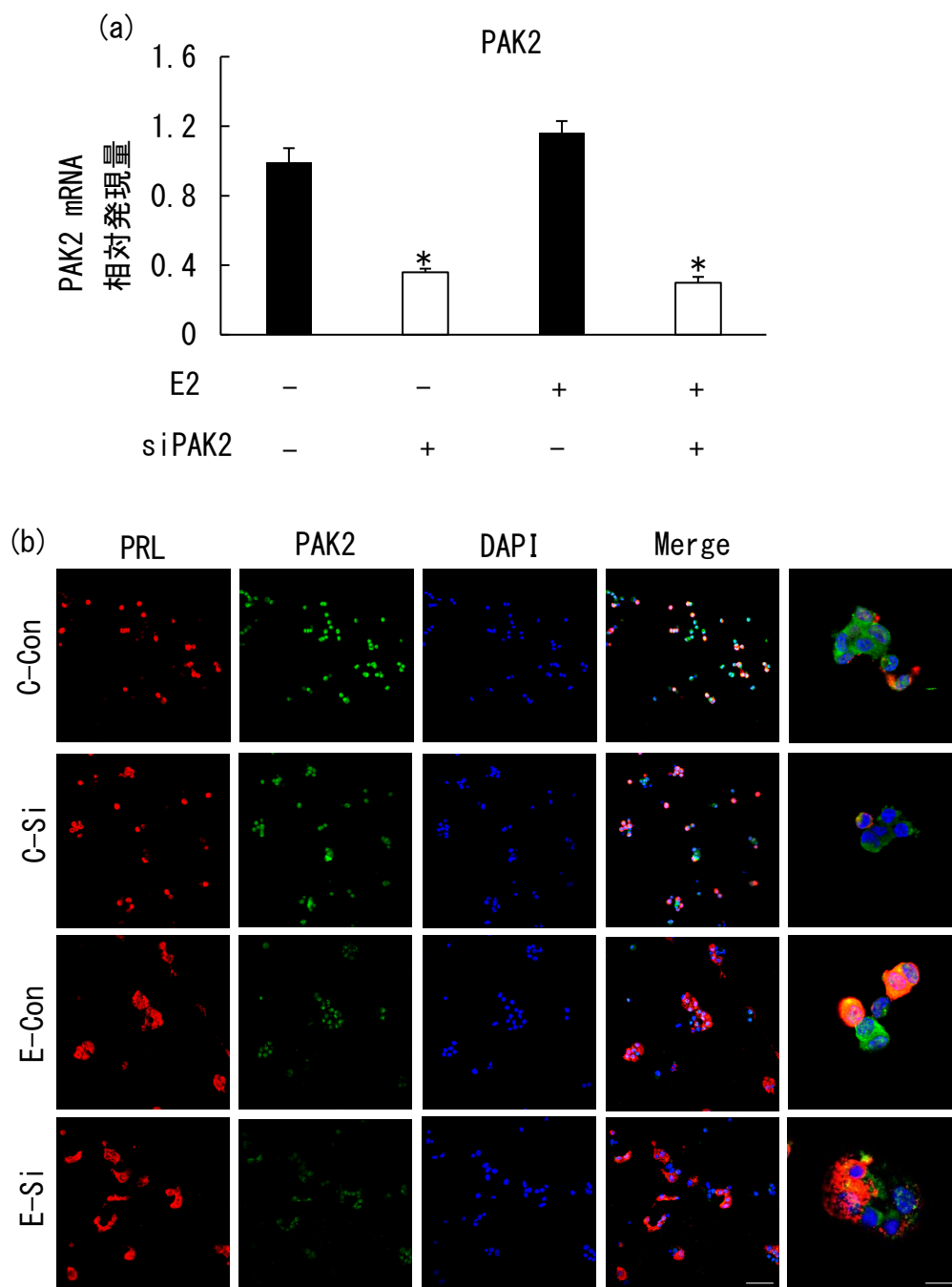


Fig. 3-5 siPAK2によるPAK2の抑制

(a)下垂体初代培養細胞にsiPAK2を導入した際のmRNA発現量をReal Time PCRで確認した。(b)また、タンパク発現を細胞組織化学法で確認した。(Mean±SEM, n=3, \* $p$ <0.05)

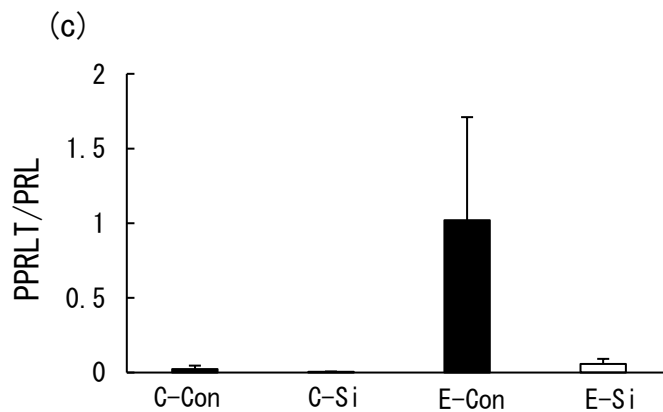
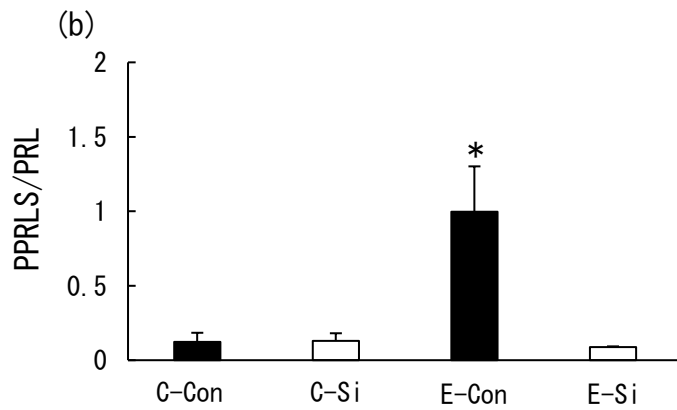
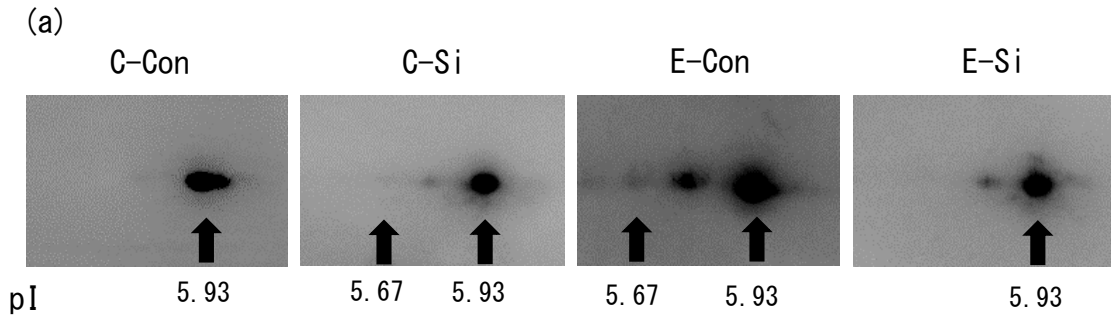


Fig. 3-6 siPAK2によるE2誘導性リン酸化PRLへの影響

下垂体初代培養細胞にsiPAK2を導入した際のリン酸化PRL発現を二次元電気泳動で確認した(a)。また、PPRLT/PRL(b)、PPRLS/PRL(c)の存在比をグラフ化した。(Mean±SEM, n=3, \* $p < 0.05$ )

6b)。また、PPRLT/PRL の存在比も同様に siRNA 導入により有意に減少した (Fig. 3-6c)。

### *E2 による PAK2 活性化因子発現への影響解析*

E2 が PAK2 の活性化因子である Rac1 と cdc42 発現に影響を与えるか確認する為、E2 投与マウス下垂体中における Rac1 及び Cdc42 タンパク発現量を Western blotting で確認した。その結果、E2 投与による Rac1 の発現量変化は見られなかったが、Cdc42 の発現量は有意に増加した。

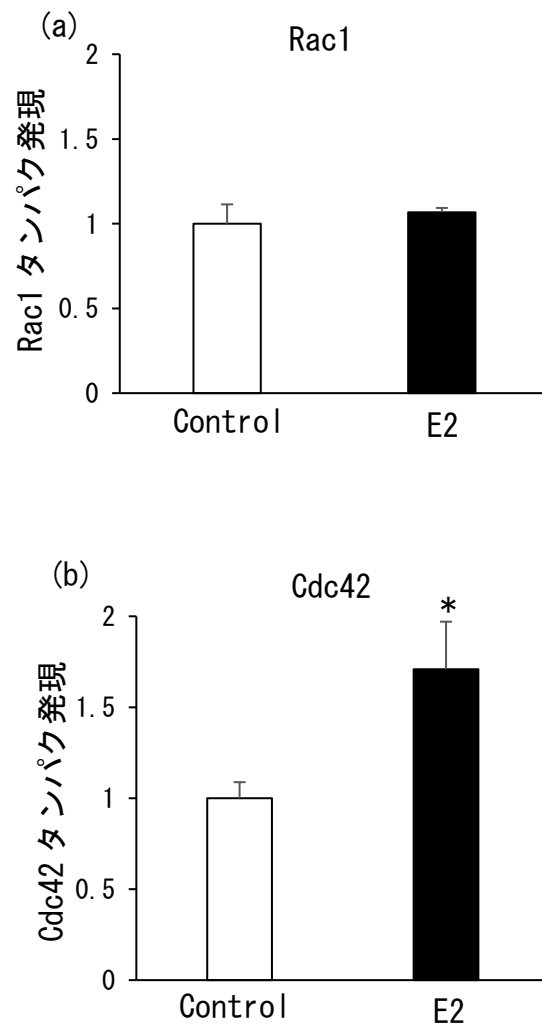


Fig. 3-6 E2 投与による PAK2 活性化因子への影響

OVX 処置後 7 日経過した雌マウスに E2 を投与し、7 日後の下垂体における Rac1 および Cdc42 発現量を Western Blotting で確認した。  
(Mean±SEM, n=3, \* $p$ <0.05)



### 3-4 考察

本章では E2 投与マウス下垂体における PRL のリン酸化は PAK2 により誘導されることを示した。

過去の研究において E2 投与マウス下垂体中でリン酸化 PRL 発現が確認されていることから、E2 投与における PRL のリン酸化機序を解析するため、本研究では主に E2 投与をしたマウスを使用した。E2 投与をしたマウスは下垂体の大きさ、子宮重量、下垂体中の PRL 陽性細胞数を確認することで、適切な処置が行われているかを確認した。E2 を投与したマウスではコントロールマウスに比べて下垂体の肥大が観察された。また、E2 投与マウスでは子宮重量がコントロールマウスに比べて有意に増加していた。加えて、下垂体中の PRL 陽性細胞数は E2 投与マウスで有意に増加していた。これらの結果は本研究における E2 投与が適切に行われていることを示している。

PRL は翻訳前後で修飾を受け構造が変化することで、機能の多様性を獲得する。この構造が変化した PRL は異型 PRL と呼ばれる。リン酸化 PRL も異型 PRL の一種であり、翻訳後にリン酸化酵素によりリン酸化されることで生成する。現在までに、PAK2 や PKA が PRL をリン酸化する酵素の候補とされているが、E2 を投与した際の下垂体中の局在や発現量の変化は未解明であった。その為、本研究では

E2 投与したマウス下垂体内のリン酸化酵素局在を免疫組織化学法を用いて組織学的に解析した。その結果、マウス下垂体中では PKA と PRL は共局在しておらず、PAK2 と PRL が共局在していることを明らかにした。このことは、E2 投与の有無にかかわらず、PRL のリン酸化に PKA は関与しておらず、PAK2 が主にリン酸化を担っている可能性を示唆している。そこで次に、下垂体において E2 投与が PAK2 発現に与える影響を Real Time PCR と Western Blotting で解析した。その結果、E2 投与により PAK2 の遺伝子発現及びタンパク質発現が低下することを明らかにした。また、PAK2 には活性型である pPAK が存在することが知られていることから、E2 投与が pPAK2 のタンパク質発現に与える影響を Western Blotting で解析した。その結果、E2 投与により pPAK2 のタンパク質発現が低下することを示した。これは、E2 投与によって細胞内リン酸化反応が減少するという報告がされており (Walker 2007)、その結果と一致する。この結果は E2 により PRL がリン酸化される事実と矛盾するが、pPAK2/PAK2 の割合に着目すると、E2 投与によりその割合が増加していることを示した。このことは、PRL のリン酸化は pPAK2 量ではなく pPAK2 の存在比が上昇することで引き起こされる可能性を示唆している。また、E2 の PRL リン酸化誘導に PAK2 が関与していることを明らかにするために、PAK2 siRNA を用いて PAK2 遺伝子をノックダウンした下垂体前葉細胞を用いて、リン酸化 PRL 量の変化を二次元電気泳動により確認した。

はじめに siPAK2 の導入により、下垂体前葉細胞中の PAK2 発現は有意に低下し、siControl 導入では発現量に差がなかったことから、siPAK2 導入により正常に PAK2 の発現が抑制されたことを示した。また、E2 投与により下垂体前葉細胞中の PPRL/PRL 存在比が有意に増加することが確認された。この結果は *in vivo* で E2 による PRL のリン酸化が確認された結果と一致したことから (Horiguchi et al. 2007)、初代下垂体前葉細胞はリン酸化 PRL 研究において有用であると考えられる。この E2 により増加した PPRL/PRL 存在比は siPAK2 の導入により有意に低下した。このことから下垂体前葉における E2 の PRL リン酸化誘導には PAK2 が関与していることが示唆された。E2 により増加した PPRLS/PRL 存在比は siPAK2 導入をすることで有意に低下していたが、siPAK2 導入後も微量に検出されている。このことは下垂体中における PPRLS のリン酸化には PAK2 以外のリン酸化酵素が関与している可能性を示唆している。また、E2 により増加した PPRLT/PRL 存在比は siPAK2 導入をすることで検出が出来ないレベルまで低下した。このことは E2 誘導性の PPRLS 発現の大部分に PAK2 が関与している可能性を示唆している。

PRL はラクトロフの分泌顆粒中に  $Zn^{2+}$  を中心として凝集して蓄えられている (Sankoorikal et al. 2002)。 $Ca^{2+}$  で処理をした下垂体中では PPRL 量が増加しなかったが、 $Zn^{2+}$  で処理した下垂体中では PPRL 量が増加したことが報告されてい

る(Wicks and Brooks 1999)。このことから PAK2 に加えて、Zn<sup>2+</sup>で活性化するリン酸化酵素が PRL のリン酸化酵素の候補として挙げられるだろう。

下垂体前葉における E2 の PRL リン酸化誘導に PAK2 が関与していること、そのリン酸化には PAK2 発現量ではなく pPAK2/PAK2 存在比の関係が示唆されていることから、本研究では PAK2 の活性化因子として知られている、rac1 及び cdc42 発現に対する E2 の影響を解析した。その結果、E2 投与したマウス下垂体において Rac1 発現には変化がなかったが、cdc42 発現は有意に増加していた。このことから、E2 投与のマウス下垂体における PAK2 の活性化には cdc42 発現が関与している可能性が示唆された。

本章では下垂体前葉細胞において E2 が PRL のリン酸化を引き起こし、そのリン酸化が siPAK により抑制されること、また E2 により cdc42 発現が増加し、pPAK2/PAK2 存在比が増加することを示した。このことから、マウス下垂体において E2 による cdc42 発現上昇、それに伴う PAK2 の活性化により PRL をリン酸化している可能性を示した。

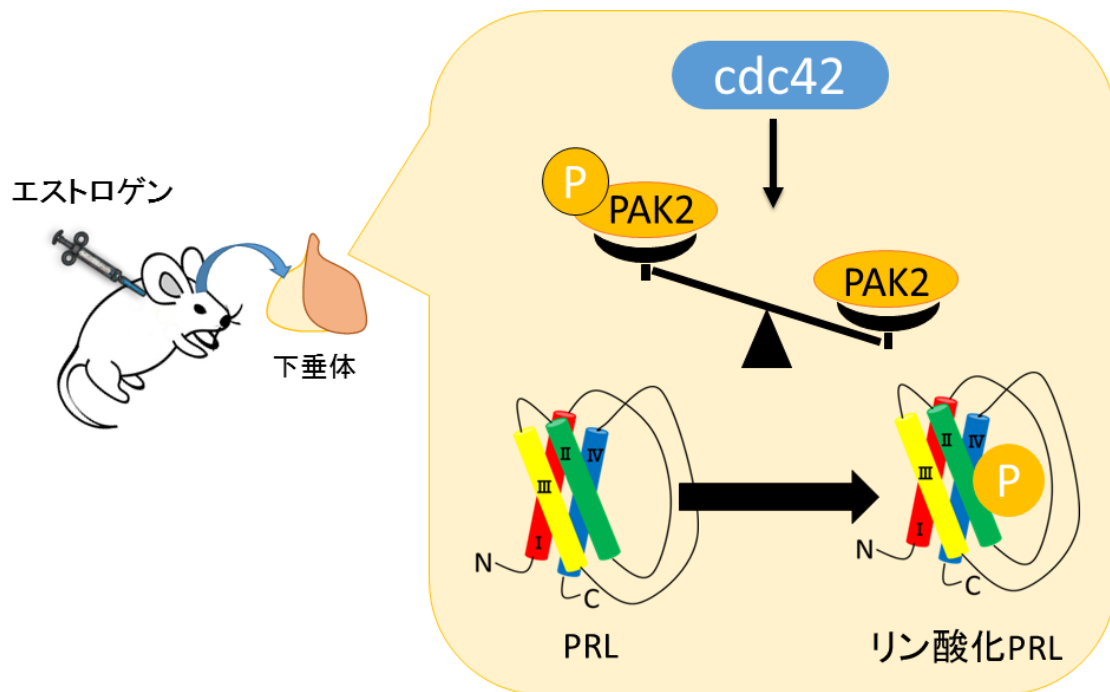


Fig. G マウス下垂体における E2 誘導性リン酸化 PRL の生成機序仮説  
 マウス下垂体中では E2 により cdc42 発現が増加し、pPAK2/PAK2 比率が増加する。この PAK2 により PRL がリン酸化され、リン酸化 PRL が生成する。

## 第四章 総合考察

本研究では異型 PRL であるバソインヒビンの受容体探索、線維化に関する機能解明、またリン酸化 PRL の生成過程に関する研究を行った。第一章ではバソインヒビンの受容体を明らかにするため、バソインヒビンとインテグリンアイソフォームの関係性を解析した。その結果、血管内皮細胞におけるバソインヒビンのアポトーシス誘導作用はインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を介して引き起こされることを明らかにした。第二章ではバソインヒビンの新たな機能を解明するため、バソインヒビンが線維芽細胞に与える影響を解析した。その結果、バソインヒビンには TGF- $\beta$  を介さずに線維芽細胞を活性化させる機能があることを明らかにした。第三章ではマウス下垂体においてエストロゲンにより誘導されるプロラクチンのリン酸化を担う酵素を解析した。その結果、マウス下垂体におけるエストロゲン誘導性プロラクチンリン酸化は PAK2 により引き起こされることを明らかにした。

第一章では Vi がインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  に結合することを明らかにした。現在までに Vi は下垂体や血管内皮細胞を含む様々な組織で確認されているが、Vi を産生する組織は同定されていない。インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  は細胞の基底膜側に存在し、下垂体で生成された Vi は血液を介して輸送されるため、下垂体由来 Vi と

インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  が結合する可能性は低いと考えられる。その為、Vi とインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  が結合するのであれば、その Vi は下垂体以外で産生される異所性 PRL 由来の可能性が考えられる。この異所性 PRL 由来の Vi がオートクラインやパラクラインにより近傍、自身の細胞に発現しているインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  に結合することで作用を引き起こしている可能性が考えられる。その為、Vi の血中濃度が上がることなく、Vi を産生する組織で局所的に Vi の作用が生じる可能性も考えられる。

第二章では Vi が心臓線維芽細胞の  $\alpha$ -SMA 発現を TGF- $\beta$  非依存的に増加させることを明らかにした。現在までに報告されている Vi の作用は名前の由来にもある通り、殆どが血管新生に関するものである。本研究で明らかにした Vi と線維化を関連付ける結果は、過去に例の無い結果である。本研究では、心臓線維芽細胞の活性化マーカーである  $\alpha$ -SMA の発現量が Vi によって増加することを示したに留まるが、Vi と心臓の線維化の関連性が明らかになることで、周産期心筋症患者において血中 TGF- $\beta$  量が増加せずに、心臓の線維化が確認されることを解明する手掛かりにもなり得る。また、周産期心筋症における心臓の線維化は重症患者において確認される病態であることから、重症化を防ぐ治療法を解明する手掛かりになるのではないかと考えている。第一章で Vi とインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  の結合が確認されたこと、過去の研究において線維化に integrin linked

kinase が関与している報告があることから、周産期心筋症の線維化においても Vi とインテグリンが密接に関係している可能性が考えられる。今後の研究の発展により、周産期心筋症、バソインヒビン、インテグリンの三者の関係性が明らかになっていくことが予想される。

第三章ではエストロゲンにより誘導されるプロラクチンのリン酸化が PAK2 により誘導されることを明らかにした。現在までに、プロラクチンをリン酸化する酵素を報告した例はあるが、リン酸化酵素と PRL のタンパク質を用いた *in vitro* の実験であり、*in vivo* においてプロラクチンのリン酸化酵素を特定した例は本研究が初である。エストロゲンは性周期を決定するのに重要な因子であり、その時期により分泌量が大きく変化する。月経前に月経前症候群 (premenstrual syndrome: PMS) と呼ばれる様々な身体的不調を訴える状態がある。具体的な症状には浮腫、乳房痛、倦怠感、抑うつなどが挙げられるが、詳細な原因は明らかになっていない。現在までに PRL は 300 を超える機能が報告されており、体内における様々な生理状態に関与していることが予想される。性周期における PRL 量の増加はエストロゲンの増加と同時に起こるが、PRL と PMS の関係は現在までに明らかになっていない。エストロゲンにより増加するリン酸化 PRL がその症状に関与していることは否定できない。

また、エストロゲンを長期投与したマウスはプロラクチノーマのモデルマウ



スとして用いられている。プロラクチノーマは下垂体内における PRL 産生細胞が増加し、PRL 細胞における分泌細胞の肥大化、血中への PRL 分泌量が増加し、高 PRL 血症を発症する下垂体腺腫の一種である。現在、臨床では RIA を用いた血中 PRL 濃度の測定が行われている。しかし、症状を呈している高 PRL 血症患者と同程度の血中 PRL 濃度を示しているが、高 PRL 血症の病状を示さない人が多い。これは純粋な血中 PRL 量だけでなく、リン酸化 PRL 量により差異が出ている可能性が考えられる。本研究ではエストロゲンにより PAK2 を介した PRL のリン酸化が確認されている。このことから高 PRL 血症患者の血中リン酸化 PRL 濃度や PAK2 活性を測定することでより正確な診断が出来る可能性が考えられる。

本研究では異型 PRL の受容体探索、新規作用の解明、産生機序の解明を行った。PRL は自身の特徴である異型性や異所性により 300 を超える機能を持つと考えられている。また、数多くの異型 PRL や異所性 PRL は作用が明らかになっているが、生体内での存在意義の不明なものも多い。これら異型 PRL、異所性 PRL の受容体や産生機序が明らかになることは生体内での存在意義を明らかにするためにも重要であると考えられる。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、熱心かつ丁寧なご指導をしていただきました針谷敏夫教授に深く感謝いたします。また、本研究に関し、丁寧なご助言を頂きました杏林大学保健学部の堀口幸太郎先生に心より感謝申し上げます。

そして生体機構学研究室の諸先輩、同輩、後輩の皆様には快い研究環境を提供、実験の補助をしていただき大変お世話になりました。ここに感謝申し上げます。

最後に、実験の為、犠牲となった多くの実験動物たちに哀悼の意を表します。

## 参考文献

- Aramburo C, Montiel JL, Proudman JA, Berghman LR, Scanes CG. 1992. Phosphorylation of prolactin and growth-hormone. *Journal of Molecular Endocrinology* 8:183-191.
- Arany Z, Elkayam U. 2016. Peripartum Cardiomyopathy. *Circulation* 133:1397-1409.
- Bajou K, et al. 2014. PAI-1 mediates the antiangiogenic and profibrinolytic effects of 16K prolactin (vol 20, pg 741, 2014). *Nature Medicine* 20:1217-1217.
- Baldocchi RA, Tan L, Hom YK, Nicoll CS. 1995. Comparison of the ability of normal mouse mammary tissues and mammary adenocarcinoma to cleave rat prolactin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 208:283-287.
- Baldocchi RA, Tan L, King DS, Nicoll CS. 1993. Mass-spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin - evidence that the cleaving enzyme is cathepsin-d. *Endocrinology* 133:935-938.

- Bernard V, Young J, Chanson P, Binart N. 2015. New insights in prolactin: pathological implications. *Nature Reviews Endocrinology* 11:265-275.
- Bernichtein S, Touraine P, Goffin V. 2010. New concepts in prolactin biology. *Journal of Endocrinology* 206:1-11.
- Berry TU. 2003. Encyclopedia of hormones. *Library Journal* 128:68-68.
- Binart N, Bachelot A, Bouilly J. 2010. Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 21:362-368.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews* 19:225-268.
- Bollen IAE, Van Deel ED, Kuster DWD, Van Der Velden J. 2015. Peripartum cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy: different at heart. *Frontiers in Physiology* 5 (art. 531).
- Borza CM, Pozzi A, Borza DB, Pedchenko V, Hellmark T, Hudson BG, Zent R. 2006. Integrin alpha 3 beta 1, a Novel Receptor for alpha 3(IV) noncollagenous domain and a trans-dominant inhibitor for integrin

alpha v beta 3. *Journal of Biological Chemistry* 281:20932–20939.

Brar SS, Khan SS, Sandhu GK, Jorgensen MB, Parikh N, Hsu JWY, Shen AYJ.

2007. Incidence, mortality, and racial differences in peripartum cardiomyopathy. *American Journal of Cardiology* 100:302–304.

Brasier AR. 2010. The nuclear factor-kappa B-interleukin-6 signalling

pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovascular Research* 86:211–218.

Brooks CL, Kim BG, Aphale P, Kleeman BE, Johnson GC. 1990. Phosphorylated

variant of bovine prolactin. *Molecular and Cellular Endocrinology* 71:117–123.

Bultmann BD, Klingel K, Nabauer M, Wallwiener D, Kandolf R. 2005. High

prevalence of viral genomes and inflammation in peripartum cardiomyopathy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 193:363–365.

Caron MG, Beaulieu M, Raymond V, Gagne B, Drouin J, Lefkowitz RJ, Labrie

F. 1978. Dopaminergic receptors in anterior-pituitary gland - correlation of h-3 dihydroergocryptine binding with dopaminergic control of prolactin-release. *Journal of Biological Chemistry*

253:2244-2253.

Chen TJ, Kuo CB, Tsai KF, Liu JW, Chen DY, Walker AM. 1998. Development of recombinant human prolactin receptor antagonists by molecular mimicry of the phosphorylated hormone. *Endocrinology* 139:609-616.

Clapp C. 1987. Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary-gland and liver of the rat - characterization of the cleaved and 16k forms. *Endocrinology* 121:2055-2064.

Clapp C, Aranda J, Gonzalez C, Jeziorski MC, de la Escalera GM. 2006. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 17:301-307.

Clapp C, Sears PS, Nicoll CS. 1989. Binding-studies with intact rat prolactin and a 16k fragment of the hormone. *Endocrinology* 125:1054-1059.

Clapp C, Thebault S, de la Escalera GM. 2008. Role of prolactin and vasoinhibins in the regulation of vascular function in mammary gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 13:55-67.

Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, De la Escalera GM. 2009. Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis. *Physiological Reviews* 89:1177-

1215.

Clapp C, Weiner RI. 1992. A specific, high-affinity, saturable binding-site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial-cells. *Endocrinology* 130:1380-1386.

Compton MM, Witorsch RJ. 1984. Proteolytic degradation and modification of rat prolactin by subcellular-fractions of the rat ventral prostate-gland. *Endocrinology* 115:476-484.

Cooke NE, Coit D, Shine J, Baxter JD, Martial JA. 1981. Human-prolactin - cDNA structural-analysis and evolutionary comparisons. *Journal of Biological Chemistry* 256:4007-4016.

Cooke NE, Coit D, Weiner RI, Baxter JD, Martial JA. 1980. Structure of cloned DNA complementary to rat prolactin messenger-RNA. *Journal of Biological Chemistry* 255:6502-6510.

Corbacho AM, de las Escalera GM, Clapp C. 2002. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *Journal of Endocrinology* 173:219-238.

Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Torner L, Duenas Z, Noris G, Morales MA, de la Escalera GM, Clapp C. 2000. Human umbilical vein endothelial

cells express multiple prolactin isoforms. *Journal of Endocrinology* 166:53-62.

Cruz-Soto ME, et al. 2009. Cathepsin D Is the Primary Protease for the Generation of Adenohypophyseal Vasoinhibins: Cleavage Occurs within the Prolactin Secretory Granules. *Endocrinology* 150:5446-5454.

Cucoranu I, Clempus R, Dikalova A, Phelan PJ, Ariyan S, Dikalov S, Sorescu D. 2005. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta 1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circulation Research* 97:900-907.

Demakis JG, Rahimtoola SH, Sutton GC, Meadows WR, Szanto PB, Tobin JR, Gunnar RM. 1971. Natural course of peripartum cardiomyopathy. *Circulation* 44:1053-+.

Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJF, Lu H, Knebelmann B, Segal M, Sukhatme VP. 1999. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 274:11721-11726.

Digtyar AV, Pozdnyakova NV, Feldman NB, Lutsenko SV, Severin SE. 2007. Endostatin: Current concepts about its biological role and mechanisms of action. *Biochemistry-Moscow* 72:235-246.



Du LL, Wu W. 2012. A mimic of phosphorylated prolactin induces apoptosis by activating AP-1 and upregulating p21/waf1 in human prostate cancer PC3 cells. *Oncology Letters* 4:1064-1068.

Emanuele NV, Jurgens JK, Halloran MM, Tentler JJ, Lawrence AM, Kelley MR. 1992. The rat prolactin gene is expressed in brain-tissue - detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger-rna. *Molecular Endocrinology* 6:35-42.

Erdmann S, Ricken A, Merkwitz C, Struman I, Castino R, Hummitzsch K, Gaunitz F, Isidoro C, Martial J, Spanel-Borowski K. 2007. The expression of prolactin and its cathepsin D-mediated cleavage in the bovine corpus luteum vary with the estrous cycle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 293:E1365-E1377.

Faust PL, Kornfeld S, Chirgwin JM. 1985. Cloning and sequence-analysis of cDNA for human cathepsin-d. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82:4910-4914.

Ferrara N, Clapp C, Weiner R. 1991. The 16k fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth-factor stimulated growth of capillary endothelial-cells. *Endocrinology* 129:896-900.

- Floquet N, Pasco S, Ramont L, Derreumaux P, Laronze JY, Nuzillard JM, Maquart FX, Alix AJP, Monboisse JC. 2004. The antitumor properties of the alpha 3(IV)-(185-203) peptide from the NC1 domain of type IV collagen (tumstatin) are conformation-dependent. *Journal of Biological Chemistry* 279:2091-2100.
- Forster O, Hilfiker-Kleiner D, Ansari AA, Sundstrom JB, Libhaber E, Tshani W, Becker A, Yip A, Klein G, Sliwa K. 2008. Reversal of IFN-gamma, oxLDL and prolactin serum levels correlate with clinical improvement in patients with peripartum cardiomyopathy. *European Journal of Heart Failure* 10:861-868.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews* 80:1523-1631.
- Garcia C, et al. 2008. Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *Journal of Clinical Investigation* 118:2291-2300.
- Garcia C, Nunez-Anita RE, Thebault S, Zamarripa DA, Jeziorsky MC, de la

- Escalera GM, Clapp C. 2014. Requirement of phosphorylatable endothelial nitric oxide synthase at Ser-1177 for vasoinhibin-mediated inhibition of endothelial cell migration and proliferation in vitro. *Endocrine* 45:263-270.
- Garcia-Mata R, Burridge K. 2007. Catching a GEF by its tail. *Trends in Cell Biology* 17:36-43.
- Ge GX, Fernandez CA, Moses MA, Greenspan DS. 2007. Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:10010-10015.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. 1998. NF-kappa B and rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology* 16:225-260.
- Gonzalez C, et al. 2007. Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia. *Laboratory Investigation* 87:1009-1017.
- Greenan JR, Balden E, Ho TWC, Walker AM. 1989. Biosynthesis of the secreted 24-k isoforms of prolactin. *Endocrinology* 125:2041-2048.

- Guzman EA, Langowski JL, De Guzman A, Muller HK, Walker AM, Owen LB. 2008. S179D prolactin diminishes the effects of UV light on epidermal gamma delta T cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 280:6-12.
- Haghikia A, et al. 2013. Phenotyping and outcome on contemporary management in a German cohort of patients with peripartum cardiomyopathy. *Basic Research in Cardiology* 108 (art. 366).
- Halkein J, et al. 2013. MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation* 123:2143-2154.
- Harigaya T, Komori M, Kawakami T, Watanabe H, Abe M. 1997. Expression of prolactin gene in mouse placenta during late pregnancy: Detection of mRNA and its translation product. *Endocrine Journal* 44:155-161.
- Hilfiker-Kleiner D, et al. 2007. A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell* 128:589-600.
- Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. 2001. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Molecular Biology of the Cell* 12:2730-2741.
- Ho TWC, Leong FS, Olaso CH, Walker AM. 1993. Secretion of specific

- nonphosphorylated and phosphorylated rat prolactin isoforms at different stages of the estrous-cycle. *Neuroendocrinology* 58:160-165.
- Horiguchi K, Naito JI, Ishida M, Harigaya T. 2007a. The effect of estrogen on phosphorylation of prolactin in the mouse pituitary gland. *Journal of Reproduction and Development* 53:515-523.
- Horiguchi K, Fukuta S, Yoshida M, Kosugi T, Naito JI, Ishida M, Harigaya T. 2007b Estrogen regulates the serum level of phosphorylated prolactin in mice. *Journal of Reproduction and Development* 53:915-922.
- Horiguchi K, Yagi S, Ono K, Nishiura Y, Tanaka M, Ishida M, Harigaya T. 2004. Prolactin gene expression in mouse spleen helper T cells. *Journal of Endocrinology* 183:639-646.
- Horne BD, et al. 2011. Genome-Wide Significance and Replication of the Chromosome 12p11.22 Locus Near the PTHLH Gene for Peripartum Cardiomyopathy. *Circulation-Cardiovascular Genetics* 4:359-U363.
- Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. 2006. Integrin ligands at a glance. *Journal of Cell Science* 119:3901-3903.
- Ishida M, Maehara M, Watanabe T, Yanagisawa Y, Takata Y, Nakajima R,

- Suzuki M, Harigaya T. 2014. Vasoinhibins, N-terminal mouse prolactin fragments, participate in mammary gland involution. *Journal of Molecular Endocrinology* 52:279-287.
- Jugdutt BI. 2003. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix - When is enough enough? *Circulation* 108:1395-1403.
- Jung JH, Traugh JA. 2005. Regulation of the interaction of Pak2 with Cdc42 via autophosphorylation of serine 141. *Journal of Biological Chemistry* 280:40025-40031.
- Kamiya CA, Kitakaze M, Ishibashi-Ueda H, Nakatani S, Murohara T, Tomoike H, Ikeda T. 2011. Different Characteristics of Peripartum Cardiomyopathy Between Patients Complicated With and Without Hypertensive Disorders - Results From the Japanese Nationwide Survey of Peripartum Cardiomyopathy. *Circulation Journal* 75:1975-1981.
- Kaviratne M, Hesse M, Leusink M, Cheever AW, Davies SJ, McKerrow JH, Wakefield LM, Letterio JJ, Wynn TA. 2004. IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. *Journal of Immunology* 173:4020-4029.

- Keeler C, Dannies PS, Hodsdon ME. 2003. The tertiary structure and backbone dynamics of human prolactin. *Journal of Molecular Biology* 328:1105-1121.
- Khurana S, Liby K, Buckley AR, Ben-Jonathan N. 1999. Proteolysis of human prolactin: Resistance to cathepsin D and formation of a nonangiostatic, C-terminal 16K fragment by thrombin. *Endocrinology* 140:4127-4132.
- Kim BG, Brooks CL. 1993. Isolation and characterization of phosphorylated bovine prolactin. *Biochemical Journal* 296:41-47.
- Kohmoto K, Tsunasawa S, Sakiyama F. 1984. Complete amino-acid-sequence of mouse prolactin. *European Journal of Biochemistry* 138:227-237.
- Krown KA, Wang YF, Ho TWC, Kelly PA, Walker AM. 1992. Prolactin isoform-2 as an autocrine growth-factor for gh3 cells. *Endocrinology* 131:595-602.
- Lan HY. 2011. Diverse Roles of TGF-beta/Smads in Renal Fibrosis and Inflammation. *International Journal of Biological Sciences* 7:1056-1067.
- Lee RCH, Walters JA, Reyland ME, Anderson SM. 1999. Constitutive

activation of the prolactin receptor results in the induction of growth factor-independent proliferation and constitutive activation of signaling molecules. *Journal of Biological Chemistry* 274:10024-10034.

Lee SH, Kunz L, Lin SH, Yu-Lee LY. 2007. 16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway. *Cancer Research* 67:11045-11053.

Lee SH, et al. 2005. 16-kDa prolactin down-regulates inducible nitric oxide synthase expression through inhibition of the signal transducer and activator of transcription 1/IFN regulatory factor-1 pathway. *Cancer Research* 65:7984-7992.

Li YJ, Tan XY, Dai CS, Stolz DB, Wang D, Liu YH. 2009. Inhibition of Integrin-Linked Kinase Attenuates Renal Interstitial Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology* 20:1907-1918.

Lijnen HR, Uguw F, Bini A, Collen D. 1998. Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry* 37:4699-4702.

Liu JM, et al. 2014. The Correlation between Peripartum Cardiomyopathy



- and Autoantibodies against Cardiovascular Receptors. *Plos One* 9 (art. e86770).
- Macotella Y, Aguilar MB, Guzman-Morales J, Rivera JC, Zermeno C, Lopez-Barrera F, Nava G, Lavalle C, de la Escalera GM, Clapp C. 2006. Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *Journal of Cell Science* 119:1790–1800.
- Maeshima Y, Sudhakar A, Lively JC, Ueki K, Kharbanda S, Kahn CR, Sonenberg N, Hynes RO, Kalluri R. 2002. Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis. *Science* 295:140–143.
- Melendez GC, McLarty JL, Levick SP, Du Y, Janicki JS, Brower GL. 2010. Interleukin 6 Mediates Myocardial Fibrosis, Concentric Hypertrophy, and Diastolic Dysfunction in Rats. *Hypertension* 56:225–231.
- Meuris S, Verloes A, Robyn C. 1983. Immunocytochemical localization of prolactin-like immunoreactivity in rat pancreatic-islets. *Endocrinology* 112:2221–2223.
- Mitra I. 1980. A novel cleaved prolactin in the rat pituitary .1. biosynthesis, characterization and regulatory control. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 95:1750–1759.

- Nagae M, Re S, Mihara E, Nogi T, Sugita Y, Takagi J. 2012. Crystal structure of alpha 5 beta 1 integrin ectodomain: Atomic details of the fibronectin receptor. *Journal of Cell Biology* 197:131-140.
- Nakajima R, Nakamura E, Harigaya T. 2017. Vasoinhibin, an N-terminal Prolactin Fragment, Directly Inhibits Cardiac Angiogenesis in Three-dimensional Heart Culture. *Frontiers in Endocrinology* 8 (art. 4).
- Nermut MV, Green NM, Eason P, Yamada SS, Yamada KM. 1988. Electron-microscopy and structural model of human fibronectin receptor. *Embo Journal* 7:4093-4099.
- Ntusi NBA, Mayosi BM. 2009. Aetiology and risk factors of peripartum cardiomyopathy: A systematic review. *International Journal of Cardiology* 131:168-179.
- Oconnell JB, Costanzonordin MR, Subramanian R, Robinson JA, Wallis DE, Scanlon PJ, Gunnar RM. 1986. Peripartum cardiomyopathy - clinical, hemodynamic, histologic and prognostic characteristics. *Journal of the American College of Cardiology* 8:52-56.
- Oetting WS, Tuazon PT, Traugh JA, Walker AM. 1986. Phosphorylation of prolactin. *Journal of Biological Chemistry* 261:1649-1652.

- Oga T, et al. 2009. Prostaglandin F-2 alpha receptor signaling facilitates bleomycin-induced pulmonary fibrosis independently of transforming growth factor-beta. *Nature Medicine* 15:1426-U1412.
- Pan XD, Chen ZP, Huang R, Yao YY, Ma GS. 2013. Transforming Growth Factor beta(1) Induces the Expression of Collagen Type I by DNA Methylation in Cardiac Fibroblasts. *Plos One* 8 (art. e60335).
- Patten IS, et al. 2012. Cardiac angiogenic imbalance leads to peripartum cardiomyopathy. *Nature* 485:333-U376.
- Patterson BC, Sang QXA. 1997. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B type IV collagenase (MMP-9). *Journal of Biological Chemistry* 272:28823-28825.
- Perimenis P, et al. 2014. Placental antiangiogenic prolactin fragments are increased in human and rat maternal diabetes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1842:1783-1793.
- Piwnica D, Touraine P, Struman I, Tabruyn S, Bolbach G, Clapp C, Martial JA, Kelly PA, Goffin V. 2004. Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: Study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Molecular*

*Endocrinology* 18:2522–2542.

Ricke-Hoch M, Bultmann I, Stapel B, Condorelli G, Rinas U, Sliwa K,

Scherr M, Hilfiker-Kleiner D. 2014. Opposing roles of Akt and STAT3 in the protection of the maternal heart from peripartum stress.

*Cardiovascular Research* 101:587–596.

Riddle O, R.W.Bates, S.W.dykshorn. 1933. The preparation, identification and assay of prolactin—a hormone of anterior pituitary.

*Amer. J. physiol* 105: 191–216

Riecher-Rossler A, Rybakowski JK, Pflueger MO, Beyrau R, Kahn RS, Malik P, Fleischhacker WW, Grp ES. 2013. Hyperprolactinemia in antipsychotic-naive patients with first-episode psychosis.

*Psychological Medicine* 43:2571–2582.

Robles JP, Zamora M, Velasco-Bolom JL, Tovar M, Garduno-Juarez R, Bertsch T, de la Escalera GM, Triebel J, Clapp C. 2018. Vasoinhibin comprises a three-helix bundle and its antiangiogenic domain is located within the first 79 residues. *Scientific Reports* 8 (art. 17111).

Rojas AM, Fuentes G, Rausell A, Valencia A. 2012. The Ras protein superfamily: Evolutionary tree and role of conserved amino acids.

*Journal of Cell Biology* 196:189–201.

Rose-John S, Neurath MF. 2004. IL-6 trans-signaling: The heat is on.

*Immunity* 20:2–4.

Russell J, Sherwood LM, Kowalski K, Schneider AB. 1981. Recombinant hormones from fragments of human growth-hormone and human placental-lactogen. *Journal of Biological Chemistry* 256:296–300.

Sabatel C, Cornet AM, Tabruyn SP, Malvaux L, Castermans K, Martial JA, Struman I. 2010. Sprouty1, a new target of the angiostatic agent 16K prolactin, negatively regulates angiogenesis. *Molecular Cancer* 9 (art. 231).

Saha RN, Jana M, Pahan K. 2007. MAPK p38 regulates transcriptional activity of NF-kappa B in primary human astrocytes via acetylation of p65. *Journal of Immunology* 179:7101–7109.

Sanderson JE, Lai KB, Shum IOL, Wei S, Chow LTC. 2001. Transforming growth factor-beta(1) expression in dilated cardiomyopathy. *Heart* 86:701–702.

Sankoorikal BJ, Zhu YL, Hodsdon ME, Lolis E, Dannies PS. 2002.

Aggregation of human wild-type and H27A-prolactin in cells and in

- solution: Roles of Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, and pH. *Endocrinology* 143:1302-1309.
- Shiokawa S, Yoshimura Y, Sawa H, Nagamatsu S, Hanashi H, Sakai K, Ando M, Nakamura Y. 1999. Functional role of Arg-Gly-Asp (RGD)-binding sites on beta(1) integrin in embryo implantation using mouse blastocysts and human decidua. *Biology of Reproduction* 60:1468-1474.
- Sinha YN. 1995. Structural variants of prolactin - occurrence and physiological significance. *Endocrine Reviews* 16:354-369.
- Sinha YN, Gilligan TA. 1984. A cleaved form of prolactin in the mouse pituitary-gland - identification and comparison of invitro synthesis and release in strains with high and low incidences of mammary-tumors. *Endocrinology* 114:2046-2053.
- Sinha YN, Gilligan TA, Lee DW, Hollingsworth D, Markoff E. 1985. Cleaved prolactin - evidence for its occurrence in human pituitary-gland and plasma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 60:239-243.
- Sliwa K, et al. 2010. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of peripartum cardiomyopathy: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology Working Group on peripartum cardiomyopathy. *European*

*Journal of Heart Failure* 12:767-778.

Souders CA, Bowers SLK, Baudino TA. 2009. Cardiac Fibroblast The Renaissance Cell. *Circulation Research* 105:1164-1176.

Steinmetz RW, Grant AL, Malven PV. 1993. Transcription of prolactin gene in milk secretory-cells of the rat mammary-gland. *Journal of Endocrinology* 136:271-&.

Struman I, Bentzien F, Lee HY, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner RI, Martial JA. 1999. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin growth hormone family members on angiogenesis: An efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:1246-1251.

Sudhakar A, Sugimoto H, Yang CQ, Lively J, Zeisberg M, Kalluri R. 2003. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:4766-4771.

Tabruyn SP, Nguyen NQN, Cornet AM, Martial JA, Struman I. 2005. The

antiangiogenic factor, 16-kDa human prolactin, induces endothelial cell cycle arrest by acting at both the G(0)-G(1) and the G(2)-M phases. *Molecular Endocrinology* 19:1932-1942.

Tabruyn SP, Sorlet CM, Rentier-Delrue F, Bours V, Weiner RI, Martial JA, Struman I. 2003. The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappa B. *Molecular Endocrinology* 17:1815-1823.

Tarui T, Miles LA, Takada Y. 2001. Specific interaction of angiostatin with integrin alpha(v)beta(3) in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 276:39562-39568.

Tcherkezian J, Lamarche-Vane N. 2007. Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biology of the Cell* 99:67-86.

Triebel J, Huefner M, Ramadori G. 2009. Investigation of prolactin-related vasoinhibin in sera from patients with diabetic retinopathy. *European Journal of Endocrinology* 161:345-353.

Ueda E, Ozerdem U, Chen YH, Yao M, Huang KT, Sun HQ, Martins-Green M, Bartolini P, Walker AM. 2006. A molecular mimic demonstrates that



phosphorylated human prolactin is a potent anti-angiogenic hormone.

*Endocrine-Related Cancer* 13:95-111.

Urbich C, Reissner A, Chavakis E, Dernbach E, Haendeler J, Fleming I, Zeiher AM, Kaszkin M, Dimmeler S. 2002. Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin. *FASEB Journal* 16:706-+.

Vaillant B, Chiaramonte MG, Cheever AW, Soloway PD, Wynn TA. 2001. Regulation of hepatic fibrosis and extracellular matrix genes by the Th response: New insight into the role of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Journal of Immunology* 167:7017-7026.

van Spaendonck-Zwarts KY, et al. 2014. Titin gene mutations are common in families with both peripartum cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *European Heart Journal* 35:2165-2173.

Vara JAF, Caceres AD, Silva A, Martin-Perez J. 2001. Src family kinases are required for prolactin induction of cell proliferation. *Molecular Biology of the Cell* 12:2171-2183.

Volk SW, Wang Y, Mauldin EA, Liechty KW, Adams SL. 2011. Diminished Type III Collagen Promotes Myofibroblast Differentiation and Increases

Scar Deposition in Cutaneous Wound Healing. *Cells Tissues Organs* 194:25-37.

Volk SW, Wang YJ, Cohen AJ, Liechty KW, Adams SL. 2009. Diminished type iii collagen expression improves wound contraction and promotes myofibroblast differentiation. *Wound Repair and Regeneration* 17:A22-A22.

Walker AM. 2007. S179D prolactin: Antagonistic agony! *Molecular and Cellular Endocrinology* 276:1-9.

Wang YF, Liu JW, Mamidi M, Walker AM. 1996. Identification of the major site of rat prolactin phosphorylation as serine 177. *Journal of Biological Chemistry* 271:2462-2469.

Wang YF, Walker AM. 1993. Dephosphorylation of standard prolactin produces a more biologically-active molecule - evidence for antagonism between nonphosphorylated and phosphorylated prolactin in the stimulation of nb-2 cell-proliferation. *Endocrinology* 133:2156-2160.

Weber KT, Brilla CG. 1992. Factors associated with reactive and reparative fibrosis of the myocardium. *Basic Research in Cardiology*

87:291-301.

Wicks JR, Brooks CL. 1999. Prolactin kinase activity in bovine anterior pituitary sub-cellular fractions. *Molecular and Cellular Endocrinology* 147:125-132.

Wong VLY, Compton MM, Witorsch RJ. 1986. proteolytic modification of rat prolactin by subcellular-fractions of the lactating rat mammary-gland. *Biochimica Et Biophysica Acta* 881:167-174.

Wynn TA, Ramalingam TR. 2012. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature Medicine* 18:1028-1040.

Xie WJ, He Y, Huo D, Huang YF, Wu W. 2010. A mimic of phosphorylated prolactin inhibits human breast cancer cell proliferation via upregulation of p21 waf1. *Medical Oncology* 27:1340-1345.

Xu XL, Wu W, Williams V, Khong A, Chen YH, Deng CH, Walker AM. 2003. Opposite effects of unmodified prolactin and a molecular mimic of phosphorylated prolactin on morphology and the expression of prostate specific genes in the normal rat prostate. *Prostate* 54:25-33.

Zamorano M, et al. 2014. Pro lactin-derived vasoinhibins increase anxiety- and depression-related behaviors. *Psychoneuroendocrinology*

44:123-132.