

## 論文内容の要旨

学位申請者 深井 邦剛

### 論文題目

Pyk2 aggravates hypoxia-induced pulmonary hypertension by activating HIF-1 $\alpha$ .

### 論文内容の要旨

肺動脈性肺高血圧症は原因不明の予後不良な疾患として知られているが、血管拡張薬の導入により大きく予後は改善した。しかしながら最近の米国レジストリー(Reveal study)では5年で30%弱の症例が死亡しているという現状があり、肺高血圧診療はさらに改善させる必要がある。以前は肺細動脈収縮や血栓形成が重要とされてきたが、現在、肺細動脈内膜層、中膜層の増殖や分化誘導、炎症、細胞動員などが新たな治療ターゲットとして注目されている。すでに新たな薬剤としてチロシンキナーゼ阻害薬や免疫抑制剤や臨床応用されているが、肺高血圧症に対する治療効果や安全性に対しても不透明な点が多いのが現状である。

以前より我々の研究グループは心血管ストレスにより非受容体型チロシンキナーゼPyk2が活性化され、血管リモデリングを亢進させることを報告してきた(Circulation 2007)。また肺組織にはPyk2蛋白が多く存在し血管内皮や血管平滑筋全般に分布している。Pyk2分子が肺高血圧血管リモデリングに関連しているという仮説のもと、以下の評価を行った。

肺高血圧症モデルとして、今まで臨床応用されてきた多くの薬剤の基礎実験で使用されている低酸素負荷誘発性肺高血圧症モデルを用いて以下の解析を行った。

まず肺組織において低酸素刺激によりPyk2が活性化されていることを確認した。Pyk2 knock out (KO)マウスに対しても低酸素負荷を行い、Wild type(WT)マウスとPyk2KOマウスの全肺を使用したマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析で比較したところ低酸素負荷前後で各種増殖因子や遊走因子の上昇がWTマウスに比べPyk2KOマウスで抑制されていた。

次に低酸素負荷前後での右室収縮期圧測定を行ったところWTマウスでは26.8mmHgから51.3mmHgへ上昇したが、Pyk2KOマウスでは25.4mmHgから38.4mmHgと右室圧の上昇が有意に抑制されていた。また組織評価においてもPyk2KOマウスで肺動脈中膜層の肥厚が抑制され増殖細胞も有意に減少し、右室心筋肥大も抑制されていた。低酸素応答にはHIF-1 $\alpha$ が重要な役割を果たしていることが知られており、低酸素刺激でHIF-1 $\alpha$ は分解が抑制され、核内移行することで様々な低酸素応答を引き起こす。以前の報告からもHIF-1 $\alpha$ を抑制することが肺血管リモデリング抑制につながるということが報告されていたため、肺組織における低酸素刺激前後でのHIF-1 $\alpha$ の評価を行うこととした。HIF-1 $\alpha$ の総蛋白量の違いはな

いものの、核内移行を評価したところPyk2KOマウスで有意にHIF-1 $\alpha$ の核内移行が抑制されていることを発見した。またHIF-1 $\alpha$ の下流分子であるGLUT-1やVEGFのmRNAの上昇が抑えられていた。

組織学的評価から肺動脈内膜の変化は乏しく、中膜の変化が優位に出現していたため、ヒト肺動脈平滑筋細胞(HPASMC)を使用し低酸素刺激を行い、Pyk2の発現と低酸素応答パターンを評価した。

small interfering RNAでPyk2をknock downしたHPASMCを作成し正常酸素、低酸素(1% O<sub>2</sub>)で細胞増殖と遊走の評価を行ったところ、増殖、遊走いずれもPyk2 knock down HPASMCで抑制されていた。HIF-1 $\alpha$ についてもPyk2 knock down HPASMCでは低酸素後のHIF-1 $\alpha$ の上昇がPyk2 knock downしていないHPASMCと比べ抑制されており、in vivoの結果を支持する結果であった。

HIF-1 $\alpha$ が上昇する前の時相で変化している蛋白を検索したところ、カルボニル化蛋白の増加がPyk2 knock down HPASMCで抑制されていた。これはPyk2 knock downしていないHPASMCに比べてPyk2 knock downしているHPASMCは酸化ストレスが少ないことを示唆する。活性酸素抑制薬のN-アセチルシステイン(NAC)を使用し低酸素負荷したところ、Pyk2を抑制した実験系とほぼ同パターンの結果が得られた。Pyk2はROSを介しHIF-1 $\alpha$ の調整に関わっていること、またそれが肺高血圧症の病態にも関わっていることを証明した。Pyk2分子は肺動脈リモデリング形成のシグナルに多面的に作用している可能性があり、治療ターゲットとしても考えうる分子と考える。