

主論文の要旨

**New Endoplasmic Reticulum Stress Regulator, Gipie,  
Regulates the Survival of Vascular Smooth Muscle Cells and  
the Neointima Formation After Vascular Injury**

〔新しい小胞体ストレスの調節因子、Gipie は、血管平滑筋細胞の生存と  
血管損傷後の新生内膜形成を制御する〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻  
病態内科学講座 循環器内科学分野

(指導：室原 豊明 教授)

野田 友則

## <緒言>

新規合成された蛋白質は、小胞体内で様々な修飾を受け、折り畳まれることにより適正な高次構造を得る。何らかの理由により折り畳み不全の蛋白質が小胞体内に蓄積した状態は小胞体ストレスと呼ばれ、UPR (unfolded protein response) と呼ばれる細胞応答を引き起こす。細胞はUPRによって小胞体の恒常性を維持しようとするが、恒常性が維持できないほどのストレスが持続した際には細胞をアポトーシスへと導く。近年、神経変性疾患や糖尿病、動脈硬化など様々な疾患において小胞体ストレスの関与が明らかとなってきた。我々は最近、新しい小胞体ストレス調節因子であるGipie (GRP78-interacting protein induced by ER stress) を同定した。Gipieは小胞体ストレスにより発現が増強し、内皮細胞において小胞体ストレス関連のシグナルを制御することが示されているが、血管平滑筋におけるGipieの機能、生物学的意義については検討されていない。また、血管損傷後の新生内膜形成においては中膜層の血管平滑筋が重要な役割を果たし、小胞体ストレスの関与も示唆されているが、詳細は明らかではない。本研究の目的はGipieの血管平滑筋における機能解析と、新生内膜形成に与える影響を検討することである。

## <対象および方法>

ヒト大動脈血管平滑筋細胞において、siRNAを用いてGipieをノックダウンし、薬剤を用いて小胞体ストレスを引き起こすことにより、Gipieが小胞体ストレスに関連するシグナルに及ぼす影響を評価した。また、細胞増殖および小胞体ストレス下の細胞死にGipieが及ぼす影響も検討した。

さらにラット総頸動脈バルーン擦過モデルを作成し、Gipieをノックダウンすることによる新生内膜厚、新生内膜における細胞死、細胞増殖に及ぼす影響を評価した。バルーン擦過モデルにおいて同様の検討をGipieの過剰発現でも行った。

## <結果>

まず血管平滑筋細胞におけるGipieの発現を検討したところ、Gipieは主に増殖型の血管平滑筋細胞において発現していた (Figure 1A)。続いて蛍光免疫染色法を用いて血管平滑筋細胞におけるGipieの細胞内局在を検討したところ、Gipieは核近傍に限局性に強く染色する部分および細胞質全体に淡くレース状に染色する部分として観察され、ゴルジ体のマーカーであるGM130および小胞体のマーカーであるPDI、GRP78に対する抗体であるKDELとMergeしていた (Figure 1B)。これらの結果からGipieは内皮細胞と同様にゴルジ体および小胞体に局在し、GRP78と相互作用して機能していると考えられた。Gipieの発現はThapsigarginを用いた薬剤性の小胞体ストレスにより増強することが確認された (Figure 1C)。続いてGipieが血管平滑筋細胞における小胞体ストレスのシグナルに及ぼす影響を検討したところ、GipieをノックダウンすることでJNKのリン酸化が亢進した (Figure 1D)。しかしGipieは他の小胞体ストレス関連のシグナルには影響を与えなかった。

また Gipie をノックダウンすることにより、血管平滑筋細胞のアポトーシスが増加した (Figure 2A)。一方で PCNA を用いた細胞周期の評価では Gipie のノックダウンによる影響は認められなかった (Figure 2B)。増殖型の血管平滑筋細胞は細胞外マトリックスとしてコラーゲンの産生を行っており、コラーゲンの成熟には小胞体での修飾が重要な役割を果たすため Gipie がコラーゲンの成熟に及ぼす影響を検討したところ、Gipie をノックダウンすることで成熟型コラーゲン I の産生が低下することが明らかとなった (Figure 2C)。さらに Gipie が細胞増殖に与える影響について MTS アッセイを用いて評価したところ、Gipie をノックダウンすることで細胞増殖は抑制された (Figure 2D)。

ラット総頸動脈擦過モデルにおいては、バルーン擦過前では Gipie は内皮細胞に観察されるのみであり、中膜層の血管平滑筋細胞では観察されなかったが、バルーン擦過後 9 日目および 14 日目では新生内膜を中心に Gipie の発現が観察され、また中膜層の血管平滑筋細胞の一部でも Gipie が発現していた (Figure 3A)。これらの Gipie の発現はバルーン擦過後 42 日目にはほとんど消失していた。バルーン擦過後の検体では IRE1 $\alpha$ 、PERK、KDEL などの発現が増加、JNK や PERK のリン酸化が亢進しており、血管損傷後の新生内膜形成において小胞体ストレスおよび UPR が関与していることが示唆された (Figure 3B)。また Gipie は中膜よりも内膜に多く発現していた (Figure 3C)。

バルーン擦過モデルにおいて Gipie をノックダウンすることで、新生内膜における JNK のリン酸化が増強し、成熟型コラーゲン I の産生は低下していた (Figure 4A)。バルーン擦過後 9 日目および 14 日目に総頸動脈の検体を採取し新生内膜と中膜の面積比 (I/M 比) を検討した結果、Gipie をノックダウンすることで I/M 比は有意に低下し、新生内膜形成を抑制する結果となった (Figure 4B、4C)。一方で中膜の面積および中膜周囲長には影響はなく、バルーン擦過後の再内皮化にも影響を与えなかった (Figure 4D–4G)。また Gipie をノックダウンすることで 9 日目、14 日目における新生内膜細胞でのアポトーシスが増加していることが確認されたが、細胞周期には影響を与えていなかった (Figure 5A–5D)。

さらにバルーン擦過モデルにおいて Gipie を過剰発現させたところ、新生内膜肥厚 (I/M 比) は有意に増加し、新生内膜細胞でのアポトーシスは減少していた (Figure 6A–6E)。

## <考察>

Gipie は血管平滑筋細胞においては主に増殖型の血管平滑筋細胞に発現していることが示され、小胞体ストレス関連のシグナルである JNK のリン酸化に関与し、細胞死や細胞増殖に影響を与えることが明らかとなった。また Gipie は血管平滑筋細胞におけるコラーゲン I の成熟に影響を与えることが明らかとなり、新規合成されるタンパク質の小胞体における修飾に関与している可能性が示唆された。

またバルーン擦過後の新生内膜において、Gipie の発現とともに小胞体ストレス関

連の蛋白も増加していることが明らかとなった。近年、生理的な状況下での分泌蛋白産生や細胞分化など、軽度な小胞体に対する負荷時にも小胞体ストレスや UPR が関与することが報告されている。血管損傷後の新生内膜においては、新生内膜形成に伴う細胞外マトリックスの産生などが小胞体に対する負荷となり、小胞体ストレスおよび Gipe 発現増強の誘因となっている可能性が考えられた。バルーン擦過モデルにおいて Gipe をノックダウンすることで新生内膜での細胞死が増加し新生内膜肥厚が抑制され、逆に Gipe を過剰発現させることで新生内膜での細胞死は減少し新生内膜肥厚は増加した。これらの結果から Gipe は小胞体ストレスに対する血管平滑筋細胞の反応を細胞死よりも、より環境に順応する方向に作用させていると考えられた。またこのような Gipe による小胞体ストレスの制御は血管損傷後の新生内膜形成に促進的に作用していると考えられた。

#### <結語>

Gipe は血管平滑筋細胞において ER ストレス反応のシグナル伝達に関与し、細胞死に影響を与えることが示された。血管損傷後の修復過程では Gipe の発現により新生内膜形成が制御されていることが示唆された。