

血管新生と細胞内情報伝達 - Akt/eNOS signalingの役割 -

暮石 泰子 中野 昶

要 旨：血管新生を誘導する刺激因子は、血管形成の「芽」となる内皮前駆細胞あるいは内皮細胞を刺激し、主に蛋白質リン酸化反応に制御される細胞内情報伝達系を活性化する。Aktは、これらの細胞外刺激によりPI3K依存性に活性化されるセリン・スレオニンキナーゼであり、血管内皮細胞では、PI3K-Akt経路の活性化とそれに続くeNOS活性上昇・NO産生増加を引き起こし、血管新生を誘導する。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003; 43: 591-594)

Key words: Akt, Angiogenesis, Endothelial cell

はじめに

VEGF, bFGFに代表される血管新生を誘導する因子は、血管形成の「芽」となる内皮前駆細胞あるいは内皮細胞を刺激し、主に蛋白質リン酸化反応に制御される細胞内情報伝達系を活性化する。プロテインキナーゼAktは、これらの細胞外刺激によりPI3K依存性に活性化されるセリン・スレオニンキナーゼであり、多くの細胞種において細胞増殖・糖代謝・蛋白合成などさまざまな細胞機能を制御することが知られ、血管内皮細胞では、VEGF, Angiopoietin-1, Sphingosine-1-phosphateなどのサイトカインにより、PI3K-Akt経路の活性化とそれに続くeNOS活性上昇・NO産生増加を引き起こし、血管新生を誘導する。

PI3K-Akt-eNOS活性化機構と血管新生

Aktは各種の増殖因子やサイトカインによってPI3K依存性リン酸化酵素(PI3K)依存性に活性化されるセリン・スレオニンキナーゼであり、多くの細胞種において生存促進因子として機能するが、それ以外にも細胞増殖・細胞分化・糖代謝など、様々な細胞機能を制御することが知られている(Fig. 1)。VEGFが血管新生作用を示すこと、VEGFによりAktが活性化されることから、Akt活性化と血管新生作用の関連が検討され、VEGFはPI3Kを介してAkt-eNOS経路を活性化し、NO産生を増加させること、またAktの活性化が生存促進に

必要十分であること、内皮由来NOは血管新生に必要であることが動物実験などから示されている。

eNOS活性化機構とNOの血管新生促進作用

eNOSの活性化は、そのスレオニン残基(Thr495)とセリン残基(Ser1177)のリン酸化により生じるが、このリン酸化酵素としては、Akt/PKBキナーゼ、Aキナーゼ、AMPキナーゼ、Cキナーゼなどが知られ、これらは互いに協調してeNOSの活性制御を司る。すなわち、これらのリン酸化酵素の活性化剤は、eNOSの活性化を介して血管新生を促進する可能性が期待される。eNOSの活性化の結果産生されるのがNOである。このNOがいかなる機序により血管新生を制御するかの詳細は未だ明らかではないが、細胞遊走促進(podokinesis)・細胞死抑制(各アポトーシス関連蛋白のニトロシル化、Akt活性化など): 内皮細胞を「健やかに」保つ様々な効果を有することが報告されている。

スタチンによる内皮NO産生増加機序 1: スタチンによるeNOS発現量の増加

コレステロール合成経路の律速酵素HMG-CoA reductaseの阻害により血清コレステロール低下作用を示すスタチン系の薬剤は、その本来の作用以外の機序: 内皮由来のNOの産生増加: による心血管保護作用を有することが大規模臨床試験によって証明されている^{1,2)}。

スタチンによるNO産生量増加のメカニズムはeNOS

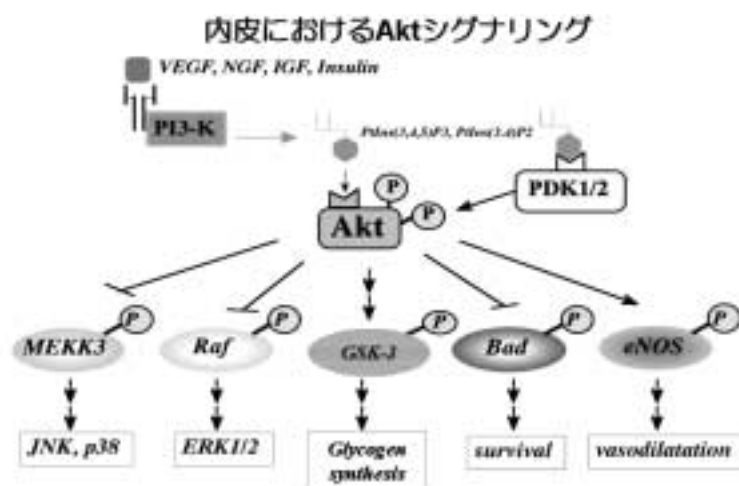


Figure 1 PI3K-Akt-eNOS activation pathway and angiogenesis.

Akt is a serine/threonine protein kinase that is activated by a number of growth factors and cytokines in a phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)-dependent manner, which regulates various cellular responses like cell survival, proliferation, differentiation, and glucose metabolism.

発現量の増加が示唆されてきた。すなわち、HMG-CoA reductaseの阻害→下流のコレステロール系代謝産物合成阻害→低分子量G蛋白質Rhoの脂質修飾 (prenylation) 減少→eNOS mRNA分解量抑制→eNOS発現量増加の機序という機序が考えられている³⁾ (Fig. 2)。また、興味深いことに、ラット脳梗塞モデル⁴⁾あるいは心筋梗塞モデル⁶⁾に対してスタチンを投与した群では、梗塞巣の減少とその梗塞部位周囲組織におけるeNOS発現量の増加が認められたという。しかしながら、この梗塞巣減少と同部位における血管新生・側副血行路変化などとの相関に関しては未だ報告がなく、このeNOS発現増加作用と血管新生効果の有無は不明のままであり今後の検討が待たれる。

スタチンによる内皮NO産生増加機序 1： PI3K-Akt-eNOS経路活性化

われわれはこのスタチンによるNO産生増加にPI3K-Akt-eNOS経路活性化が関与するか否かを検討を行った。培養血管内皮細胞において、スタチンはPI3K依存性にAktを活性化し、これによるeNOSのリン酸化とNO放出量増加を促進した。また興味深いことに、この効果は培養血管内皮細胞特異的であることがわかった。

このスタチンによるPI3K-Akt-eNOS経路活性化が血管新生作用をもたらすか否かを検討するために、スタチンの血清除去による内皮細胞アポトーシスに対する影響や、内皮細胞の二次元血管形成能に対する影響を検討した。スタチンは血清除去による内皮細胞アポトー

シスを抑制したり、内皮細胞の二次元血管形成能を促進した⁵⁾。より生理的な条件での血管新生効果を検討するために、正常コレステロールウサギ下肢虚血モデルに対するスタチンの局所血管新生作用を解析した。スタチンは虚血部位の毛細血管数を増加させ、血流量を増加する効果を示した。これらの結果から、スタチンは血管内皮におけるPI3K-Akt-eNOS経路の活性化により血管新生を促進することが示唆された。最近、このスタチンによるAkt活性化の分子機序の一つとして、細胞膜カベオラの機能制御蛋白カベオリン-1によるeNOS活性の脱抑制と、それに続くeNOS-Hsp90およびAkt-eNOSの会合促進・活性化の関与が報告されている (Fig. 3)。

スタチンによる血管新生作用： その功罪としての癌への影響に関する考察

スタチンは分化・成熟した内皮細胞に対して血管新生作用を示したばかりでなく、内皮前駆細胞の流血中への動員を促し、その遊走能・血管新生能を促進することが示された^{8,9)}。すなわち、新生血管を樹木にたとえるなら、スタチンは、すでに伸び始めた「枝」 (=内皮細胞) の成長 (=血管新生) を促す効果のみならず、その木の「種」 (=内皮前駆細胞) の数を増やし、かつその「発芽」 (=血管細胞への分化) を促す効果をも有することが示されたわけである。試験管内の結果では、最も強力な血管新生促進物質の一つであるVEGFの効果には及ばないまでも、このスタチンの血管新生作用は安定型

狭心症を有する患者群においても認められる可能性が示唆された¹⁰⁾。

それでは、このスタチンの血管新生作用は、癌血管に対しても同様であるのか、あるいは、この効果の功罪としてスタチンには発ガン作用があるのかどうかという疑問が生ずる。

この問いかけに関する答えとなるべきいくつかの報告がなされてきた。動物実験でのデータでは、癌細胞を移植したマウスに対するスタチン投与の効果を検討したもの¹¹⁾や、スタチン投与患者におけるメタアナリシスでのデータ¹²⁾などがそれであるが、いずれの報告においても、スタチンはガンの生育・癌血管新生には影響しないことが示唆されている。

細胞実験の結果を考慮しつつこれらの報告から推察できるのは、スタチンは、それ自体が発ガン作用は有しない可能性が高いこと、また、虚血などに対する代償的・生理的範囲内の「弱い」血管新生に対しては補助的・促進作用を示しうること、逆に、癌組織という病的な増殖力・大量のサイトカイン分泌を惹起しうる組織自体のもつ血管新生作用に対しては、スタチンの血管新生作用は明らかにそれを下回る弱いものであるために、腫瘍血管形成に対してはスタチンの作用は補助的効果となるには不十分である可能性が類推される。いずれにせよ今後のさらなる研究の成果が待たれる。

今後の展望

遺伝子治療、細胞移植、幹細胞による人工血管形成など、最新の技術による血管の再生治療が注目を集める一方で、古典的ではあるが、より非侵襲的・簡便・ローコストである点から継続性・予防的投与が期待で

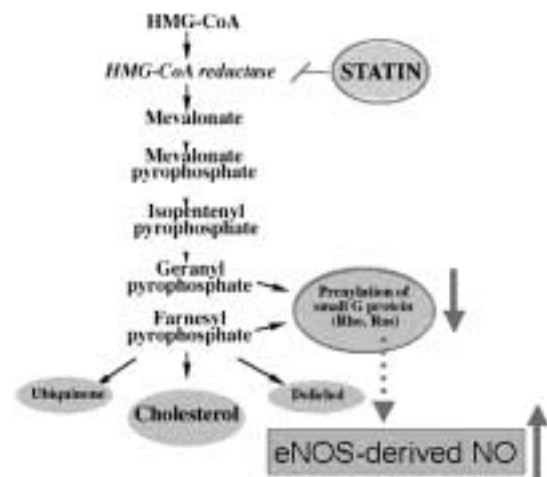


Figure 2 Mechanism of Statin-mediated Increase In NO Production. Inhibition of HMG-CoA reductase by statin results in decrease in the extent of lipid metabolites of cholesterol pathway, leading to reduction of lipid modification (prenylation) of cellular signal mediators like small G protein Rho. Reduced lipid modification decrease RhoA activity, which inhibits degradation of eNOS mRNA leading to increase in eNOS expression.

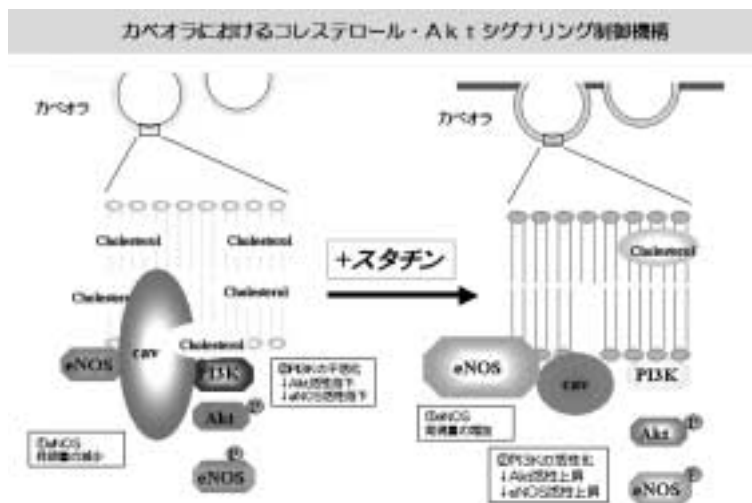


Figure 3 Cholesterol dependent PI3K-Akt-eNOS activation pathway in endothelium. One possible molecular mechanism of statin-mediated Akt activation is regulation by Caveolin-1, regulatory molecule in caveolin located in cell membrane. In caveolin, caveolin-1 inactivates both PI3K and eNOS activity in a membrane-cholesterol dependent manner. Once cholesterol depletion occurs by statin, this caveolin-1/cholesterol-dependent inhibition could be released, which result in activation of PI3K/Akt/eNOS pathway.

きる薬物療法による血管新生誘導も、忘れてはならない重要な血管再生治療の選択肢である。この方法のように、治療を施行する側のみならず受ける側にとっても負担が少ないということは、何より治療の継続・成功率の亢進に寄与する重要な一因かもしれない。本稿に上述したように、スタチンがかく言う「夢の新薬」であることを期待し、また、各種遺伝子療法、細胞療法との併用の開発が薬物による血管新生療法のもう一つの鍵になるであろう。

文 献

- 1) Vaughan CJ: Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet*, 1996, **348**: 1079-1082.
- 2) Scandinavian Simvastatin Survival Study Group: Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*, 1994, **344**: 1383-1389.
- 3) Endres M, Laufs U, Huang Z et al: Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, **95**: 8880-8885.
- 4) Amin-Hanjani S, Stagliano NE, Yamada M et al.: Mevastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduces stroke damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in mice. *Stroke*, 2001, **32**: 980-986.
- 5) Kureishi Y et al: The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med*, 2000, **6**: 1004-1010.
- 6) Lefer AM, Campbell B, Shin YK, et al: Simvastatin preserves the ischemic-reperfused myocardium in normocholesterolemic rat hearts. *Circulation*, 1999, **100**: 178-184.
- 7) Brouet A, Sonveaux P, Dessy C et al: Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins. *Circ Res*, 2001, **89**: 866-873.
- 8) Levadot J, Murasawa S, Kureishi Y et al: HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*, 2001, **108**: 399-405.
- 9) Dimmeler S, Aicher A, Vasa M et al: HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*, 2001, **108**: 391-397.
- 10) Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A et al: Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*, 2001, **103**: 2885-2890.
- 11) Sata M, Nishimatsu H, Suzuki E et al: Endothelial nitric oxide synthase is essential for the HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin to promote collateral growth in response to ischemia. *FASEB J*, 2001, **15**: 2530-2532.
- 12) Bjerre LM, LeLorier J: Do statins cause cancer? A meta-analysis of large randomized clinical trials. *Am J Med*, 2001, **110**: 716-723.

Angiogenesis and Intracellular Signaling: Role of Akt-eNOS Signaling

Yasuko Kureishi, Takeshi Nakano

First Department of Internal Medicine, Mie University School of Medicine

Key words: Akt, Angiogenesis, Endothelial cell

Akt is a serine/threonine protein kinase that is activated by a number of growth factors and cytokines in a phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)-dependent manner. In endothelium, PI3K-Akt signaling axis is activated by a variety of stimuli and regulates multiple critical steps in angiogenesis, including endothelial cell survival, migration, and capillary-like structure formation. Furthermore, this signaling pathway also regulates cardiovascular homeostasis and vessel integrity at least in part by controlling NO synthesis. Statins are widely prescribed for the treatment of hypercholesterolemia, moreover, several clinical trials have demonstrated that statins are effective for both primary and secondary prevention of coronary artery diseases independent of their serum lipid-lowering effects, possibly through NO-dependent mechanisms due to the activation of eNOS in vascular endothelium. Here we show that a link between statins and Akt. Statins has been shown to rapidly promote the activation of Akt in endothelial cells leading to eNOS phosphorylation and increased NO production. statin have been shown to protect endothelial cells from serum deprivation-induced apoptosis and promote capillary-like structure formation on matrigel in an Akt-dependent manner. Clinically-relevant doses of statins enhances angiogenesis in the ischemic hindlimbs of normocholesterolemic animals through an eNOS-dependent mechanism.

(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003; **43**: 591-594)