

論文の内容の要旨

論文題目 血管平滑筋細胞におけるトロンビンの生理作用と
その情報伝達機構の解析

氏名 諫田 泰成

[序論]

動脈硬化症の血管病変は、血管内皮細胞の傷害後に、血管平滑筋細胞が正常の収縮型から合成型に形質転換を起こして中膜から内膜へ遊走し、さらに病巣内で増殖することにより、形成されると考えられる。また、バルーンを用いた血行再建手術である経皮経管的冠動脈形成術（PTCA）を行った後には、血管平滑筋細胞の増殖による再狭窄が誘発されることが多く、術後の最重要課題である。

実験動物を用いてバルーンで傷害を起こした場合、上述の狭窄性病変を再現することができる。トロンビン阻害剤であるヒルジンの静脈内注射によって、このバルーンによる再狭窄が抑制できることから、狭窄性病変の形成にトロンビンが重要な役割を担っていることが考えられている。従って、トロンビン刺激による血管平滑筋細胞の増殖機構のメカニズムを明らかにすることは、動脈硬化症の進展や PTCA 後の再狭窄を理解し、また臨床レベルでの応用や新しい治療薬のターゲットを考える上においても非常に重要である。

本研究では、合成型の血管平滑筋細胞株であるラット A10 細胞をモデルとして、トロンビン刺激によるシグナル伝達経路と細胞増殖機構について解析を行った。

1. トロンビン刺激による p38MAPK の活性化

p38MAPK は、MAPK ファミリーに属するセリンスレオニンキナーゼであり、ストレスや炎症によって活性化されるキナーゼとして同定された。しかしながら、その生理的な役割は、あまりよく分かっていない。我々は、動脈硬化症は血管に対する一種の炎症ではないかと仮定し、両者の関連について検討するために、まず、トロンビンによる p38MAPK の酵素活性の変動について検討した。

トロンビンで A10 細胞を刺激することにより、p38MAPK の用量、時間依存的な活性化が観察され、1 U/ml、10 分刺激で最大となった。この活性化は、トロンビン阻害剤ヒルジンの前処理によって消失したことから、トロンビンを介した活性化であることが示唆された。

次に、G 蛋白質共役型受容体であるトロンビン受容体を介したシグナルについて解析を行った。最近、G 蛋白質を介したシグナルとチロシンキナーゼ系のシグナルの相互作用が明らかにされつつあるので、チロシンキナーゼの関与について検討した。チロシンキナーゼの選択的な阻害剤であるゲニスタインは、濃度依存的に、トロンビン刺激による p38MAPK の活性化を抑制した。従って、トロンビン刺激により、チロシンキナーゼを介して、p38MAPK の活性化がもたらされることが示唆された。また、Ras の欠失変異体を発現させた場合、p38MAPK の活性化が抑制されたことから、他の MAPK と同様に Ras を介して活性化されると考えられた。

以上より、血管平滑筋細胞において、トロンビン受容体の刺激により、チロシンキナーゼ、Ras を介して、p38MAPK が活性化されることが明らかになった。

2. トロンビン刺激による p38MAPK の活性化におけるチロシンキナーゼの解析

チロシンキナーゼ阻害剤であるゲニスタインを用いた実験から、トロンビン刺激による p38MAPK の活性化に、何らかのチロシンキナーゼが重要な役割を担っていることが推定された。そこで、そのチロシンキナーゼとして、上皮増殖因子受容体 (EGFR) キナーゼと Src について、さらに解析を行った。

トロンビン刺激により、EGFR のリン酸化の亢進が認められた。選択的な EGFR キナーゼ阻害剤である AG1478 の前処理により、トロンビン刺激による p38MAPK の活性化が抑制された。一方、血小板由来増殖因子で刺激した場合、p38MAPK は活性化されたが、AG1478 は影響を与えなかった。従って、トロンビン刺激による

p38MAPK の活性化には EGFR の共役型活性化が関与していることが示唆された。

トロンビン受容体は、Gi、Gq、G12 と共役していることがすでに報告されていることから、トロンビン受容体と共役する三量体 G 蛋白質のサブタイプについて解析を行った。百日咳毒素は、Gi の ADP リボシル化によりその受容体との共役を選択的に阻害することが知られている。細胞を百日咳毒素を用いて処理した場合、トロンビン刺激による EGFR のリン酸化は抑制されなかったが、リゾホスファチジン酸刺激による EGFR のリン酸化は抑制された。従って、トロンビン刺激による EGFR の活性化は、Gi 以外の G 蛋白質の関与が考えられた。恒常的活性化変異体である Gαq (GqQ209L) あるいは Gα12 (G12Q226L) を発現させた結果、EGFR のリン酸化の亢進が認められた。従って、トロンビン刺激により、Gq または G12 のαサブユニットを介して、EGFR が活性化されることが示唆された。

次に、トロンビン刺激による EGFR の活性化のメカニズムについて検討した。トロンビン刺激により、Src のリン酸化が亢進されること、および、Src の選択的な阻害剤である PP2 処理により、トロンビン刺激による EGFR の活性化が抑制されたことから、トロンビン刺激による EGFR のリン酸化の亢進は、Src を介している可能性が考えられた。恒常的活性化変異体の Src (SrcY529F) の発現により、EGFR のリン酸化の亢進が認められたことから、EGFR は Src の下流に存在することが確かめられた。また、GqQ209L あるいは G12Q226L の発現により、Src のリン酸化の亢進が認められたことから、少なくとも、Gq または Gα12 のαサブユニットを介して、Src - EGFR のシグナル伝達経路が活性化される可能性が考えられた。

以上から、血管平滑筋細胞において、トロンビン刺激により、Gq あるいは G12、Src、EGFR を介して、p38MAPK の活性化が引き起こされることが明らかとなった。

3. トロンビン刺激による糖の取込および細胞増殖における Src-p38MAPK の解析

トロンビン受容体の下流に、Src - EGFR - p38MAPK のシグナル伝達経路が存在することが明らかとなったので、さらに、この経路の細胞応答における役割について解析を行った。血管平滑筋細胞は、様々な細胞応答を誘導するが、動脈硬化症の進展の観点から、細胞増殖に着目して検討した。

トロンビン刺激による細胞増殖に対して、上述の Src 阻害剤である PP2 の効果について検討した結果、PP2 はトロンビン刺激によるチミジンの取り込みを抑制した。また、p38MAPK の選択的な阻害剤である SB203580 も、トロンビン刺激によるチ

ミジンの取り込みを抑制した。従って、Src - p38MAPK のシグナル伝達経路は、トロンビン刺激による細胞増殖に関与することが明らかになった。

また、糖尿病患者は、動脈硬化の発症率が有意に増加することが報告されていることから、糖代謝との関連について検討した。トロンビン刺激により、濃度依存的に糖の取り込みの亢進が認められた。この糖の取り込みは、百日咳毒素では抑制されなかったことから、Gi 以外の G 蛋白質の関与が示唆された。次に、チロシンキナーゼの関与について検討した。Src の阻害剤 PP2 によって、トロンビン刺激による糖の取り込みは抑制されたが、一方、インスリン刺激による糖の取り込みは、PP2 では抑制されなかった。Gαq の活性化を誘導する *Pasteurella multocida* Toxin を添加した場合、糖の取り込みは亢進し、その取り込みは PP2 で抑制された。この結果から、トロンビン刺激により、少なくとも Gαq、Src を介して糖の取り込みが促進されることが示唆され、インスリンとは異なった機構による可能性が考えられた。

さらに、Src の下流として、MAPK ファミリーである p38MAPK と ERK について検討した。p38MAPK の選択的阻害剤である SB203580 は、トロンビン刺激による糖の取り込みを抑制したが、p38MAPK 活性を阻害しない構造類似化合物 SB202474 は抑制しなかった。一方、ERK を活性化するキナーゼの MEK を選択的に阻害する PD98059 あるいは U0126 は、影響を与えなかった。従って、トロンビン刺激による糖の取り込みには、p38MAPK は関与するが、ERK は関与しないことが示唆された。

以上の結果から、トロンビン刺激による細胞増殖および糖の取り込みは、Src - p38MAPK を介することが明らかとなった。

[総括]

血管平滑筋細胞を用いて、トロンビン刺激によるシグナル伝達経路の解析を行った。トロンビン刺激により、Src あるいは EGFR を介して p38MAPK の活性化が誘導されることを明らかにした。また、この経路の生理的な役割としては、細胞増殖および糖の取り込みに関与している可能性が考えられた。本研究において、トロンビン刺激による血管平滑筋細胞の増殖および糖の取り込みの機構の一端を明らかにした。増殖因子による血管平滑筋細胞の細胞応答は、動脈硬化症の進展の重要なステップの一つであり、本研究は、動脈硬化症の治療のターゲットを考える上でも重要な示唆を与えるものと考えている。