

審査の結果の要旨

氏名 諫 田 泰 成

動脈硬化症の血管病変は、血管平滑筋細胞が収縮型から合成型に形質転換を起こして増殖することにより進展する。この狭窄性病変の形成において重要な役割を果たすものに、血液凝固系に介在するセリンプロテアーゼのトロンビンがある。しかしながら、トロンビン阻害剤は出血による副作用を有するため、臨床での動脈硬化症の治療や再狭窄の予防に用いる事は出来ず、新たな薬剤の標的分子を探索する上でも、トロンビンのより詳細な作用機構の解明が期待されている。「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」と題する本論文においては、合成型の血管平滑筋細胞株であるラット A10 細胞をモデル系として、トロンビン刺激が、チロシンキナーゼの Src を介して、p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) の活性化を引き起こすことを見出している。さらに、生理作用におけるこの細胞内情報伝達経路の意義について解析を進め、トロンビンが細胞増殖に加えて糖代謝の調節にも関与することを明らかにしている。

1. トロンビンによる p38 MAPK の活性化機構の解析

先ず本論文では、トロンビン刺激による p38 MAPK の活性変動について検討し、トロンビン刺激によって、p38 MAPK が用量、時間に依存して活性化されることを示した。百日咳毒素を用いた解析から、トロンビン刺激による p38MAPK 活性化は、三量体 G タンパク質である G_i 以外の G タンパク質の関与が考えられた。また、この活性化はチロシンキナーゼ選択的な阻害剤によって抑制されたことから、トロンビン刺激による p38 MAPK の活性化はチロシンキナーゼを介することが考えられた。各種キナーゼ阻害剤を用いた薬理学的な検討によって、トロンビン刺激による p38 MAPK の活性化に、上皮増殖因子(EGF)受容体キナーゼとチロシンキナーゼの Src が関与していることを示した。さらに、恒常的活性化変異体である G_q 、 G_{12} の α サブユニット、あるいは Src を発現させることにより、トロンビン刺激の情報伝

達経路が再現されることを確認した。以上の結果から、トロンビン刺激は、 G_q または G_{12} の α サブユニット、さらに Src、EGF 受容体を介して p38 MAPK の活性化を誘導することが明らかにされた。

2. トロンビンによる Src を介した p38 MAPK 経路の生理的役割の解析

次に、トロンビンの生理作用における Src を介した p38 MAPK 経路の意義について解析した。トロンビン刺激によるチミジンの取込の亢進は、Src または p38 MAPK の阻害剤によって抑制されたことから、Src-p38MAPK 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示された。また、糖尿病患者は動脈硬化症の発症率の増加や進展が認められることから、糖代謝との関連についても検討を行った。トロンビン刺激により、濃度依存的に糖の取込が上昇することを見出した。阻害剤を用いた実験から、トロンビン刺激による糖の取込は、Src-p38 MAPK を介することが示された。一方、インスリン刺激による糖の取込は Src の阻害剤によって抑制されなかった。さらに、糖の輸送体の一つである GLUT-4 の膜移行はインスリンで促進されたが、トロンビン刺激による糖取込みの促進には、GLUT-4 の膜移行の関与は認められなかった。以上の結果より、トロンビンとインスリンは異なる機構に介して糖代謝を調節していることが考えられた。

以上を要するに、本研究は、血管平滑筋細胞を用いて、トロンビンによる細胞内情報伝達経路と生理応答を解析し、トロンビン刺激によって Src および EGF 受容体を介して p38 MAPK が活性化されることを、さらに、この経路の生理的な役割として、細胞増殖および糖の取込に関与することを明らかにしている。特に、トロンビンによる糖代謝の制御は、インスリンとは異なる新たな調節機構によることを初めて指摘している。以上の知見は、トロンビンによる動脈硬化症の進展の解明に有益な情報を提供するだけでなく、動脈硬化症の臨床応用や治療の標的を考える上でも重要な手がかりを与えており、博士（薬学）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。