

学 位 論 文 題 名

Threshold-Dependent DNA Synthesis
by Pure Pressure in Human Aortic Smooth
Muscle Cells: Gi α -Dependent
and -Independent Pathways

(ヒト大動脈平滑筋細胞における純粋加圧ストレスによる DNA 合成亢進)

学位論文内容の要旨

血流や血圧による血行力学的機械ストレスは動脈硬化や高血圧の発症機序に重要な関わりを持っている。この機械ストレスは主にずり応力、伸展刺激、純粋圧ストレスなどに分けられ、血管壁を構築する血管内皮細胞や血管平滑筋細胞に対して持続的に作用している。近年、ずり応力について多くの研究がなされ、血管内皮細胞の形態や機能に深く影響していることが解明されてきた。しかし、血管平滑筋細胞は直接には血流の影響を受けていないため、ずり応力の影響は受けていないと考えられる。さらにずり応力や伸展刺激は、細胞形態や細胞骨格の変化による影響が加味されており、細胞に対する直接の機械ストレスだけを反映していない。

そこで今回我々は、ずり応力や伸展刺激とは異なる、圧力にのみ反応する機械受容体が存在するとの仮説を立て、ヒト大動脈平滑筋細胞における大気圧ストレスの効果を検討する目的で、独自に圧負荷装置を考案した。これを用い、大気圧として 100、120、140、160、180、200、240mmHg の各段階の大気圧を一定時間負荷し、それぞれの加圧値でのヒト大動脈平滑筋細胞の DNA 合成を、細胞核内への [^3H] チミジン取り込みにより検討した。加圧負荷せずに同じ条件下で培養した細胞をコントロール群とし、この測定値に対する増加率を比較検討した。その結果、大気圧値 140mmHg 以上の加圧によりヒト大動脈平滑筋細胞の DNA 合成は、 $14 \pm 6\%$ と有意に増加した。140 から 180mmHg 加圧までは圧依存性に増加し、180mmHg の加圧により最大 $49 \pm 6\%$ まで増加した。しかし、120mmHg 以下の加圧では有意な変化を認めなかった。

さらにこの純粋加圧ストレスに反応する細胞内情報伝達経路について検討を行った。細胞増殖に深く関わりとされる extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK) 及び p38 の活性化に対する特異的なポロクローナル抗体を用い、様々な圧値の加圧ストレスをかけたヒト大動脈平滑筋細胞で、これらのリン酸化された酵素群がどのような変化を示すか、Western-blotting 法を用い検討した。まず ERK 1 (p44) は、コントロールに比し、160mmHg 以上の加圧から最大圧 240mmHg まで圧依存性に最大 63.2

±12.1%まで活性化されたが、ERK 2 (p42)については、120mmHg 以上の加圧から有意に活性化され、180mmHg の加圧で最大値 $49.5 \pm 7.3\%$ になったが、それ以上の加圧では圧依存性には活性化されなかった。JNK については、ERK 1 と同様に 160mmHg 以上の加圧により、最大圧 240mmHg まで圧依存性に最大 $45.7 \pm 6.9\%$ まで活性化された。しかし、p38 については、どの圧値においても加圧による有意な活性化は認められなかった。また、今回の純粋加圧ストレスに反応する機械受容体の特性を検討するため抑制性 GTP 結合蛋白質 $G\alpha$ サブユニット ($G_i\alpha$) を特異的に ADP-リボシル化し受容体と $G_i\alpha$ を uncoupling する百日咳毒素を用いて同様の実験を行った。160mmHg、180mmHg の加圧負荷では、DNA 合成は同様な亢進を示し、百日咳毒素を添加しない群に比較して有意な変化を示さなかった。しかし、200mmHg 以上の加圧負荷では、百日咳毒素非添加群においては $18.0 \pm 1.4\%$ の増加率に対して、百日咳毒素添加群においては増加率 $2.3 \pm 2.9\%$ と、加圧ストレスによる DNA 合成の増加は有意に抑制された。つまり、ヒト大動脈平滑筋細胞においては純粋加圧ストレスに反応して細胞増殖を促進する機械受容体には、 $G_i\alpha$ 依存性と非依存性の細胞内情報伝達経路が共役し、加圧値によって活性化される細胞内情報伝達経路の優位性が異なることが示された。さらに ERK や JNK についても、加圧値による活性化の優位性ととも活性化する加圧閾値がそれぞれ異なることが示され、純粋加圧ストレスにより活性化される経路には加圧閾値の異なる複数の細胞内情報伝達経路が存在していることが示唆された。

今回、我々は、ヒト大動脈平滑筋細胞において純粋加圧ストレスに特異的に反応して DNA 合成を促進する細胞内スイッチが存在していることを明らかにし、そのスイッチが、大気圧値として 140mmHg を閾値として、オン・オフすることを示した。さらに、この純粋加圧ストレスに反応する機械受容体並びに細胞内情報伝達経路には、活性化の優位性と活性化する加圧閾値の異なる複数のメカニズムが存在していることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 葛 卷 暹
副 査 教 授 北 畠 顯
副 査 教 授 川 口 秀 明

学 位 論 文 題 名

Threshold-Dependent DNA Synthesis by Pure Pressure in Human Aortic Smooth Muscle Cells: Gi α -Dependent and -Independent Pathways

(ヒト大動脈平滑筋細胞における純粋加圧ストレスによる DNA 合成亢進)

血流や血圧による血行力学的機械ストレスは、動脈硬化や高血圧の発症機序に重要な関わりを持っている。この機械ストレスは主にずり応力、伸展刺激、純粋圧ストレスなどに分けられ、血管壁を構築する血管内皮細胞や血管平滑筋細胞に対して持続的に作用している。これらの刺激のうち純粋圧ストレスによる解析は少ない。本研究では、ヒト大動脈平滑筋細胞における大気圧ストレスの効果を検討できる圧負荷装置を考案し、圧力にのみ反応する機械受容体が存在するという仮説を検証した。まず各段階の大気圧を一定時間負荷し、それぞれの加圧値でのヒト大動脈平滑筋細胞の DNA 合成を検討した。この結果、大気圧値 140 から 180 mm Hg までの加圧によりヒト大動脈平滑筋細胞の DNA 合成は有意に増加した。さらに、純粋加圧ストレスに反応する細胞内情報伝達経路についての検討では、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1 は、160 mm Hg から 240 mm Hg まで圧依存性に活性化されたが、ERK2 については、120mmHg 以上の加圧から有意に活性化され 180mm Hg の加圧で最大値を取った。c-Jun N-terminal kinase (JNK)については、ERK1 と同様に 160 mmHg から 240 mm Hg まで圧依存性に活性化された。しかし、p38 カイネースについては加圧による有意な活性化は認められなかった。次に、純粋加圧ストレスに反応する機械受容体の特性を検討するため、抑制性 GTP 結合蛋白質 G α サブユニット (Gi α) を特異的に ADP-リボシル化して受容体との共役を阻害する百日咳毒素を用いて抑制実験を行った。百日咳毒素は 180 mm Hg までの加圧負荷では有意な変化をおこさなかったのに対し、200 mmHg 以上の加圧負荷においては DNA 合成の増加を有意に抑制した。以上の結果から、1) ヒト大動脈平滑筋細胞には、純粋加圧ストレスに反応して細胞増殖を促進する機械受容体が存在する。2) 純粋加圧

ストレスにより活性化される細胞情報伝達経路には加圧閾値の異なる複数の経路が存在する。3) これらの経路の一つは、G α 非依存性と依存性の経路に分けられることが証明された。

審査に当たっては、副査北島教授より、1. 大動脈平滑筋細胞に DNA 合成やカイネース ERK 1、2 および JNK の変化を起こす純粋加圧ストレスの最低圧力に差があったことの意味について、2. 大動脈平滑筋細胞の細胞増殖に関与する細胞情報伝達系におよぼす圧力が収縮期圧に相当することの生理的意味について、3. 一定の圧力を越えると大動脈平滑筋細胞の DNA 合成の増加する割合が落ちる理由について、質問があった。申請者はこれらの質問に対して適確な回答をおこなった。さらに副査川口教授より、1. 大動脈平滑筋細胞における、ずり応力、伸展刺激と純粋加圧ストレス刺激に関与する細胞情報伝達系の異同について、2. 線維芽細胞など平滑筋細胞以外の細胞におよぼす純粋加圧ストレスの効果について、3. アンギオテンシン系など体液性因子の間接的関与がないかについて、4. 高血圧症や動脈硬化症との関連で、加圧ストレス刺激に関与する大動脈平滑筋細胞の情報伝達経路に複数あることの意味について、質問があった。発表者はこれらいずれの質問に対しても適切な回答をおこなった。また主査葛巻が、1. 大動脈平滑筋細胞におけるずり応力、伸展刺激に関与しているとの報告がある他のカイネースの関与について、2. G α と異なる 3 量体 G 蛋白質あるいは Rho など Ras G ファミリー蛋白質が関与している可能性について、3. 加圧ストレス刺激を受ける機械受容体の本態について、4. 高血圧症や動脈硬化症の病因をさらに解析するための実験系について、質問をおこなった。申請者はこれらいずれの質問に対しても適切に回答した。

この論文は、ヒト大動脈平滑筋細胞において純粋加圧ストレスに特異的に反応して DNA 合成を促進する機械受容体が存在していることを証明したことで高く評価される。今後、この研究を基礎として動脈硬化や高血圧症の発症機構が一層明らかになることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。