

# Serum-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Elastolytic Activity Through Tyrosine Kinase Intracellular Signalling

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小林, 順 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1511">http://hdl.handle.net/10271/1511</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 234号	学位授与年月日	平成 8年 3月 8日
氏名	小林 順		
論文題目	Serum-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Elastolytic Activity Through Tyrosine Kinase Intracellular Signalling (チロシンキナーゼ細胞内シグナルを介する血清誘導性血管平滑筋細胞エラスターゼ活性に関する研究)		

博士(医学) 小林 順

## 論文題目

Serum-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Elastolytic Activity Through Tyrosine Kinase Intracellular Signalling

(チロシンキナーゼ細胞内シグナルを介する血清誘導性血管平滑筋細胞エラスターゼ活性に関する研究)

## 論文の内容の要旨

〔背景〕 肺高血圧症の病理所見は、初期の内皮細胞障害と内膜弾性板の断片化、それに続く平滑筋細胞の内皮細胞下への移動と増殖を特徴としている。実験的肺高血圧症ラットにおいて、血管内皮細胞の障害に続く肺血管病変の進行は、肺血管組織の内因性エラスターゼ活性の高値と関連があることが報告されている。しかし、このエラスターゼの由来、及びその誘導の機序については不明である。

〔目的〕 我々は培養肺血管平滑筋細胞による *in vitro* エラスターゼ測定法を用い、平滑筋細胞によるエラスターゼ活性の誘導とそのメカニズムについて検討することを目的とした。

〔方法〕 エラスターゼ活性は培養肺血管平滑筋細胞に、 $[^3\text{H}]$  エラスチンを散布し、各種誘導因子（血清、各種成長因子及びサイトカイン）もしくは蛋白分解酵素阻害剤、プロテインキナーゼ阻害剤の存在下で、24時間培養後、可溶化した  $[^3\text{H}]$  エラスチンを測定した。実験経過中、平滑筋細胞への  $[^3\text{H}]$  エラスチンの癒着の程度とエラスターゼ活性との間に関連が見られ、癒着した不溶性  $[^3\text{H}]$  エラスチンを回収し、癒着の程度を定量した。

〔結果〕 内因性平滑筋細胞エラスターゼ活性は、血清により有為に誘導され、 $\alpha 1$  プロテアーゼ阻害剤により特異的阻害を受け、セリンプロテアーゼの性質を有していた。血管病変との関連が報告されている各種成長因子及びサイトカインは、エラスターゼ活性を誘導することができなかった。この血清因子は熱、及び酸で変性を受けやすく、そのエラスターゼ活性誘導能を失った。血清によるエラスターゼ活性誘導は、用量依存性でエラスチンの平滑筋細胞表面に存在するエラスチン結合タンパクとの癒着の程度と相関していた。さらにこのエラスターゼ活性は、チロシンキナーゼ阻害剤により特異的に阻害された。

〔考察〕 この血清因子は、平滑筋細胞表面に存在するエラスチン結合タンパクを介して平滑筋細胞の内因性エラスターゼを誘導させるものと思われた。

## 論文審査の結果の要旨

エラスチンは組織に弾力性をあたえるのに重要な役割を果たしている。エラスターゼ活性（エラスチン分解活性）と従来白血球のもの、肺泡マクロファージのものが比較的好く知られている。申請者らは肺の血管平滑筋細胞のエラスターゼ活性を取り上げた。

〔目的〕

肺の血管平滑筋細胞のエラスターゼはどのようなプロテアーゼか、その活性は誘導をうけるか、受けるとしてどのような因子によるのか、を明らかにする。

〔方法〕

培養肺血管平滑筋細胞を用い、トリチウム標識エラスチンの分解活性を測定することによって、エラスターゼ活性を求めた。種々の因子や阻害剤の存在下に培養して活性の変化を調べた。

## (結果)

血清 (FBS) は 1 % で 2 倍強の活性化を示したが、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IGF-1 などは有意の差を示さなかった。また、ホスホラミドン、E-64 によって阻害されないが、 $\alpha$ -1 プロテアーゼインヒビターによって強く阻害された。また、スタウロスポリン、H-89 によって阻害されず、genistein によって強く阻害された。エラスチンの本細胞への結合は血清によって活性と平行した変化を示したが、時間経過では活性の増加は結合の増加より遅れていた。また、エラスチンの結合とエラスターゼ活性はコンドロイチン硫酸によって阻害されたが、ヘパリン硫酸によって阻害されなかった。

## (考察)

本細胞のエラスターゼ活性を促進する因子が胎児血清にあることは確かだが、それが加熱 (100°C 10分) と酸処理で減弱することから、タンパク因子であることが考えられるが、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IGF-1 などは無効であった。また、プロテアーゼ阻害剤の実験からこのものはセリンプロテアーゼの一種であると考えられる。また、genistein が阻害することから、チロシンキナーゼ活性が関与していると思われる。A キナーゼ阻害剤、C キナーゼ阻害剤によっては阻害されなかった。スペキュレーションとして、血管病変進行時に平滑筋細胞が弾力繊維層を突き破って血管内皮直下に移動するものがあるとすれば、このエラスターゼ活性の増加は細胞移動にとって有利であり、コンドロイチン硫酸はその移動を抑制する効果をもつ。

以上の発表に際して、以下のような質疑を行った。

- 1) 用いた細胞の単離法
- 2) エラスターゼ活性の測り方
- 3)  $\alpha$ 1-プロテアーゼインヒビターについて
- 4) 基質の調製法
- 5) 試料のカウントに対する無細胞時のバックグラウンドは?
- 6) 測定試料の採取法
- 7) 種差と発生段階のどちらがより重要な因子か
- 8) 血清中誘導因子の本体について
- 9) 白血球エラスターゼとの相違について
- 10) エラスチンの減少はなぜ肺高血圧を生じるか
- 11) 大動脈瘤とエラスターゼ活性の関係はあるか
- 12) メカニズムから考えて治療への応用は?

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解していたので、本論文は博士 (医学) の学位に値する内容をもつと、審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 藤田 道也

副査 副学長 山崎 昇 副査 教授 吉見 輝也

副査 助教授 浦野 哲盟 副査 講師 上田 吉生