



Inhibitory mechanism of tranilast in human coronary artery smooth muscle cells proliferation, due to blockade of PDGF-BB-receptors

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 渡邊, 進士 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1612

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 335号	学位授与年月日	平成13年 2月23日
氏 名	渡 邊 進 士		
論文題目	Inhibitory mechanism of tranilast in human coronary artery smooth muscle cells proliferation, due to blockade of PDGF-BB-receptors (ヒト冠動脈平滑筋細胞におけるトラニラストの増殖抑制機構 : PDGF-BB の受容体結合阻害)		

博士(医学) 渡 邊 進 士

論文題目

Inhibitory mechanism of tranilast in human coronary artery smooth muscle cells proliferation, due to blockade of PDGF-BB-receptors

(ヒト冠動脈平滑筋細胞におけるトラニラストの増殖抑制機構：PDGF-BBの受容体結合阻害)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

我々は既に、抗アレルギー剤tranilastがphotochemically induced thrombosis (PIT)法を応用した実験的血管内膜肥厚モデルにおいて内膜肥厚を抑制することを報告している。

また、tranilastはヒトにおいても経皮的冠動脈形成術(PTCA)後あるいはアテレクトミー後の再狭窄予防効果が確認され、内膜肥厚に対する抑制効果が認められている。その抑制機構としては、血管中膜の平滑筋細胞の内膜への遊走を抑制するとともに、内膜での細胞増殖を抑えることが示唆されているが、その詳細は未だ不明である。そこで今回、tranilastの細胞増殖抑制作用の機構解明の一環として、培養ヒト冠動脈平滑筋細胞(CASMC)を用い、血管内膜肥厚の形成に重要な役割を演じていると考えられている血小板由来増殖因子(PDGF)により惹起される細胞内シグナル伝達におけるtranilastの効果を*in vitro*で検討した。

〔方法〕

①細胞増殖に対する効果

[³H]thymidine取込み試験および直接的な細胞計数により、PDGF-BB刺激による細胞増殖に対する効果を検討した。

②mitogen-activated protein kinase (MAPK)のリン酸化に対する効果

PDGF-BB刺激(5分間)によりリン酸化されたタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、Western blotting法を用い、リン酸化MAPK (p44/42)と特異的に結合するphospho-specific MAP kinase antibody®をprobeとして検出した。

③受容体チロシンリン酸化に対する効果

MAPKの検出と同様に、PDGF-BB刺激(1分間)によりリン酸化されたタンパク質をanti-phosphotyrosine antibodyをprobeとして検出し、anti-human PDGF β -receptor antibodyを用いたreprobingによりreceptor画分を同定した。

④受容体結合に対する効果(receptor binding assay)

細胞を48時間無血清培地で培養後、tranilastを添加し37℃で30分培養した後、4℃まで温度を下げbinding assayを実施した。 [¹²⁵I]PDGF-BBを添加後、4℃で2時間反応させた。細胞を洗浄後に1% Triton X-100及び10% glycerolを含む25mM HEPES溶液で受容体に結合した [¹²⁵I]PDGF-BBを遊離させ、 γ -カウンターで放射活性を測定した。また、受容体への親和性(K_d)及び最大結合量(B_{max})の算出は、Scatchard解析により行った。

〔結果〕

- ① PDGF-BBにより刺激されるDNA合成の促進および細胞数の増加を指標とした細胞増殖は、trnilastにより10～300 μ Mの範囲で濃度依存的に、かつ100及び300 μ Mでは有意に抑制された。(IC₅₀ 81.2と118.3 μ M)
- ② PDGF-BBにより刺激されるMAPKのリン酸化は、trnilastにより10～300 μ Mの範囲で濃度依存的に、かつ100及び300 μ Mでは有意に抑制された(IC₅₀ 203.4 μ M)。
- ③ PDGF-BBにより刺激されるPDGF-receptorに相当する180-kDa bandのチロシンリン酸化は、trnilastにより10～300 μ Mの範囲で濃度依存的に、かつ100及び300 μ Mでは有意に抑制された(IC₅₀ 149.6 μ M)。
- ④ trnilastは10～1000 μ Mの範囲で濃度依存的に細胞表面の受容体に対するPDGF-BBの特異的結合を阻害した(IC₅₀ 268.0 μ M)。また、Scatchard解析の結果、300 μ Mのtrnilastの前処理によりK_d($\approx$ 0.15nM)は変化させずにB_{max}を27.6から18.0fmol/10⁶cellsに低下させた。

〔考察〕

trnilastは、培養ヒトCASMCにおいて、PDGF-BBにより刺激される細胞内シグナル伝達(受容体チロシンの自己リン酸化とMAPKのリン酸化)を阻害した。trnilastは受容体結合実験においてK_dは変化させずにB_{max}を低下させたことから、細胞増殖抑制機構として、細胞膜表面の受容体においてPDGF-BBの結合を非競合的に阻害している可能性が考えられる。

〔結論〕

trnilastは、PDGF-BBと受容体との結合を非競合的に阻害することにより培養ヒトCASMCの増殖を抑制する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者らは既に発表された、抗アレルギー剤trnilastがphotochemically induced thrombosis (PIT)法を応用した実験的血管内膜肥厚モデルにおいての内膜肥厚を抑制するという現象の基礎的機構を明らかにするために以下の研究をおこなったものである。

〔はじめに〕

trnilastはヒトにおいても経皮的冠状動脈形成術(PTCA)後あるいはアテレクトミー後の再狭窄予防効果が確認され、内膜肥厚に対する抑制効果は種を通じてみられる。その抑制機構としては、これまで血管中膜の平滑筋細胞の内膜への遊走を抑制するとともに、内膜での細胞増殖を抑えることが示唆されているが、その詳細は未だ不明である。そこで今回、trnilastの細胞増殖抑制作用の機構解明の一環として、培養ヒト冠動脈平滑筋細胞(CASMC)を用い、血管内膜肥厚の形成に重要な役割を演じていると考えられている血小板由来増殖因子(PDGF)により惹起される細胞内シグナル伝達におけるtrnilastの効果をin vitroで検討した。

〔方法〕

申請者はまず、PDGF-BB刺激による細胞増殖におよぼす影響を³H]thymidine取込み試験および直接的

な細胞計数により調べ、その機構解明のために以下の諸点を検討した。

- 1) mitogen-activated protein kinase (MAPK) のリン酸化に対する効果 PDGF-BB 刺激(5分間)によりリン酸化されたタンパク質を SDS-PAGE により分離し、Western blotting 法を用い、リン酸化 MAPK (p44/42) と特異的に結合する抗体を probe として検出した。
- 2) 受容体チロシン リン酸化に対する効果
MAPK の検出と同様に、PDGF-BB 刺激(1分間)によりリン酸化されたタンパク質を anti-phosphotyrosine antibody を probe として検出し、anti-human PDGF β -receptor antibody を用いた reprobing により receptor 画分を同定した。
- 3) 受容体結合に対する効果 (receptor binding assay)
細胞を 48 時間無血清培地で培養後、tranilast を添加し 37℃ で 30 分培養した後、4℃ まで温度を下げ binding assay を実施した。 $[^{125}\text{I}]$ PDGF-BB を添加後、4℃ で 2 時間反応させた。細胞を洗浄後に 1% Triton X-100 及び 10% glycerol を含む 25mM HEPES 溶液で受容体に結合した $[^{125}\text{I}]$ PDGF-BB を遊離させ、 γ -カウンターで放射活性を測定した。また、受容体への親和性 (K_d) 及び最大結合量 ($B_{\max}$) の算出は、Scatchard 解析により行った。

〔結果〕

これらの結果として以下の新知見を得た。

- 1) PDGF-BB により刺激される DNA 合成の促進および細胞数の増加を指標とした細胞増殖は、tranilast により 10~300 μM の範囲で濃度依存的に、かつ 100 及び 300 μM では有意に抑制された (IC_{50} 81.2 と 118.3 μM)
- 2) PDGF-BB により刺激される MAPK のリン酸化は、tranilast により 10~300 μM の範囲で濃度依存的に、かつ 100 及び 300 μM では有意に抑制された (IC_{50} 203.4 μM)。
- 3) PDGF-BB により刺激される PDGF-receptor に相当する 180-kDa band のチロシンリン酸化は、tranilast により 10~300 μM の範囲で濃度依存的に、かつ 100 及び 300 μM では有意に抑制された (IC_{50} 149.6 μM)
- 4) tranilast は 10~1000 μM の範囲で濃度依存的に細胞表面の受容体に対する PDGF-BB の特異的結合を阻害した (IC_{50} 268.0 μM)。また、Scatchard 解析の結果、300 μM の tranilast の前処理により K_d ($\approx 0.15\text{nM}$) は変化させずに $B_{\max}$ を 27.6 から 18.0 fmol/ 10^6 cells に低下させた。

〔結論〕

申請者はこれらをまとめて、tranilast は、培養ヒト CSMC において、PDGF-BB により刺激される細胞内シグナル伝達(受容体チロシンの自己リン酸化と MAPK のリン酸化)を阻害したこと、受容体結合実験において K_d は変化させずに $B_{\max}$ を低下させたことから、この物質の細胞増殖抑制は、細胞膜表面の受容体において PDGF-BB の結合を非競合的に阻害することによるものと結論づけた。

以上の申請者の研究内容について審査委員会では以下のような質問および議論があった。

- 1) Tranilast はナンテンの葉の成分か、実の成分か
- 2) Tranilast の血管再狭窄予防効果が判明した歴史的経緯
- 3) ACE inhibitor や血小板凝集抑制剤などが意外にも二重盲検試験で再狭窄予防効果が証明されない理由
- 4) Photochemical reaction による血管狭窄モデルの病変はびまん性におこるのか

- 5) Tranilastの投与方法、血中消失半減期、体内動態について
- 6) PDGF受容体のアルファ型のホモダイマーでも作用するか、また、細胞によって異なるのか
- 7) 実験に用いた培養液組成とその特色について
- 8) FBS中のPDGF量はどのくらいか
- 9) 投与時期の決定は経験的に決めるのか
- 10) 他の受容体型チロシンキナーゼでも同様のことがおこるか
- 11) PDGFのノックアウトマウスで、血管病変あるいは反応に特徴はあるか
- 12) Tranilastの副作用はあるか

これらの質問に対し、申請者の解答は適切であり、問題点も十分に理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	梶	村	春	彦
	副査	大	橋	京	一
	副査	浦	野	哲	盟