



Roles of p38 MAP kinase for VEGF synthesis stimulated by TGF- β and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in aortic smooth muscle cells 1) Involvement of p38 MAP kinase in TGF- β -stimulated VEGF synthesis in aortic smooth muscle cells 2) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates vascular endothelial growth factor release in aortic smooth muscle cells: role of p38 mitogen-activated protein kinase

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2008-02-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山本, 拓巳 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/14958

氏名(本籍)	山本拓巳(岐阜県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第 1314号
学位授与日付	平成 14年 11月 20日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Roles of p38 MAP kinase for VEGF synthesis stimulated by TGF- β and 1,25-dihydroxyvitamin D ₃ in aortic smooth muscle cells 1) Involvement of p38 MAP kinase in TGF- β -stimulated VEGF synthesis in aortic smooth muscle cells 2) 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ stimulates vascular endothelial growth factor release in aortic smooth muscle cells: role of p38 mitogen-activated protein kinase
審査委員	(主査) 教授 土肥 修 司 (副査) 教授 廣 瀬 一 教授 小 澤 修

論文内容の要旨

血管内皮増殖因子(VEGF)は、腫瘍細胞より分泌される血管透過性亢進因子として発見された増殖因子で、血管内皮細胞の増殖を特異的に促進することが知られている。血管平滑筋細胞は動脈硬化症や高血圧症の発症・進展に重要な役割を果たしており、VEGFの主たる産生細胞である。本細胞において、低酸素や高血糖などの刺激でVEGFの発現が亢進することが知られている。最近、細胞膜受容体を介しその作用を発現するtransforming growth factor- β (TGF- β)が、血管平滑筋細胞においてVEGFの産生を促進すると報告されたが、その機序の詳細は明らかではない。一方、MAPキナーゼスーパーファミリーは重要な細胞内情報伝達系の一つであるが、血管平滑筋細胞におけるMAPキナーゼスーパーファミリーの役割は明らかでない。本研究は、血管平滑筋細胞においてTGF- β によるVEGF産生におけるMAPキナーゼスーパーファミリーの役割を検討し、さらに、ステロイドホルモンスーパーファミリーの一つであるvitamin D₃について同様の検討を行い、血管平滑筋細胞のVEGF産生とp38MAPキナーゼとの関連を明らかにした。

[材料および方法]

培養ラット血管平滑筋細胞(A10細胞)を直径35-mmディッシュ(1×10⁵個)および90-mmディッシュ(5×10⁵個)に播き、10%ウシ胎仔血清を含んだDMEM培地で培養した。その5日後に血清を含まない培養液に置換し、48時間後に実験を行った。培養細胞を各濃度のTGF- β とvitamin D₃で刺激し、培養液中のVEGFをELISAにて測定した。MAPキナーゼの検討はWestern blottingにて行った。

[結果]

- 1) A10細胞においてTGF- β が時間および用量依存性にVEGFの遊離を促進することを確認した。
- 2) TGF- β はMAPキナーゼスーパーファミリーの中でp42/p44MAPキナーゼとp38MAPキナーゼをリン酸化した。
- 3) p38MAPキナーゼ阻害薬(PD169316およびSB203580)は、TGF- β によるVEGFの遊離を用量依存性に抑制したが、p42/p44MAPキナーゼを活性化する上流のキナーゼ(MEK)の阻害薬(PD98059およびU0126)は、TGF- β によるVEGFの遊離に何ら影響を及ぼさなかった。
- 4) PD169316はTGF- β によるp38MAPキナーゼのリン酸化を抑制した。

- 5) 活性型vitamin D₃である1,25-dihydroxyvitamin D₃は時間および用量依存性にVEGFの遊離を促進した。一方、非活性型vitamin D₃には何らその作用は認められなかった。
- 6) 1,25-dihydroxyvitamin D₃はp38MAPキナーゼをリン酸化した。p38MAPキナーゼ阻害薬（PD169316およびSB203580）は1,25-dihydroxyvitamin D₃によるVEGFの遊離を用量依存性に抑制した。
- 7) PD169316は1,25-dihydroxyvitamin D₃によるp38MAPキナーゼのリン酸化を抑制した。

[考察]

TGF- β 刺激によって、MAPキナーゼスーパーファミリーのうちp42/p44MAPキナーゼとp38MAPキナーゼがリン酸化された。MAPキナーゼは特異的なMAPキナーゼキナーゼのリン酸化により活性化されるため、TGF- β はp42/p44MAPキナーゼとp38MAPキナーゼを活性化したと考えられた。p38MAPキナーゼ阻害薬によりVEGFの遊離が抑制された。一方、MEKの阻害薬はTGF- β によるVEGFの遊離に何ら影響を及ぼさなかった。以上より、TGF- β がVEGFの遊離を促進する作用機序にはp38MAPキナーゼの活性化が関与していると推測できた。血管平滑筋細胞におけるp38MAPキナーゼの活性化とVEGFの遊離との関連に着目して、受容体活性化様式の異なるvitamin D₃をアゴニストとして行った検討では、活性型vitamin D₃である1,25-dihydroxyvitamin D₃が用量依存性にVEGFの遊離を促進し、またp38MAPキナーゼをリン酸化することが観察された。p38MAPキナーゼ阻害薬によってこのVEGFの遊離は抑制されたという結果から、細胞膜受容体を介するTGF- β とステロイドホルモンスーパーファミリーに属する1,25-dihydroxyvitamin D₃のいずれもがVEGF遊離の作用機序として共通してp38MAPキナーゼの活性化を介することが明らかとなった。

[結論]

血管平滑筋細胞においてTGF- β と1,25-dihydroxyvitamin D₃はVEGFの遊離を促進した。その作用はp38MAPキナーゼの活性化を介している。細胞膜受容体を介するTGF- β とステロイドホルモンの一つである1,25-dihydroxyvitamin D₃のいずれもがp38MAPキナーゼという共通した経路を介することが明らかとなった。VEGFは血管内皮細胞の特異的増殖因子であることから、血管平滑筋細胞のp38MAPキナーゼの活性化が血管新生（angiogenesis）に深く関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 山本拓巳は、血管平滑筋細胞を用いて、TGF- β と1,25-dihydroxyvitamin D₃によるVEGFの遊離にp38MAPキナーゼが関与していることを明らかにした。本研究の成果は、血管平滑筋細胞におけるp38MAPキナーゼの役割を明らかとし、VEGFの遊離との関係を検討した初めての知見である。この知見は、総合病態・予防医学の進歩、特に血管再生の解明に寄与すると認められる。

[主論文公表誌]

- 1) Involvement of p38 MAP kinase in TGF- β -stimulated VEGF synthesis in aortic smooth muscle cells.
Journal of Cellular Biochemistry 2001 ; 82 : 591~598
- 2) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates vascular endothelial growth factor release in aortic smooth muscle cells: role of p38 mitogen-activated protein kinase.
Archives of Biochemistry and Biophysics 2002 ; 398 : 1~6