

氏名(本籍)	平出 耕石 (岐阜県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第 1379 号
学位授与日付	平成 15 年 5 月 21 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	Thrombin stimulates dissociation and induction of HSP27 via p38 MAPK in vascular smooth muscle cells
審査委員	(主査) 教授 小澤 修 (副査) 教授 藤原 久義 教授 岡野 幸雄

論文内容の要旨

トロンビンはセリンプロテアーゼのひとつであり、循環血漿中でプロトロンビンの分解によって生成する。トロンビンは凝固線溶系においてのみならず細胞の増殖・分化にも関与することが知られている。血管平滑筋細胞においては、トロンビンは収縮、細胞遊走および細胞増殖を刺激することが報告されている。さらに血管平滑筋細胞における細胞内情報伝達に関して、トロンビンはプロテインキナーゼC, MAPキナーゼスーパーファミリーおよび核転写因子の活性化を誘導することが報告されている。

細胞がストレスに曝露されると、一連のストレス蛋白質 (heat shock protein, HSP) が誘導されることが知られている。HSPはその分子量の大きさによって、高分子量HSPと低分子量HSPの2つのグループに分けられる。HSP90やHSP70などの高分子量HSPは、分子シャペロンとして生体防御機構において中心的役割を担うと考えられている。一方、HSP27は低分子量HSPのひとつであり、種々の組織や細胞、特に骨格筋細胞および平滑筋細胞において恒常的に発現していることが知られている。さらに非刺激細胞において、HSP27は500kD以上の重合型を形成していることが報告されている。しかし、HSP27の誘導のメカニズムおよびその役割は、十分明らかにされていない。

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ひとつである。p38 MAPキナーゼはMAPキナーゼ活性化プロテイン-2キナーゼを介してHSP27をリン酸化することが示されている。血管平滑筋細胞において、p38 MAPキナーゼがトロンビンによって活性化されることが報告されている。しかしながら、血管平滑筋細胞におけるp38 MAPキナーゼの正確な役割は未だ十分明らかにされていない。

本研究では、血管平滑筋細胞においてトロンビンのHSP70およびHSP27の誘導に対する作用、およびHSP27の解離に対する作用を検討した。

[材料および方法]

ラット大動脈由来血管平滑筋細胞株 (A10細胞) を直径35-mmディッシュ (1×10^5 個) および90-mmディッシュ (5×10^5 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トロンビンで刺激し、HSPの誘導をWestern blotting およびenzyme immunoassay (EIA) により解析した。HSP27のmRNAの発現はNorthern blotting により解析した。さらにp38 MAPキナーゼをWestern blottingにより解析した。またHSP27の解離をシヨ糖濃度勾配遠心法により解析した。

[結果]

- 1) トロンビンはHSP27の誘導を促進したが、HSP70に対しては何ら影響を及ぼさなかった。
- 2) トロンビンは時間および用量依存性にHSP27の誘導を促進した。

- 3) トロンビンは時間依存性にp38 MAPキナーゼをリン酸化した。
- 4) p38 MAPキナーゼ阻害剤であるSB203580およびPD169316はトロンビンによるHSP27の誘導を抑制した。
- 5) SB203580およびPD169316はトロンビンによるp38 MAPキナーゼのリン酸化を抑制した。
- 6) トロンビンは重合型HSP27から解離型HSP27への移行を促進した。SB203580はその解離を抑制した。
- 7) トロンビンはHSP27をリン酸化した。そのリン酸化はSB203580により抑制された。

[結論]

血管平滑筋細胞において、トロンビンはp38 MAPキナーゼの活性化を介してHSP27の解離とHSP27の誘導の両者を促進することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 平出耕石は、血管平滑筋細胞を用いて、トロンビンによるHSP27の解離および誘導にp38 MAPキナーゼが関与することを明らかにした。この新知見は、血管の生体防御機構の解明に寄与するものと認められる。

[主論文公表誌]

Thrombin stimulates dissociation and induction of HSP27 via p38 MAPK in vascular smooth muscle cells.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 283, H941-H948 (2002).