The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	血管平滑筋細胞における血小板由来増殖因子の情報伝達と細胞接着性の関連
Author(s)	藤尾, 慈
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38952
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【 3 】

氏　　名	藤（ふじ）　尾（お）　慈（やすし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11047　号
学位授与年月日	平成6年2月1日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科　生理系専攻
学位論文名	**血管平滑筋細胞における血小板由来増殖因子の情報伝達と細胞接着性の関連**
論文審査委員	（主査） 教授　祖父江憲治 （副査） 教授　岸本　忠三　　教授　松沢　佑次

論文内容の要旨

（目　的）

動脈硬化の本質は，血管平滑筋細胞（SMC）の増殖，遊走及び表現型変化にあり，その過程において血小板由来増殖因子（PDGF）が重要な役割を演じていることはすでに知られている。PDGFは増殖因子であると同時に遊走因子であり，アクチンフィラメント（AF）の再編成を惹起する。fibroblastでは，phorbol ester処理によりAFの再編成に伴って細胞接着性に変化が生じることを確認しており，細胞骨格構築と細胞接着に密接な関連があると考えられる。

本研究は，PDGFによるSMC接着性の変化を検討しその生物学的意義を明らかにすることを目的とする。

（方法及び成績）

使用した細胞は，ラット肺動脈平滑筋細胞株（PAC-1）であり，10% FCSを含むDMEMにて継代培養を行なった。各アッセイ前に，細胞を0.2% FCS条件下培養した。低FCS条件下では，PAC-1細胞は，分化型となり，α-アクチンの発現が促進される。

まず，PAC-1細胞のPDGF反応性を検討した。PAC-1細胞を0-10ng/ml PDGF（human recombinant PDGF-BB）存在下，3日間培養し，細胞数を計測した。PAC-1細胞はPDGF濃度依存性に増殖し，また総アクチン中のα-アクチン量は，PDGF濃度依存性に減少した。

PDGFは，PDGF受容体が有するチロシンキナーゼ（TK）活性を介して細胞増殖を促進することが既に知られている。そこで，TK阻害剤，ハービマイシンA（HM-A）を用いて，PDGF反応性への阻害効果を検討した。

PDGF（10ng/ml）存否下，0-1 μg/ml HM-A条件下にて，細胞を，3日間培養し，細胞数を計測した。その結果，HM-Aは，PDGF濃度依存性増殖を抑制することが明らかになった。この時，PDGFによるα-アクチンの発現低下は，HM-Aにより抑制された。次にPDGF依存性チロシンリン酸化反応に対するHM-Aの阻害効果を，抗ホスホチロシン抗体を用いたWestern blotting法により検討した。HM-A非存在下，SDS-PAGE上約180 kDaの分子量を有する蛋白質がPDGF依存性にチロシンリン酸化されるが，そのリン酸化は，HM-Aにより阻害

された。

PDGFは，遊走因子としてAFの再編成を惹起することが既に報告されている。PAC-1細胞においてもPDGF処理によりストレスファイバーが崩壊することが，ローダミン標識ファロイジンを用いた蛍光染色にて確認された。PDGFによるAFの再編成は，HM-A及び他のTK阻害剤ゲニスタインにより抑制された。

ストレスファイバーの終着部は，細胞と細胞外マトリックスの接着部であることから，PDGFによるAFの再編成に伴うインテグリンの局在変化を，抗インテグリンα5β1抗体を用いた蛍光抗体染色にて検討した。PDGF処理前，細胞表面に均一に局在したインテグリンは，処理15分後，細胞の中心部に集積し，その後不均一な局在を示すようになった。

次にファイブロネクチン（FN）へのPAC-1細胞の接着性に対するPDGFの影響を検討した。FNをコートした培養皿に0-40ng/ml PDGF存在下，浮遊細胞を15分間静置し，接着した細胞数を計測した。その結果PDGFにより，有意に細胞のFNへの接着が低下することが明らかになった。

FNコート及び非コート培養皿にPAC-1細胞を培養し，両者のPDGFによる脱分化に対する反応性を総アクチン中のα-アクチンの量を検討することにより比較した。培養皿をFNコートすることで，インテグリン，FN相互作用を強化することにより，PDGFによるα-アクチンの発現低下は，抑制された。逆に培養液中にインテグリン，FN相互作用を減弱させる，オリゴペプチドGRGDSP或いは抗インテグリンα5β1抗体を添加することにより，PDGF処理と同様にα-アクチンの発現低下を認めた。

（総　括）

PDGFはTK活性を介してAFの再編成を惹起する。この過程で，SMCのFNへの接着性が低下し，それによって，SMCの脱分化が促進される。PDGFの情報伝達系に，インテグリンが関与している可能性が示唆された。また，これらの知見は，動脈硬化におけるSMCの遊走と脱分化を同時に説明しうる，PDGFの作用機序のモデルと考えている。

論文審査の結果の要旨

血小板由来増殖因子を介する情報伝達系の研究は，ras，PLC等の蛋白質を中心として行われてきたが，それらのdown streamに存在する具体的なtargetは不明である。本研究は，平滑筋細胞の血小板由来増殖因子に対する反応性を培養平滑筋細胞株（PAC-1）を用いて細胞接着性の観点から解析したものである。その結果，血小板由来増殖因子刺激により1）受容体チロシンキナーゼが活性化され，細胞の形態変化が生じること，2）細胞接着性が低下すること，3）細胞接着性低下は，平滑筋細胞遊走のイニシエーションであると同時に，脱分化を促進することにある，という知見を得た。培養平滑筋細胞株を用いており，正確な意味での平滑筋細胞の形質を反映しないという欠点はあるものの，得られた知見は動脈硬化における平滑筋細胞形質転換の一側面を把握したものである。

以上の理由により本研究は，学位に値するものと考えられる。