The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Parathyroid Hormone-Related Protein Inhibits Endothelin-1 Production
Author(s)	蒋, 冰冰
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40325
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

【 71 】

氏　　名	蒋（しょう）　冰（ひょう）　冰（ひょう）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学 位 記 番 号	第　12811　号
学位授与年月日	平成 9 年 1 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Parathyroid Hormone-Related Protein Inhibits Endothelin-1 Production （PTHrP を介する内皮細胞からの endothelin-1 産生抑制機構）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授 荻原 俊男 （副査） 教 授 網野 信行　教 授 三木 直正

論 文 内 容 の 要 旨

【目　的】

腫瘍性高カルシウム血症の原因因子として発見された副甲状腺ホルモン関連蛋白 parathyroid hormone-related protein（PTHrP）は，強力な血管拡張作用を有し，心筋・腎・血管内皮細胞・平滑筋細胞にてその産生が確認され，局所性の血管作動性物質の一つとして注目されている。また最近内皮由来の強力な血管収縮物質である endothelin-1 が血管平滑筋における PTHrP 産生を亢進させることが報告されている。PTHrP および endothelin-1 という二つの血管作動性物質はそれぞれ血管緊張性を調節する因子として重要な役割を果たしている可能性があるが，この相互作用については明らかにされていない。本研究においては，血管内皮細胞からの endothelin-1 産生に対する PTHrP の作用およびその機序の詳細につき検討した。

【方　法】

1）培養細胞：ウシ肺動脈内皮細胞（bovine pulmonary arterial endothelial cells；BPAE 細胞）を10％ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagles' medium（DMEM）にて37°C，5％ CO_2 気相下で培養し，5－9 継代の細胞を使用した。

2）Endothelin-1 産生量：24穴プラスチックディッシュに培養した BPAE 細胞を各化合物を添加した血清不含 DMEM 中にさらに24時間培養し，培養液中の endothelin-1 含量を sandwich enzyme immunoassay にて測定した。蛋白量は Lowry 法にて測定した。

3）細胞内 cyclic GMP 産生量：100 mm ディッシュに培養した BPAE 細胞を血清不含 Earle's medium 中に15分間培養し，10^{-7} mol/PTHrP（1－34）を添加し，0，1，5，15，30分後の細胞を液体窒素にて凍結し，6％ trichloroacetic acid 処理後抽出した cyclic GMP 濃度を radioimmunoassay にて測定した。

4）Endothelin-1 mRNA 発現：100 mm ディッシュに培養した BPAE 細胞を各化合物を添加した血清不含 DMEM 中さらに12時間培養し，total RNA を抽出した後，［α-^{32}P］dCTP にてラベルした1.17 kb のヒト endothelin-1-precursor cDNA を probe とし，endothelin-1 の mRNA の発現量を Northern blot analysis にて定量した。

【成　績】

1）BPAE 細胞からの endothelin-1 の基礎分泌はヒト PTHrP（1-34）$10^{-9}-10^{-6}$ mol/L の添加により濃度依存的に抑制され，10^{-7} mol/L PTHrP（1-34）により基礎値の74%に低下した。

2）Gi 蛋白抑制物質である百日咳毒素(IAP, 100 ng/mL)の同時添加により10^{-8} mol/L PTHrP(1-34)による BPAE 細胞からの endothelin-1 分泌抑制作用は完全に解除された。また PTHrP（1-34）により抑制された endothelin-1 分泌は nitric oxide 産生酵素に対する基質競合拮抗抑制剤である10^{-3} mol/L N^G-monomethyl-L-arginine（L-NMMA）の同時添加により解除され，さらに$5x10^{-3}$ mol/L L-arginine の添加により回復した。同じ濃度の D-arginine の添加ではその回復作用は認められなかった。

3）BPAE 細胞内 cyclic GMP 含量は10^{-7} mol/L PTHrP（1-34）添加後1分で基礎値の5倍に上昇し，この上昇は添加後15分まで認められた。

4）Northern blot analysis により定量した BPAE 細胞内の endothelin-1 mRNA 発現量は10 U/mL の thrombin により亢進した。10^{-7} mol/L PTHrP（1-34）添加により，基礎時および thrombin（10 U/mL）添加時の endothelin-1 mRNA 発現は著明に抑制された。house keeping gene である GAPDH mRNA 発現は thrombin および PTHrP（1-34）添加により影響を受けなかった。

【総　括】

PTHrP は培養血管内皮細胞の endothelin-1 産生を抑制する作用を有することが認められた。この作用は百日咳毒素の同時添加により解除されたことから，PTHrP 受容体および Gi 蛋白を介すると考えられる。またこの作用は nitric oxide 産生酵素に対する基質競合拮抗阻害剤である L-NMMA により解除され，さらにこの解除がこの酵素の基質である L-arginine の同時添加により消失したことから，内皮細胞での存在が知られている構成型 nitric oxide 合成酵素の活性化を介することが示唆された。PTHrP による内皮細胞からの nitric oxide 産生は同細胞内 cyclic GMP 含量の上昇によっても確認された。PTHrP は基礎時および thrombin による刺激時の endothelin-1 mRNA 発現を抑制することから mRNA 発現レベルで endothelin-1 産生を抑制していると考えられる。血管平滑筋に対して，endothelin-1 は収縮作用，細胞増殖作用を有し，PTHrP は拡張作用，細胞増殖抑制作用を有することが報告されている。既報の endothelin-1 による血管平滑筋での PTHrP 産生促進作用と，今回の検討により明らかにされた PTHrP による内皮細胞での endothelin-1 産生抑制作用を合わせて考えると，血管の収縮あるいは肥厚に関し，血管内皮・平滑筋間には endothelin-1，PTHrP の互いの産生調節を介する feedback 機構が存在する可能性が示唆される。

論文審査の結果の要旨

Parathyroid hormone-related protein（PTHrP）は1987年腫瘍性高カルシウン血症の原因因子として癌組織より単離同定されて以来，血管平滑筋と内皮を含むほとんどすべての正常組織に発現していることが明らかとなっている。PTHrP は強力な血管拡張作用を有し，局所性の血管作動性物質の一つとして注目されている。

Endothelin-1，angiotensin II，thrombin など強力な血管収縮因子あるいは増殖因子が血管平滑筋細胞における PTHrP 産生を亢進させ，心筋梗塞患者の冠動脈動脈硬化巣および balloon injury 後のラット頚動脈における PTHrP 産生が亢進することが報告されている。PTHrP および endothelin-1 という二つの血管作動性物質はそれぞれ血管緊張性を調節する因子として重要な役割を果たしている可能性があるが，この相互作用については明らかにされていない。本研究においては，血管内皮細胞を用い，endothelin-1 産生に対する PTHrP の作用およびその機序につき検討を行った。PTHrP は培養血管内皮細胞の endothelin-1 産生を抑制し，基礎時および thrombin による刺激時の endothelin-1 mRNA 発現を抑制することから mRNA 発現レベルで endothelin-1 産生を抑制していることを明らかにした。この作用は百日咳毒素の同時添加により解除されたことから，PTHrP 受容体および G 蛋白を介することを明らかにした。またこの作用は L-NMMA により解除され，さらにこの解除が L-arginine の同時添加により消失したことか

ら，内皮細胞での存在が知られている構成型NO合成酵素の活性化を介することを示唆した。PTHrPによる内皮細胞からのNO産生は同細胞内cGMP含量の上昇によっても確認した。さらに血管内皮細胞におけるPTH/PTHrP受容体の発現を証明した。血管平滑筋に対して，endothelin-1は収縮作用，細胞増殖作用を有し，PTHrPは拡張作用，細胞増殖抑制作用を有することが知られており，endothelin-1による血管平滑筋でのPTHrP産生促進作用と合わせて考えるとき，本研究により，血管の収縮あるいは肥厚に関し，血管内皮・平滑筋間にはendothelin-1，PTHrPの互いの産生調節を介するfeedback機構が存在する可能性が示唆された。以上により本研究は学位の授与に値すると考えられる。