



Title	Inactivation of glutathione peroxidase by NO leads to the accumulation of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and the induction of HB-EGF via c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase in rat aortic smooth muscle cells
Author(s)	高, 永鎬
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42606">https://hdl.handle.net/11094/42606</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">ご参照</a> ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	高永鎬
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第16029号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Inactivation of glutathione peroxidase by NO leads to the accumulation of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and the induction of HB-EGF via c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase in rat aortic smooth muscle cells (ラット血管平滑筋細胞において一酸化窒素は glutathione peroxidase の不活性化による過酸化水素の蓄積と c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase を介して HB-EGF 誘導を起こす。)
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之  (副査) 教授 高井 義美 教授 中村 敏一

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

一酸化窒素 (NO) は血管拡張、神経伝達など多彩な生理作用のある一方、ペルオキシ亜硝酸 (peroxynitrite) を介して細胞障害性も有し、血管系に対し酸化ストレスを与える。一方、ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子 (HB-EGF) は血管平滑筋細胞で発現し、動脈硬化に関与することが知られており、我々はこれまでラット血管平滑筋細胞で 3-デオキシグルコソシオンやメチルグリオキサールなどのメイラード反応中間代謝産物による酸化ストレスによって過酸化物が蓄積し HB-EGF が誘導されることを明らかにしてきた。そこで今回我々は血管平滑筋細胞における NO による酸化ストレスのメカニズムと HB-EGF 誘導のメカニズムについて検討を加えた。

#### 【方法ならびに成績】

血管平滑筋細胞はラット大動脈より単離、継代培養し実験に用いた。ラット血管平滑筋細胞に NO ドナーを添加し、ノーザンブロット法ならびにウェスタンブロット法により HB-EGF の発現誘導の検討した。その結果 N-ニトロソアセチルペニシルアミン (SNAP)、peroxynitrite などにより HB-EGF の著明な発現誘導を認めた。

NO による酸化ストレスのメカニズムを検討するために SNAP をラット血管平滑筋細胞に添加し、細胞内の過酸化水素ならびに過酸化脂質除去の中心的な酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の活性を調べると、GPx の活性は NO により有意に低下していた。一方、superoxide dismutase (SOD) の活性は NO 添加によって変化を認めなかった。また細胞内の過酸化物量を H<sub>2</sub>DCF を probe として用いて FACS で解析すると、NO 添加により細胞内の過酸化物の蓄積が認められた。その結果より NO による酸化ストレスは GPx 不活性化を介して結果的に過酸化物が蓄積し細胞障害をもたらすというメカニズムが示唆された。

NO による HB-EGF の発現誘導経路について検討するため、c-Jun N-terminal キナーゼ 1 (JNK 1) の dominant-negative mutant を細胞に発現させると HB-EGF の発現誘導は阻害された。さらに NO による JNK の活性化と HB-EGF の発現誘導が、抗酸化物であるセチルシステイン (NAC) や過酸化水素の代謝酵素であるカタラーゼで阻害された。これらの結果より NO による過酸化物の蓄積が JNK を活性化し HB-EGF の発現を誘導することが示唆された。

さらに NO によって誘導される HB-EGF の役割を検討するために、SNAP とともにアンチセンス HB-EGF オリゴヌクレオチドをラット血管平滑筋細胞に添加したところ、DNA のアガロース電気泳動で DNA の laddering が、

DAPIの核染色にて染色体凝縮(chromosome condensation)が、よう化プロピジウム(propidium iodide)を用いた cell cycle の解析で subG1 の増加がそれぞれ認められ、HB-EGF を抑制することによりアポトーシスが誘導されることが示唆された。

#### 【総括】

ラット血管平滑筋細胞は SNAP、peroxynitrite などの NO ドナーによって GPx の活性が低下することにより、細胞内に過酸化水素の蓄積が認められた。また、過酸化水素の蓄積が JNK を活性化し HB-EGF の発現を誘導することが考えられた。NO によって過酸化水素が蓄積し細胞障害をもたらすことと、その細胞障害が HB-EGF によって抑制されることから NO によって誘導される HB-EGF は細胞保護的に働くことが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

一酸化窒素(NO)や peroxynitrite は細胞障害性も有し、血管系に対し酸化ストレスを与える。多くの細胞では NO によってアポトーシスが誘導されるが、生体内で NO の標的細胞である血管平滑筋細胞は NO によってアポトーシスは誘導されない。本論文では、NO が、アポトーシスを抑制する機能をもつヘパリン結合性 EGF 様増殖因子(HB-EGF)を誘導し、その mechanism は NO によっておこる  $H_2O_2$  の蓄積が JNK を活性化し HB-EGF の発現を誘導することを明らかにしている。また、血管平滑筋細胞で NO によって誘導される HB-EGF が酸化 stress によるアポトーシスを抑制し、細胞保護的に働くことが示唆された。本論文は血管平滑筋細胞で酸化 stress による細胞障害とその細胞障害に対する防御系について新しい概念を生み出すものであり、学位の授与に値すると考えられる。