The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Calcineurin-mediated pathway involved in the differentiated phenotype of smooth muscle cells
Author(s)	大川, 恭行
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43884
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

【91】

氏　　名	大川恭行（おおかわ やすゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　17661　号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体統合医学専攻
学位論文名	Calcineurin-mediated pathway involved in the differentiated phenotype of smooth muscle cells **（カルシニューリンを介するシグナル伝達経路は平滑筋細胞の分化型形質維持に関与している）**
論文審査委員	（主査） 教　授　祖父江憲治 （副査） 教　授　平野　俊夫　　教　授　宮崎　純一

論文内容の要旨

［目　的］

カルシニューリンを介するシグナル伝達経路は胎生期における血管系の発生、骨格筋肥大及び心筋肥大に重要である。しかしながら、同じ筋細胞でありながら、平滑筋細胞（SMC）におけるこの経路の役割は明らかになっていない。SMC は、血清存在下で培養する従来法では、収縮能及び平滑筋特異的分子マーカーの発現を失い、脱分化する。当研究室では、分化型形質を維持した SMC の初代培養系を確立し、IGFI/Phosphatidylinositol-3 Kinse (PI3K)/Protein Kinase B（PKB）経路が分化型形質維持に重要であることを明らかにしてきた。本研究では、この SMC 培養系を用いてカルシニューリンを介するシグナル伝達経路が SMC 形質に及ぼす影響について解析した。

［方法ならびに成績］

カルシニューリン阻害剤が平滑筋細胞の分化型形質に与える効果

ニワトリ砂嚢平滑筋より単離した初代培養 SMC をラミニン上、IGFI 存在下で培養を行うとその分化型形質を維持する。これに対しカルシニューリン阻害剤であるサイクロスポリン（CsA）5 μM を添加して3日間培養するとカルバコール刺激に応答する収縮能を失った。次に分化型 SMC の分子マーカー（カルデスモン、カルポニン、α1 インテグリン）の発現を、ノーザンブロットにより解析した。IGFI 存在下ではこれら分子マーカー群が発現しているが、CsA、FK506 を添加した場合では、発現が抑制された。また、カルデスモン及びα1インテグリンプロモーターの転写活性について、プロモーター解析を行った結果、CsA FK506 の添加により転写活性の減少がみられた。

CAIN はカルデスモン及びα1インテグリンプロモーター転写活性を阻害する

カルシニューリンを介したシグナル伝達経路の SMC の分化型形質維持への直接的な関与を確認するために内在性カルシニューリン阻害ペプチド（CAIN）をカルデスモン及びα1 インテグリンのレポーター遺伝子と共発現させ、そのプロモーター解析を行った。その結果、カルデスモン及びα1インテグリンのプロモーター活性は CAIN の発現量依存性に阻害された。

活性化型カルシニューリンの強制発現は PKB 経路阻害によるカルデスモン及びα1 インテグリンプロモーター活性阻害を回復する。

SMC の分化維持シグナル IGFI/PI3K/PKB 経路とカルシニューリン経路の相関性について検討を行った。活性化型カルシニューリンを強制発現させることにより、不活性化型 PKB の強制発現による PKB 経路の阻害によるカルデスモン及びα1 インテグリンの転写活性の減少を回復した。

カルシニューリンの細胞内局在の検討

分化型 SMC と CsA により脱分化した SMC のカルシニューリンの細胞内局在を比較検討した。IGFI 存在下ではカルシニューリンは、ほぼ全て核内に局在していたのに対し、CsA 添加条件では、細胞質あるいは核周囲に局在していた。

［総　括］

カルシニューリンを介する経路は分化型 SMC の形質維持に必要であり、SMC 分化維持シグナルである PI3K/PKB 経路の下流に位置していることが明らかになった。また、カルシニューリンの核内への局在は SMC の形質維持に密接に相関していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

増殖継代した培養平滑筋細胞は本来の平滑筋組織に存在する平滑筋細胞が有する分化型形質を失った脱分化平滑筋細胞であるため、分化型から脱分化型への形質転換の分子機構解析は困難であった。当研究室では分化型平滑筋初代培養系を確立し、IGF-I 刺激により活性化される PI3K/PKB 系が分化型形質維持に関わるシグナル伝達経路であることを明らかにしている。本研究は分化型ニワトリ砂嚢平滑筋細胞の初代培養系を用いて、PI3K/PKB シグナル伝達系下流因子の候補としてカルシニューリンの役割を検討した。カルシニューリン特異的阻害剤である CyclosporinA 添加により分化型平滑筋細胞の形態は紡錘形から線維芽細胞様に変化し、収縮能も消失した。同様に、CyclosporinA あるいは FK506 の添加でカルデスモン、カルポニン、α1 インテグリンなど平滑筋細胞分子マーカーの発現が著明に低下した。内在性カルシニューリン阻害ペプチド（CAIN）の発現量依存性に、カルデスモン及びα1 インテグリンのプロモーター活性は阻害された。以上の結果より、カルシニューリンが平滑筋細胞分化維持シグナルに関与していることが示唆された。また、CyclosporinA による平滑筋細胞脱分化に伴い、カルシニューリンが核から細胞質へ局在が移行することを見出した。次に、分化型平滑筋細胞において不活性化型 PKB よるカルデスモンとα1 インテグリン遺伝子のプロモーター活性の抑制は恒常的活性化型カルシニューリン A の強制発現により回復することから、カルシニューリンは PKB 下流に位置することを明らかにした。本研究は、カルシニューリンを介するシグナル伝達経路が平滑筋細胞の分化型形質維持に必要であり、PI3K/PKB 経路の下流にカルシニューリンが存在することを示した研究であり、学位に値すると考えられる。