



Title	Acrolein Induces Hsp72 via Both PKC δ /JNK and Calcium Signaling Pathways in Human Umbilical Vein Endothelial Cells
Author(s)	御園生, 良子
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45453
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

氏 名	御園 生 良 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 9 2 6 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学 位 論 文 名	Acrolein Induces Hsp72 via Both PKC δ /JNK and Calcium Signaling Pathways in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (ヒト臍帯血管内皮細胞においてアクロレインは PKC δ /JNK とカルシウムシグナル経路を介して Hsp72 を誘導する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 谷口 直之 (副査) 教 授 岡本 光弘 教 授 高井 義美

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

アクロレインはアルデヒド基を持つ極めて強い求電子化合物であり、タバコや排気ガス等に含まれ、酸化ストレスを引き起こす因子の一つであると考えられ、アルツハイマー病、動脈硬化症、糖尿病患者の血中で増加が認められるほか、抗癌剤の代謝によっても生成される。一方、熱ショックタンパク質 (Hsp) は、温熱、虚血、放射線等の種々のストレスによって誘導され、蛋白の変性を抑制するとともに、変性した蛋白の修復を行うことが知られている。なかでも、分子量 72 kDa の Hsp72 は、ストレス誘導性の代表的な分子シャペロンである。我々はアクロレインにヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) がどのように対応するか調べるため、代表的な細胞保護タンパク質である Hsp72 発現誘導及びそのメカニズムを検討した。

[方法ならびに成績]

アクロレインにより HUVEC が Hsp72 を発現するかどうかを検討するため、種々の濃度のアクロレインを細胞に添加し、ウェスタンブロットにて検討した結果、アクロレイン 25 μ M で Hsp72 が最も誘導された。また、計時的にウェスタンブロットおよびノーザンブロットを行ったところ、4-6 時間で mRNA が最も誘導され、12 時間でタンパク質が誘導のピークとなった。他のカルボニル化合物である 3-デオキシグルコソールとメチルグリオキサールをそれぞれ 0.1-0.5 mM 添加し、同様の実験を行ったが、誘導は認められなかった。次にラット血管平滑筋細胞、アフリカミドリザル腎由来細胞にアクロレインを添加し、ウェスタンブロットにて確認したが、Hsp72 は誘導されなかった。このことから Hsp72 の誘導はアクロレインに特異的であり、さらに HUVEC に特異的であることが分かった。アクロレインによる Hsp72 の発現誘導がどのシグナルを介しているのか検討するため、MAPK のリン酸化抗体を用いウェスタンブロットを行った結果、JNK は 30 分、ERK は 5 分、p38 MAPK は 10 分でリン酸化されることが分かった。そこで、これら MAPK 阻害剤を用い、Hsp72 に対するウェスタンブロットを行ったところ、JNK 阻害剤である SP600125 を前処理した細胞で Hsp72 の発現誘導が抑えられた。また、JNK の上流を検索するため様々な阻害剤を用いウェスタンブロットを行った実験では、カルシウムキレート剤の BAPTA-AM と PKC δ インヒビターの rottlerin で Hsp72 の発現誘導の抑制が認められた。これらの結果を確認するため、PKC のアイソフォームのリン酸化抗体を

用いウェスタンブロットを行ったが、PKC δ でのみアクロレインによるリン酸化が認められた。また、カルシウム感受性の蛍光色素（Fura-2AM）を用いたカルシウム測定により、アクロレインによるカルシウムの上昇を確認した。さらに、アクロレインは活性酸素を産生することが知られているが、アクロレインによる Hsp72 の発現誘導に活性酸素種が関係するかを、活性酸素種に感受性のある蛍光色素（CM-H₂DCF-AM）を用いて検討した。まずアクロレインにより活性酸素種が産生され、それが活性酸素種除去剤である N-Acetyl Cysteine (NAC) で抑えられた。NAC ともう一つの活性酸素種除去剤であるクルクミンを前処理し、アクロレインを添加し Hsp72 の発現をウェスタンブロットを用いて検討したところ、NAC、クルクミンともに Hsp72 の抑制が認められず、活性酸素種の直接の関与はないと考えられた。

[総括]

喫煙やアルツハイマー病、動脈硬化症、糖尿病等の疾患で血中に増加するアクロレインは、HUVEC において Hsp72 を発現誘導することが分かり、調べた細胞の中では、HUVEC 特異的であった。また、他のカルボニル化合物ではこの誘導が見られなかったことから、この誘導はアクロレインに特異的と考えられた。その誘導機序には PKC δ /JNK とカルシウムシグナル経路が関与し、活性酸素種は産生されるが発現誘導には関与しないことが明らかとなった。これらのことから、HUVEC には、アクロレインに対して、特有のシグナルにより Hsp72 を誘導する独自の細胞保護メカニズムが存在することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、糖尿病などの疾患や喫煙による生体への悪影響などに関与するアクロレインが、ヒト臍帯血管内皮細胞（HUVEC）に与える影響を、代表的なストレス誘導タンパク質、Hsp72 の発現誘導メカニズムを調べることにより検討している。その結果、HUVEC ではアクロレインによって濃度、時間依存的に Hsp72 が誘導され、それが転写レベルで生じることを確認し、さらに、その誘導の細胞内シグナルとして、PKC δ /JNK 経路とカルシウム経路の双方が必須であり、活性酸素種の関与はないことを明らかにしている。この経路は、アクロレインによる誘導シグナルとしては、新規である。アクロレインの添加によりカルシウムの上昇は、調べた細胞の中では HUVEC 特異的であることが分かり、HUVEC には血中の細胞内ストレスを惹起する因子から細胞を保護する独自のメカニズムが存在すると考えられる。この研究はアクロレインに対する生体防御機構の一つを解明した点で、学位に値するものとする。