



## Effects of protein kinase inhibitors on growth factor-stimulated DNA synthesis in cultured rat vascular smooth muscle cells

高木, 康行

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1990-03-22

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1420

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001420>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍) 高木 康行 (岡山県)

学位の種類 医学博士

学位記番号 医博ろ第1159号

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位授与の日付 平成2年3月22日

学位論文題目 Effects of protein kinase inhibitors on growth factor-stimulated DNA synthesis in cultured rat vascular smooth muscle cells  
 (ラット血管平滑筋細胞のDNA合成における蛋白キナーゼ阻害剤の影響)

審査委員 主査教授 藤田拓男

教授 中村肇 教授 高井義美

### 論文内容の要旨

#### I. 緒言

動脈硬化や高血圧の進展には機械的、免疫学的障害を受けた部位の血管内皮細胞の変性剥離、血小板粘着・凝集と、血管平滑筋細胞(VSMC)の内膜側への異常遊走・増殖などが重要な因子と考えられている。従来、血清由来の血小板由来成長因子(PDGF)や上皮成長因子(EGF)あるいは線維芽細胞成長因子(FGF)、somatomedin C、low density lipoprotein、insulinは細胞増殖をもたらす成長因子として知られているが、さらに血管収縮物質であるangiotensin II、endothelin、

内皮細胞やVSMC自身から放出されるPDGF類似物質、macrophage由来の成長因子(MDGF)も細胞増殖をもたらす因子と報告されている。なかでもPDGFとEGFは線維芽細胞やVSMCの増殖を促進する血小由来の強力な成長因子であるが、その細胞内伝達機構については未だ全ては解明されていない。

ここではラット培養VSMCを用い、血清由来成長因子によるVSMCの増殖において細胞内Ca<sup>2+</sup>の増加とそれに伴うcalmodulin(CaM)の活性化、及びPKCといったprotein kinaseの活性化がVSMCの増殖にどの様に関与しているかを阻害物質を用いてより明らかにする。

#### II. 実験方法

VSMCはRossの方法に準じて explant 法により20週令の雄Wisterラット大動脈中膜から単離し、10%牛胎仔血清と抗生素質を含むDulbecco変法培養液中で培養した。

subconfluent(～10<sup>5</sup> cell/well)となったVSMCは無血清培地に置換して72時間静置した後

quiescent (G<sub>0</sub>) とした。その後PKC活性化物質である12-O-tetra-decanoyl phorbol-13-acetate (TPA ; 10<sup>-7</sup>M), PDGF (50ng/ml), EGF (5 ng/ml) を阻害物質存在下, 非存在下でVSMCに加えさらに20時間培養を行った。さらに<sup>3</sup>H-thymidine (1  $\mu$ Ci) を添加して4時間の取り込み後, trichoroacetid acid に不溶分画の放射活性を液体 scintillation counter にて測定した。

阻害物質として1- (5-chloro-naphthalene-1-sulfonyl) 1 H hexahydro-1, 4, diazepine hidrochloride (ML-9 ; 10<sup>-9</sup>-10<sup>-8</sup>M), 1- (5-isoquinolinylsulfonyl) 2-methyl piperazine (H-7 ; 10<sup>-10</sup>-10<sup>-7</sup>M) を用いた。

### III. 結 果

TPAはDNA合成を対照の約2倍に促進し, この効果はH-7によって用量依存性に抑制された。またPDGFは対照の約2倍にDNA合成を促進し, その効果はH-7, ML-9によって用量依存性に抑制された。一方EGFも対照の約2倍にDNA合成を促進し, H-7, ML-9によって有意に抑制されたが, H-7, ML-9はPDGFより高濃度を必要とした。

### IV. 考 察

成長因子の結合によって生じる受容体キナーゼの活性化以後, inositol 磷脂質の代謝回転によって生じる diacylglycerol (DG) 依存の protein kinase C (PKC) の活性化や inositol trip-hosphate によるCa<sup>2+</sup>貯蔵部位からのCa<sup>2+</sup>動員, calmodulin (CaM) の活性化は各々DNA合成における重要な細胞内シグナルといわれている。ここではPKC及び, calcium CaM依存性 myosin light chain kinase (MLCK) の特異的阻害物質として各々開発されたH-7, ML-9を初めて用い, VSMCでのDNA合成におけるPKC及びMLCK活性化の重要性を確認した。

今回のVSMCを用いた結果ではPKCを活性化するTPA刺激に対して低濃度のH-7が用量依存性にDNA合成を抑制したことから, H-7のPKC阻害剤としての選択性が示された。さらにPDGFの刺激下でH-7は低濃度から用量依存性にDNA合成を抑制した。一方, EGFの刺激下でH-7はDNA合成を抑制したがPDGF刺激下に比しH-7に抵抗性を示した。

従来PDGFによるVSMC細胞用Ca<sup>2+</sup>の増加, 及び fibroblasts など多くの細胞での磷脂質代謝回転の促進が証明され, c-myc, c-fos の発現を促進すると考えられているが, EGFによるVSMC細胞内Ca<sup>2+</sup>増加, 及び磷脂質代謝回転への影響は十分明らかではなく, fibroblast では磷脂質代謝回転やCa<sup>2+</sup>を介さずにc-myc mRNAを増加させると報告されている。

従って細胞増殖におけるPKC活性はEGFよりもPDGFによるDNA合成促進作用においてより重要であることが強く示唆された。

一方 calcium-CaM依存性蛋白キナーゼの一つであるMLCKのDNA合成に及ぼす影響をML-9を用い検討した結果, PDGF, EGF刺激下とともにML-9は用量依存性の抑制効果を示した。従って, MLCKの活性化はVSMCの収縮作用以外に細胞増殖においても重要であることが示唆

された。

## V. まとめ

PKC, MLCK活性化の経路はVSMCの増殖に重要であることが示唆された。さらに、EGFに比しPDGFによる細胞増殖にはPKC活性化依存の経路が重要であることも示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

血管は主として平滑筋細胞から成り、その内腔の容積の調節に収縮と弛緩を繰返して寄与し、血液の流量を調節する他、血管の代謝の維持に重要な役割を果す。動脈硬化や高血圧の進展には機械的・免疫学的障害を受けた部位の血管内皮細胞の変性剥離、血小板粘着、凝集と血管平滑筋細胞の内膨側への異常遊走、増殖が重要な役割を果す。平滑筋の増殖には、血小板由来成長因子(PDGF)と上皮成長因子(EGF)が血小板から放出されて関与する事が明らかにされているが、その作用機序はまだ明らかではない。血管平滑筋はPDGFとEGFの受容体があり、更に細胞内遊離カルシウム、カルモジュリン、ミオシン軽鎖磷酸化酵素やCキナーゼ等による情報伝達の機序を介してその作用が発現すると考えられているが、血管平滑筋におけるその機序の詳細は明らかではない。

本研究者は血管平滑筋の増殖をおこす細胞内情報伝達機構を中心にラット大動脈の平滑筋細胞を用いて検討を行なった。

生後20週令の雄ウイスターラット大動脈中膜からRossの方法によって血管平滑筋細胞を分離し、10%FCSと抗生物質を含むDulbecco変培養液で培養し、0.25%トリプシン0.02%EDTAを加えた培養液で継代し、10-15代の $10^{-5}$ /ウェルの密度でサブコンフルエンントになったものを無血清培地に移してG<sub>0</sub>の静止状態とし、TPA( $10^{-7}$ M), PDGF(0.5単位), EGF( $1.7 \times 10^{-9}$ M)を加えて更に20時間培養し、トリチウム、サイミジンのとりこみを測定した。

血管平滑筋細胞のDNA合成は、TPAによって増加し、Cキナーゼの抑制剤であるH-7で容量依存性に抑制され、増殖に対するCキナーゼの関与が推定された。PDGFもDNA合成を約2倍に増加させたが、その作用も $10^{-9}$ ~ $10^{-7}$ MのH-7で抑制され、又、ミオシン軽鎖磷酸化酵素阻害剤であるMLCK( $10^{-8}$ ~ $10^{-6}$ M)によっても抑制された。EGFもDNA合成を約2倍に増加させたが、PDGFの場合よりも約100倍の大量のH-7とML-9で初めて抑制された。PDGF及びMLCKによる血管細胞の増殖にはCキナーゼが明らかに関与する事が認められたが、EGFの作用機序はこれとややことなる様である。

以下、本研究者は従来殆ど研究されなかった血管平滑筋細胞の増殖機序について蛋白磷酸化とカルシウムの作用を中心に検討し、新しい知見を得たものであり、価値ある集積と考えられる。よって、本研究者は医学博士の学位を得る資格があると考えられる。