



Serotonin plays a major role in serum-induced phospholipase C-mediated hydrolysis of phosphoinositides and DNA synthesis in vascular smooth muscle cells

荒木, 俊一

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1992-10-14

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1675

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001675>

※ 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）	あら き しゅん いち 荒 木 俊 一	（兵庫県）
博士の専攻 分野の名称	博 士（医学）	
学位記番号	博ろ第1324号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成4年10月14日	
学位論文題目	Serotonin Plays a Major Role in Serum-induced Phospholipase C-mediated Hydrolysis of Phosphoinositides and DNA Synthesis in Vascular Smooth Muscle Cells 血管平滑筋細胞での血清により引き起こされるホスホリパーゼC反応とDNA合成におけるセロトニンの重要性	
審 査 委 員	主査 教授 横 山 光 宏	
	教授 春 日 雅 人	教授 高 井 義 美

論 文 内 容 の 要 旨

〔序文〕

血管平滑筋細胞（VSMC）の増殖は、動脈硬化の発症、進展において中心的な役割を果たしている。従来より内皮細胞障害部位に凝集した血小板より放出される血小板由来細胞増殖因子（PDGF）が動脈硬化巣での VSMC の増殖に主要な役割を果たしており、全血清（WBS）の最も強力な VSMC の増殖促進作用も PDGF によるものと推定されている。WBS 中には血小板から PDGF と同時に放出される上皮増殖因子（EGF）やセロトニンなども含まれている。更に、私共は PDGF の VSMC 増殖促進作用にはイノシトールリン脂質（PI）の加水分解反応とこの反応に引き続く C キナーゼの活性化が重要な役割を果たすことを明らかにしているが、VSMC においてはセロトニン（ S_2 作用）も PI の加水分解反応を引き起こす。今回、私共は VSMC における WBS による PI の加水分解反応と DNA 合成促進作用におけるセロトニンの役割を検討した。

〔実験方法〕

VSMC は雄日本白色家兎の胸部大動脈より explant 法にて採取した。10%牛胎仔血清（FCS）を含む Dulbecco's modified Eagle's medium を用い、37℃、5%CO₂気相下で継代培養した。3代目 VSMC を飽和状態まで培養した後、medium 中より 48 時間 FCS を除去して細胞を静止期に同調した後実験に供した。

DNA 合成は細胞を〔³H〕チミジンの存在下で種々の活性物質で 24 時間刺激し、酸不溶画分に取り込まれた〔³H〕チミジンの放射活性を測定して定量した。

PIの加水分解反応は細胞を〔 ^3H 〕イノシトールで標識し、刺激により産生されたイノシトール1リン酸 (IP_1)、イノシトール2リン酸 (IP_2)、イノシトール3リン酸 (IP_3) を陰イオン交換カラムで分離し、放射活性を測定して定量した。

〔結果〕

静止期にある VSMC に WBS を作用させると IP_1 、 IP_2 、 IP_3 が用量依存性に産生された。セロトニン (S_2) 受容体の特異的拮抗剤であるケタンセリンは WBS によるこれらのイノシトールリン酸の産生を著明に抑制した。セロトニン (S_2) 受容体は PI の加水分解反応と共役しているが、実際、私共が調製した WBS 中には $11.0 \pm 1.0 \mu\text{M}$ のセロトニンが含まれ、この濃度のセロトニンは PI の加水分解反応を引き起こすに十分な濃度である。従って、VSMC において PI の加水分解反応を引き起こす WBS 中の主要因子がセロトニンであることが示された。

WBS は VSMC の DNA 合成を用量依存性に促進したが、ケタンセリンは WBS による DNA 合成を著明に抑制した。従って WBS による DNA 合成はセロトニンが重要な役割を果たしていると考えられた。実際、セロトニンは単独では DNA 合成をほとんど引き起こさなかったが、PDGF あるいは EGF による DNA 合成を相乗的に促進した。このようなセロトニンと PDGF や EGF による DNA 合成の相乗作用はケタンセリンにより抑制された。

〔考察〕

1974 年、Ross らは血清による VSMC の増殖促進作用に血小板からの放出物質が関与することを見いだした。その後、血小板より細胞増殖因子が分離、精製されて、PDGF が同定された。これらの知見に基づいて、1976 年、Ross と Glomset は傷害された血管壁に付着した血小板から放出される PDGF が動脈硬化巣における VSMC の増殖に中心的な役割を果たしているという仮説を提唱した。血小板放出反応後調整された WBS は最も強力に VSMC の増殖を促進するが、従来、WBS の VSMC 増殖促進作用は WBS 中に存在する PDGF によるものと推定されていた。私共は WBS の VSMC 増殖促進作用が PDGF だけでは説明できないこと、PDGF の VSMC 増殖促進作用には PI の加水分解反応が関与すること、更に、セロトニンも VSMC において PI の加水分解反応を引き起こすことに着目し、WBS の VSMC 増殖促進作用におけるセロトニンの役割を明らかにするために本研究を行った。その結果、WBS 中にはこの PI の加水分解反応を引き起こすに十分な濃度のセロトニンが存在すること、セロトニン (S_2) 受容体の拮抗剤であるケタンセリンにより WBS による PI の加水分解反応と DNA 合成が共に抑制されること、更に、セロトニンそれ自身にはほとんど DNA 合成促進作用は認められないが PDGF や EGF による DNA 合成を相乗的に促進することを示した。これらのことから、VSMC において PI の加水分解反応を引き起こし、他の細胞増殖因子の存在下に DNA 合成を促進する主要な血清中の因子がセロトニンであることを明らかにした。実際、人の血漿中には 6 nM 以下のセロトニンしか存在しないが、WBS 中には約 $11 \mu\text{M}$ のセロトニンが存在することから、動脈硬化巣での血小板凝集部位では、セロトニンが細胞増殖因子による VSMC の増殖を相乗的に促進するに十

分な濃度に達しているものと推定される。

セロトニンはPDGFと同様にPIの加水分解反応を引き起こすにも関わらず、PDGFと異なり、単独ではほとんどDNA合成を引き起こさないことから、VSMCにおいてはPIの加水分解反応だけではDNA合成を引き起こすに十分でないことが示された。PDGFにはPIの加水分解反応以外にもチロシンリン酸化反応を介する経路の存在が知られている。DNA合成の促進にはチロシンリン酸化反応を介する経路がPIの加水分解反応を介する経路と同時に作動することが必要であると推定される。

近年、動脈硬化巣におけるVSMCの増殖はPDGFと共にEGFやTGF β 等の細胞増殖因子やインターロイキン-1、TNF、インターフェロン γ 等のサイトカインからなるネットワークによって巧みに制御されていることが明らかにされつつある。今回の結果はセロトニンもこのネットワークの一員として細胞増殖因子によるVSMCの増殖を促進して動脈硬化巣の進展に促進的に作用する可能性を示している。

論文審査の結果の要旨

血管平滑筋細胞（VSMC）の増殖は、動脈硬化の発症、進展において中心的な役割を果たしている。従来より内皮細胞障害部位に凝集した血小板より放出される血小板由来細胞増殖因子（PDGF）が動脈硬化巣でのVSMCの増殖に主要な役割を果たしており、全血清（WBS）の最も強力なVSMCの増殖促進作用もPDGFによるものと推定されている。WBS中には血小板からPDGFと同時に放出される上皮増殖因子（EGF）やセロトニンなども含まれている。更に、私共はPDGFのVSMC増殖促進作用にはイノシトールリン脂質（PI）の加水分解反応とこの反応に引き続くCキナーゼの活性化が重要な役割を果たすことを明らかにしているが、VSMCにおいてはセロトニン（ S_2 作用）もPIの加水分解反応を引き起こす。今回は、VSMCにおけるWBSによるPIの加水分解反応とDNA合成促進作用におけるセロトニンの役割を検討した。

VSMCは雄日本白色家兔の胸部大動脈より explant 法にて採取した。10%牛胎仔血清（FCS）を含むDulbecco's modified Eagle's mediumを用い、37°C、5%CO₂気相下で継代培養した。3代目VSMCを飽和状態まで培養した後、medium中より48時間FCSを除去して細胞を静止期に同調した後実験に供した。

DNA合成は細胞を〔³H〕チミジンの存在下で種々の活性物質で24時間刺激し、酸不溶画分に取り込まれた〔³H〕チミジンの放射活性を測定して定量した。

PIの加水分解反応は細胞を〔³H〕イノシトールで標識し、刺激により産生されたイノシトール1リン酸（IP₁）、イノシトール2リン酸（IP₂）、イノシトール3リン酸（IP₃）を陰イオン交換カラムで分離し、放射活性を測定して定量した。

WBS中のセロトニン濃度は、高速液体クロマトグラフィにて測定した。

静止期にあるVSMCにWBSを作用させるとIP₁、IP₂、IP₃が用量依存性に産生された。セロトニン（ S_2 ）受容体の特異的拮抗剤であるケタンセリンはWBSによるこれらのイノシトールリン酸の

産生を著明に抑制した。セロトニン (S_2) 受容体は PI の加水分解反応と共役しているが、実際、私共が調製した WBS 中には $11.0 \pm 1.0 \mu M$ のセロトニンが含まれ、この濃度のセロトニンは PI の加水分解反応を引き起こすに十分な濃度である。従って、VSMC において PI の加水分解反応を引き起こす WBS 中の主要因子がセロトニンであることが示された。

WBS は VSMC の DNA 合成を用量依存性に促進したが、ケタンセリンは WBS による DNA 合成を著明に抑制した。従って WBS による DNA 合成はセロトニンが重要な役割を果たしていると考えられた。実際、セロトニンは単独では DNA 合成を殆ど引き起こさなかったが、PDGF あるいは EGF による DNA 合成を相乗的に促進した。このようなセロトニンと PDGF や EGF による DNA 合成の相乗作用はケタンセリンにより抑制された。

1974 年、Ross らは血清による VSMC の増殖促進作用に血小板からの放出物質が関与することを見出だした。その後、血小板より細胞増殖因子が分離、精製されて、PDGF が同定された。これらの知見に基づいて、1976 年、Ross と Glomset は傷害された血管壁に付着した血小板から放出される PDGF が動脈硬化巣における VSMC の増殖に中心的な役割を果たしているとする仮説を提唱した。血小板放出反応後調整された WBS は最も強力に VSMC の増殖を促進するが、従来 WBS の VSMC 増殖促進作用は WBS 中に存在する PDGF によるものと推定されていた。私共は WBS の VSMC 増殖促進作用が PDGF だけでは説明できないこと、PDGF の VSMC 増殖促進作用には PI の加水分解反応が関与すること、更に、セロトニンも VSMC において PI の加水分解反応を引き起こすことに着目し、WBS の VSMC 増殖促進作用におけるセロトニンの役割を明らかにするために本研究を行った。その結果 WBS 中にはこの PI の加水分解反応を引き起こすに十分な濃度のセロトニンが存在すること、セロトニン (S_2) 受容体の拮抗剤であるケタンセリンにより WBS による PI の加水分解反応と DNA 合成が共に抑制されること、更に、セロトニンそれ自身には殆ど DNA 合成促進作用は認められないが PDGF や EGF による DNA 合成を相乗的に促進することを示した。これらのことから、VSMC において PI の加水分解反応を引き起こし、他の細胞増殖因子の存在下に DNA 合成を促進する主要な血清中の因子がセロトニンであることを明らかにした。実際、人の血漿中には 6 nM 以下のセロトニンしか存在しないが、WBS 中には約 $11 \mu M$ のセロトニンが存在することから、動脈硬化巣での血小板凝集部位では、セロトニンが細胞増殖因子による VSMC の増殖を相乗的に促進するに十分な濃度に達しているものと推定される。近年、動脈硬化巣における VSMC の増殖は PDGF と共に EGF や $TGF \beta$ 等の細胞増殖因子やインターロイキン-1、TNF、インターフェロン γ 等のサイトカインからなるネットワークによって巧妙に抑制されていることが明らかにされつつある。今回の結果はセロトニンもこのネットワークの一員として細胞増殖因子による VSMC の増殖を促進して動脈硬化巣の進展に促進的に作用する可能性を示している。

本研究は血管平滑筋での全血によって引き起こされる細胞増殖作用機序について研究したものであるが、従来殆ど行われなかったセロトニンのホスホリパーゼ C 反応と DNA 合成における重要性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があるものと認める。