

(80)

氏名(生年月日)	ナガシマ ヒロキ 長嶋 浩貴
本籍	
学位の種類	博士(医学)
学位授与の番号	乙第1705号
学位授与の日付	平成9年1月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(博士の学位論文提出者)
学位論文題目	ヒト血管内皮細胞におけるカルシニューリンを介した情報伝達系—免疫抑制剤 FK506は一酸化窒素合成酵素のリン酸化を促進する—
論文審査委員	(主査) 教授 細田 瑛一 (副査) 教授 高桑 雄一, 香川 順

論文内容の要旨

〔目的〕

FK506は免疫抑制剤として重要であり, T細胞において, FK結合蛋白(FKBP)と結合してカルシニューリン(CN)の作用を阻害して転写活性を調節している。著者らは, 血管内皮細胞においても, CNを介する情報伝達系が存在し, 内皮型一酸化窒素合成酵素(EcNOS)がCNの基質であるという仮説をたて, それを検討するために, 培養ヒト血管内皮細胞において, FK506がEcNOSのリン酸化を促進し, 触媒活性を阻害するかどうかを検討した。

〔方法〕

培養ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を培養し, サブ・コンフルエントの状態で使用した。[³²P]正リン酸で標識したHUVECをTPA, CN, あるいはFK506で刺激し, 細胞内蛋白のリン酸化レベルを, また, 抗EcNOS抗体で免疫沈降し, EcNOSのリン酸化レベルをSDS-PAGEで評価した。さらに, 細胞培養上清中のNO代謝産物である硝酸イオンを測定した。

〔結果〕

総蛋白のリン酸化はTPAを加えた細胞では強くなっており, TPAとともにCNを加えた細胞では弱くなり, さらにFK506を加えることにより, 強くなった。TPA, CN, FK506は細胞内蛋白のリン酸化を変化させることが明らかになった。次に, EcNOSのリン酸化は, TPAで促進され, さらにCNを加えると抑制された。また, EcNOSのリン酸化は, FK506単独では変化しなかった。しかし, TPAにFK506を加えると, リン酸化レベルは, TPA単独よりも有意に上昇した。FK506は, TPAによるEcNOSのリン酸化をさらに促進させることが明らかになった。さらに, NO産生は, TPAにより抑制され, FK506を加えることによりさらに抑制された。

ン酸化レベルは, TPA単独よりも有意に上昇した。FK506は, TPAによるEcNOSのリン酸化をさらに促進させることが明らかになった。さらに, NO産生は, TPAにより抑制され, FK506を加えることによりさらに抑制された。

〔考察〕

TPAはPKCの活性化剤で, 細胞内蛋白をリン酸化することが知られている。ヒト血管内皮細胞においてもまた, PKCがEcNOSのリン酸化を促進し, NOSの酵素活性を抑制することを示した。CNはカルシウム・カルモデュリン依存性脱リン酸化酵素で, 細胞内蛋白のリン酸化レベルを調節することにより, 情報伝達系に欠かせないものとなっている。EcNOSがCNの基質になっており, 神経細胞におけるNO産生の制御に関与しているという報告がある。CNは, TPAによって促進されたEcNOSのリン酸化レベルを低下させ, EcNOSもまた, CNの基質になっていると考えられた。

免疫抑制剤であるFK506は, FKBPとともに, CNに結合し, 活性を阻害すると考えられている。FK506の, EcNOSのリン酸化によるNO産生に対する抑制作用は, EcNOSのCNによる脱リン酸化作用を阻害することにより, EcNOSを機能的に抑制した結果であると考えられる。血管内皮細胞が, 免疫担当細胞的な情報伝達系によってNOの産生を制御するということは, 血管内皮細胞の機能の異常に基づくと思われる動脈硬化性疾患の発症機序および病態形成を理解す

る上で非常に重要である。

〔結論〕

ヒト血管内皮細胞において、FK506は、CNの活性を

阻害することにより、EcNOSの機能を抑制し、NOの
産生を減少させる。

論文審査の要旨

本研究の目的：血管内皮細胞においてもカルシニューリン(CN)を介する情報伝達系が存在し、内皮型酸化窒素合成酵素 (ECNOS) がその基質となっていることを検討する。

この仮説を証明するために培養ヒト血管内皮細胞サブコンフルエントにおいて $[^{32}\text{P}]$ 正リン酸標識し、TPA, CN あるいは免疫抑制剤 FK506で刺激して細胞内蛋白のリン酸化レベルを、また ECNOS のリン酸化レベルを評価し、さらに培養上清中の NO 代謝物硝酸イオンを測定した。その結果 FK506を用いて ECNOS の CN による脱リン酸化作用を阻害すると TPA による ECNOS のリン酸化が促進され、NO 産生が抑制されることを示した。すなわち、ヒト血管内皮細胞において FK506が CN の活性を阻害することにより、ECNOS の機能を抑制し NO 産生を減少させる機序を解明した価値のある研究である。

主論文公表誌

ヒト血管内皮細胞におけるカルシニューリンを介した情報伝達系—免疫抑制剤 FK506は一酸化窒素合成酵素のリン酸化を促進する—

東京女子医科大学雑誌 第66巻 第9・10号
760-765頁 (平成8年10月25日発行) 長嶋浩貴

副論文公表誌

1) Influence of plasma lipoprotein (a) level on

coronary vasomotor response to acetylcholine (アセチルコリンによる冠血管運動反応に対する血清リポプロテイン (a) レベルの影響). J Am Coll Cardiol 26(5):1242-1250 (1995) 鶴見由紀夫, 長嶋浩貴, 市川健一郎, 細田瑛一

2) 肥大型心筋症の病像と診断. 臨成人病 25(12): 1673-1677 (1995) 川名正敏, 市川健一郎, 井口信雄, 長嶋浩貴