

氏 名	平 井 謙 造
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1680 号
学位授与の日付	平 成 11 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Protein-tyrosine-kinase-dependent expression of cyclo-oxygenase-1 and - 2mRNAs in human endothelial cells (ヒト血管内皮細胞における蛋白チロシンキナーゼ依存性 シクロオキシゲナーゼ-1 および-2mRNA の発現について) (主査)
論 文 調 査 委 員	教 授 成 宮 周 教 授 野 田 亮 教 授 内 山 卓

論 文 内 容 の 要 旨

プロスタサイクリン産生の律速段階酵素としてシクロオキシゲナーゼ (COX) が知られている。血管内皮細胞にはそのアイソザイムであるCOX-1とCOX-2の両者が存在している。しかしそれらの発現機構についてはよくわかっていない。これまで蛋白チロシンキナーゼ (PTK) がCOX活性の誘導に関与しているとの報告があるがCOX mRNAレベルでの発現誘導に関与しているのかどうかは不明である。本研究ではヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) を用い、蛋白チロシンフォスファターゼの阻害剤であるvanadate (VA) によるCOX-1, -2 mRNAの発現誘導をみた。またPTKの阻害剤であるtyrphostin-47を用いて、vanadateおよびinterleukin (IL)-1 α によるCOX-1, -2 mRNAの発現誘導にPTKが関与しているかどうかを検討した。

実験にはヒト臍帯より剥離し、3継代培養したHUVECを用いた。VAあるいはIL-1 α 刺激によるCOX-1, -2 mRNA発現誘導は刺激後RNAを抽出し、逆転写酵素反応によりcDNAを作成し、PCRをCOX-1, COX-2, G3PDH, 各々に対して行い、さらに各々のPCR産物をsouthern blottingして主に検討した。また一部、COX-1, -2 mRNA発現誘導は刺激後抽出したRNAを用い、COX-1, COX-2, G3PDH, 各々に対してnorthern blottingをして検討した。COX-1 mRNAの定量は競合鋳型DNAを作成し、competitive PCRを用いて行った。COX-1, -2の蛋白の発現あるいは蛋白チロシンリン酸化反応 (PTP) の検討は各々の特異抗体を用いたwestern blottingにより行った。

100 μ M VA刺激でのCOX-1, -2 mRNA発現誘導の時間経過をみた結果、COX-2 mRNAに関しては刺激4時間後で最大となり以後漸減した。またCOX-1 mRNAでは刺激12時間後に最大となり以後漸減した。各々の蛋白レベルの時間変化はCOX-2は刺激4時間後より認められ、6-12時間後に最大となり以後漸減した。一方COX-1は刺激前より認められ、刺激後も著明な変化はみられなかった。COX-1, -2 mRNAの発現誘導におけるVA刺激とIL-1 α 刺激との相乗効果をみた結果では10 μ M vanadate+0.1ng/ml IL-1 α の刺激により各々の10倍濃度で刺激した場合と同じか、それ以上にCOX-1, -2 mRNAの発現誘導が認められた。また50 μ M VA刺激によりPTPがみられた。20pMtyrphostin-47でHUVECを12時間前処理することにより50 μ M VAあるいは1.0ng/ml IL-1 α 刺激によるCOX-1, -2 mRNA発現誘導は阻害され、VAによるPTPも阻害された。

これらの結果からVA刺激によるCOX-1, -2 mRNA発現誘導にPTKが関与していると考えられた。またIL-1 α 刺激によるCOX-1, -2 mRNA発現誘導にもPTKが関与していることが示唆された。これまでCOX-2 mRNA発現誘導にPTKが関与しているという報告はあるが、本研究ではPTKの賦活剤と考えられるVAおよびその阻害剤であるtyrphostin-47を用い、より直接的にその関与を示し、さらにCOX-1 mRNA発現誘導にもそれが関与していることを初めて示した。

論文審査の結果の要旨

血管内皮細胞においてシクロオキシゲナーゼ (COX) はプロスタサイクリン産生の律速段階酵素であり、アイソザイムであるCOX-1とCOX-2が存在する。COX-1はconstitutiveに、COX-2はinducibleに発現するとされているがその発現の制御機構は不明である。本研究では蛋白チロシンキナーゼ (PTK) に着目し、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞を用い、COX-1,-2発現誘導に対するPTKの関与を検討した。

蛋白チロシンフォスファターゼ阻害剤であるvanadate (VA) 添加後、COX-1,-2 mRNA及びCOX-2蛋白の発現誘導と同時に蛋白チロシンリン酸化反応 (PTP) を認めた。また、COX-1,-2 mRNAの発現誘導においてVAとインターロイキン (IL)-1 α の間で相乗効果がみられた。一方、PTK阻害剤であるtyrphostin-47によりこれらのCOX-1,-2 mRNA発現誘導及びPTPは阻害された。以上よりVAまたはIL-1 α によるCOX-1,-2 mRNA発現誘導にPTKが関与していると考えられた。

本研究は血管内皮細胞におけるCOX発現機構の解明に貢献し、血栓性疾患の病態の理解に寄与する。

従って、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成11年1月13日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。