

令和 4 年 3 月

## 岡村昌宏 学位論文審査要旨

主 査 西 村 元 延  
副主査 今 村 武 史  
同 山 本 一 博

### 主論文

Thrombin induces a temporal biphasic vascular response through the differential phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase via protease-activated receptor-1 and protein kinase C

(トロンビンは時間的に2相性の血管反応を示し、その機序はPAR-1受容体とPKCを介する内皮NO合成酵素の異なるリン酸化にある)

(著者：岡村昌宏、三明淳一郎、友森匠也、高見亜衣子、澤野達哉、加藤克、小倉一能、辻本大紀、川谷俊輔、Kurniawan Priyono Agung、野津智美、久留一郎、山本一博、今村武史)

令和4年 Journal of Pharmacological Sciences 掲載予定

### 参考論文

1. Pretreatment with cilnidipine attenuates hypoxia/reoxygenation injury in HL-1 cardiomyocytes through enhanced NO production and action potential shortening

(シルニジピンはNO産生促進および活動電位短縮を介して、HL-1心筋細胞の低酸素/再酸素化損傷を軽減する)

(著者：湊弘之、久留一郎、倉田康孝、野津智美、仲宗根真恵、二宮治明、浜田紀宏、友森匠也、岡村昌宏、三明淳一郎、経遠智一、白吉安昭、遠藤涼、大槻明広、岡田太、稲垣喜三)

令和2年 Hypertension Research 43巻 380頁～388頁

# 学位論文要旨

Thrombin induces a temporal biphasic vascular response through the differential phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase via protease-activated receptor-1 and protein kinase C

(トロンビンは時間的に2相性の血管反応を示し、その機序はPAR-1受容体とPKCを介する内皮NO合成酵素の異なるリン酸化にある)

過凝固状態は心血管イベント発症に関連しており、臨床的に重要な問題である。特にトロンビンの産生の傍証であるD-dimerやTATは、臨床的に血栓形成がなくても、平時の値に比例して生命予後や心血管イベント発症と関連があることが報告されている。一方、血管内皮機能不全も同様に心血管イベント発症リスクである。しかし、トロンビンが血管内皮機能に及ぼす影響についての詳細は分かっていない。血管内皮機能の中心的役割を担っているのは内皮NO合成酵素(eNOS)である。eNOSの酵素活性は、主に促進性リン酸化と抑制性リン酸化で調節されている。In vitroの実験で、トロンビンが Protease-activated receptor-1 (PAR-1)を介して、eNOSの抑制性及び促進性の両者のリン酸化を起こしていることが報告されている。また、トロンビンの血管生理反応は、内皮依存性に血管拡張反応を起こすことが報告されているが、その経時的反応の詳細は不明である。本研究は、トロンビンによる血管生理反応とeNOSリン酸化修飾の両者を時間依存性に検討し、トロンビンによる内皮機能に対する影響を評価した。

## 方法

実験にはSprague-Dawleyラット(雄、12-16週齢)を用いた。麻酔下で胸部下行大動脈を摘出し、organ chamberに入れ、リング血管標本としてその等尺性変力を検討した。トロンビンの濃度依存的な等尺性変力作用、各種薬剤によるトロンビンの等尺性変力作用に対する影響を薬理的に検討した。また、トロンビンによるeNOSのリン酸化修飾レベルの経時的变化をhuman umbilical vein endothelial cells (HUVEC)を使用し、検討した。

## 結果

トロンビンは濃度依存的に最初に一過性の血管拡張作用を示し、その後に血管拡張減弱に転じる時間的2相性の反応を呈した。血管内皮除去およびNOS阻害薬(L-NAME)投与下では、トロンビンによるこれらの反応は消失した。PAR-1拮抗薬を加えると、トロンビンに

よる時間的2相性反応は減弱した。Protein kinase C (PKC)阻害薬投与下では、トロンビンの血管拡張作用は増強し、その後の血管拡張減弱反応は抑制された。トロンビンによるeNOSのリン酸化修飾は時間依存的であった。活性型 (Ser1177) のリン酸化は1分でピークに達し、一方で抑制型 (Thr495) のリン酸化は10分まで増加する傾向にあり、リン酸化のピークは異なっていた。PKC阻害薬投与により抑制型リン酸化の程度は減少した。

## 考 察

リング血管標本を使用した実験から、トロンビンによる時間的2相性反応は、eNOS依存性で、かつ、PAR-1の活性化を介していることが示された。また、トロンビンによる2相性反応の後半はPKCを介していることが示された。In vitroの実験で、トロンビンがPAR-1を介して、eNOSの抑制性及び促進性の両者のリン酸化を起こしていることが報告されている。リング血管標本で得られた血管反応はトロンビンによるeNOSの抑制性及び促進性のリン酸化の時間的差異で説明が出来る可能性が考えられた。実際に、HUVECを使用した実験で、トロンビンによるeNOS-Ser1177及びThr495のそれぞれのリン酸化の時間的差異を示した。また、PKCはeNOS-Thr495のリン酸化に関わっていた。以上から、トロンビンはPAR-1を介してeNOSの促進性及び抑制性リン酸化の両者を起こすが、その時間的ピークが異なっており、その結果として、時間的2相性反応を起こすと考えられた。PKCは後半の反応に関与しており、eNOS-Thr495のリン酸化を維持させた。eNOS-Thr495のリン酸化がeNOS機能不全を起こす可能性があるとの報告もあり、トロンビンが内皮機能不全を起こす機序の一つである可能性が示唆された。

## 結 論

トロンビンはPAR-1を介して時間的に2相性の血管反応を起こすことが示された。その機序として、血管拡張相ではeNOS-Ser1177 (活性型) のリン酸化、血管拡張減弱相ではeNOS-Thr495 (抑制型) のリン酸化、それぞれによるものであると考えられた。また、トロンビンによるeNOS-Thr495のリン酸化はPKCを介していた。今回の実験では、急性期反応ではあるものの、トロンビンによるeNOSのリン酸化修飾が時間的に異なる反応を起こすことが示された。活性型よりも抑制型のリン酸化の方が長く持続することから、過凝固状態 (トロンビン過剰) では、抑制型リン酸化が強くなることで、内皮機能不全に陥る可能性があると思われ、その証明は今後の課題と思われる。