

論文の内容の要旨

氏名：田 村 恵 理

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：血液凝固第IX因子の EGF-1 ドメインはトロンビンの血管内皮細胞への効果を増強する

目的

血液凝固第IX因子（FIX）は血液凝固に必須のタンパクである。その第一上皮成長因子（epidermal growth factor -1; EGF-1）ドメインは CXDXXXXYXCXC のコンセンサスアミノ酸配列を持ち、この配列にはエンドサイトーシスや脂質ラフトに関わる機能があると報告されている。エンドサイトーシスや脂質ラフトは、細胞膜上の受容体を介するシグナル伝達にかかわるため、このドメインは他の液性因子のシグナルを修飾する可能性がある。本研究では、FIX の EGF-1 ドメインが細胞内シグナルに及ぼす影響について検討する。特に、重要な凝固因子であるトロンビン（FIIa）のシグナル伝達との関係を明らかにする。

方法

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) により凝固第IX因子の EGF-1 ドメイン (EGF-FIX) をコードする配列を増幅し、発現ベクターである AP-tag4 ベクターに挿入した。作成したプラスミドを chinese hamster ovary (CHO) 細胞に導入してアルカリフォスファターゼ・タグ付きの組み換えタンパクを作製し、実験に用いた。ヒト臍帯静脈内皮細胞の培養液中に 1 pM の EGF-FIX を添加し、細胞染色やウエスタンブロットを用いて EGF-FIX のシグナル伝達を評価した。さらに、Wound Healing Assay を行い EGF-FIX による細胞遊走について評価した。

結果

EGF-FIX を作用させると、HUVEC に対する FIIa の Rho-ROCK (Rho-associated protein kinase) 系シグナル伝達活性が亢進され、直線的なアクチン線維が増えることが明らかとなった。この効果は、FIIa の受容体である protease-activated receptor-1 (PAR1) を介するシグナル伝達の修飾によると考えられた。また、FIIa と EGF-FIX の併用により、細胞内の PAR1 分布が変化し、細胞前後軸の極性への影響が示唆

されたことから、EGF-FIX は細胞遊走に関与している可能性がある。

結論

EGF-FIX は、培養血管内皮細胞の FIIa による Rho-ROCK 活性化を亢進させた。CXDXXXXYXCXC のコンセンサスアミノ酸配列を持つ凝固因子は、内皮細胞の FIIa への反応を強化し、FIIa の生理的・病理

的な効果に影響する可能性がある。