

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 血管平滑筋細胞の増殖、細胞死における核内受容体の役割

—エストロゲン受容体、NGFI-B の検討

指導教官 大内 尉義 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月 入学

医学博士過程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 渡辺 徳光

血管平滑筋細胞 (VSMC) の増殖は動脈硬化の発症、進展における重要なステップの一つであり、また冠動脈形成術後の再狭窄においても新生内膜肥厚は中膜 VSMC の遊走、増殖が主要な病態とされている。一方、そのような病態において細胞増殖のみならず細胞死、すなわちアポトーシスが存在することが知られている。これら VSMC の増殖やアポトーシスにおいて多くの転写因子が関与しているが、今回我々は 2 つの核内受容体に注目して検討を行った。一つはエストロゲン受容体 (ER) である。エストラジオール (E2) は血管壁への直接的な作用として VSMC の増殖抑制作用をもつことは私の所属する研究室も含め、すでに報告されている。近年新しく同定されたサブタイプ ER β は、ER α とは臓器によっては異なる性質を有する。VSMC では両 ER サブタイプが発現しており、E2 の増殖抑制作用は ER を介している。しかし、いずれのサブタイプが重要な

のかは *in vitro* において報告はなく、今回はまずその点について検討を加えた。さらに、Nerve Growth Factor Induced-B (NGFI-B) について VSMC のアポトーシスとの関連を検討した。NGFI-B はラット褐色細胞腫細胞において神経成長因子で誘導される遺伝子として同定された。この遺伝子は構造上ステロイドレセプタースーパーファミリーに属し、現在までそのリガンドが不明なオーファン受容体での一つでありその機能についてはほとんど不明である。近年 NGFI-B が T 細胞のアポトーシスにおいて必須であることが報告され、その後癌細胞のアポトーシスとの関連も明らかとなっている。しかし、VSMC における NGFI-B の発現と機能については知られていない。そこで今回、VSMC での NGFI-B 遺伝子の発現と VSMC のアポトーシスにおける関与について検討した。今回 2 つの核内受容体について検討を行ったためパートを 2 つに分け、パート I をエストロゲンの VSMC 増殖抑制作用におけるエストロゲン受容体サブタイプの役割、パート II を抗酸化剤 Pyrrolidinedithiocarbamate で誘導される VSMC のアポトーシスにおけるオーファン核内受容体 NGFI-B の役割と題して別個に考察を加えた。

実験にはラット VSMC を使用した。パート I ではヒト ER α 、ER β と ER β のドミナントネガティブ変異型を、パート II では NGFI-B を組み込んだ複製欠失型アデノウイルスベクターを作成し、それぞれ AxCAER α 、AxCAER β 、AxCAERDN β および AxCANNGFI-B と命名した。アデノウイルスの感染はウイルスを 2 時間 VSMC に曝露させ、その後各実験を行った。増殖実験は、VSMC を増殖停止させ、24 時間後 E2 を含む 5% 血清で刺激し、³H]-thymidine 取り込みと細胞数の算定により検討した。VSMC のアポトーシスは細胞密度によって規定されていることが報告されており、今回の検討では低および高細胞密度下で細胞を培養し PDTTC で処理した。アポトーシスの形態は Hoechst 33258 で染色して観察し細胞数を計測した。他のアポトーシスの定量的解析としてフローサイトメトリーにて FITC 陽性 propidium iodide 陰性をアポトーシス細胞として算出、DNA 断片を検出する EIA 法を用いてヒストン関連 DNA 断片を計測、および 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) Assay 法の 3 つを用いた。

パート I：ラット VSMC での ER α および ER β の内因性の発現を RT-PCR で確認した。また、E2 は VSMC の増殖を用量依存的に抑制することを確認した。次に VSMC

へ AxCAER α , AxCAER β および AxCADNER β を感染させ E2 の VSMC 増殖抑制作用に対する影響を検討した。ER β 過剰発現 VSMC は E2 非存在下では DNA 合成は変化しなかったが、100 nmol/L の E2 存在下で非存在下と比較して強力に multiplicity of infection (MOI)依存的に DNA 合成を抑制した。一方、AxCAER α を 10 MOI 以下で感染させた VSMC では DNA 合成の抑制作用は E2 の存在下でもほとんど増強がみられなかった。これに並行して、48 時間 5%血清で刺激した VSMC の細胞数の増加率は、ER β 過剰発現 VSMC では E2 の存在下で有意に減少したが、LacZ または ER α 過剰発現 VSMC においては減少を認めなかった。ER β 過剰発現 VSMC での抑制作用が実際に ER β を介していることを検討するために、ER β 過剰発現 VSMC に AxCAERDN β を共感染させた。AxCAER β を単独で感染させた VSMC は DNA 合成を約 70%減少させたが、AxCAERDN β の共感染により MOI 依存的にその抑制作用は減弱した。さらに、ER β の VSMC 増殖抑制作用における ER α の効果を検討した。10 MOI の AxCAER β で感染させた VSMC に対する 10 MOI の AxCAER α の共感染は増殖抑制作用に対して影響を与えなかった。細胞周期制御因子サイクリン A について、100 nmol/L の E2 添加 18 時間後の発現を検討した。血清刺激によってサイクリン A の発現は増加したが、ER β 過剰発現 VSMC では E2 の添加によってサイクリン A の発現は減弱した。一方、LacZ あるいは ER α 過剰発現 VSMC では E2 の添加によるサイクリン A の蛋白発現は有意な抑制はみられなかった。これによりサイクリン A は VSMC の ER β に対する応答遺伝子の一つである可能性が明らかになった。

ER β が VSMC の増殖制御に関与する直接的な証拠が本研究によって初めて示された。ER α に関しては、血清刺激せずに ER α を感染させても増殖促進には働かないこと、両 ER サブタイプを VSMC に共感染させたとき ER β の増殖抑制作用に影響を与えないこと、ER α を 30 あるいは 100 MOI といった高濃度で感染させると抑制作用が現れることから、ER α は VSMC の増殖において弱い抑制作用を持つ可能性が考えられた。以前に報告された ER のノックアウトマウスを用いた血管障害モデルでの検討からは ER サブタイプの役割についてはいまだ結論に至っていない。今後 ER β の作用についてラット頸動脈に ER β を過剰発現させた血管傷害モデルで検討する予定である。

パート II : VSMC を低あるいは高細胞密度下の条件で PDTC により処理すると、既報のとおり低細胞密度下においてのみ 24 時間後にアポトーシスが誘導さ

れた。1 μ M の PDTC 添加による NGFI-B の発現の経時的変化を検討した。低細胞密度下では PDTC 添加 1 時間後には mRNA の発現を認め、その後 6 時間後をピークに 12 時間後まで持続した。一方、高細胞密度下では mRNA の発現は 2 時間をピークとして一過性であり、PDTC 添加 4 時間後には基準値に戻った。両細胞密度下で蛋白発現の誘導は mRNA 発現とほぼ同様の挙動を示した。低細胞密度下で NGFI-B の mRNA 発現と EIA 法あるいは MTT アッセイから計測したアポトーシスの程度との間に強い相関が認められた。以上より NGFI-B の発現は PDTC により誘導される VSMC のアポトーシスと関連している可能性が示唆された。VSMC のアポトーシスを誘導する他の薬剤、3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors、sodium nitroprusside は NGFI-B mRNA の発現誘導を全く認めなかった。したがって NGFI-B mRNA の発現誘導はアポトーシスの誘導過程において必ずしも必須ではないことが示唆された。NGFI-B を過剰発現させた VSMC では細胞密度に関係なくアポトーシスは誘導されず、PDTC によるアポトーシスの誘導にも有意には影響を与えなかった。

NGFI-B の発現が遷延した場合にのみアポトーシスが起きるといふ今回の結果は Woronicz JD らの T 細胞ハイブリドーマにおける報告と同様であった。肺癌細胞や前立腺癌細胞のアポトーシスにおいても NGFI-B mRNA の発現は持続するという同様の報告もある。NGFI-B 遺伝子の持続発現が低細胞密度下の PDTC で誘導される VSMC のアポトーシスと関連していることを示したが、これは VSMC のアポトーシスに必須のものではなく PDTC のみが NGFI-B を誘導するメカニズムは不明である。また、NGFI-B 発現と VSMC アポトーシスとの因果関係は明らかにできなかった。今後アンチセンスあるいはドミナントネガティブ変異型の過剰発現といった手法を用いた NGFI-B の抑制実験が必要である。

本研究は VSMC の増殖、細胞死という動脈硬化において重要なステップについて、核内受容体による調節機構の側面から検討を行った。結果として(1)エストロゲンによる VSMC 増殖抑制には ER α よりも ER β が強く関与し、その下流にサイクリン A の発現を抑制する機序が存在すること、(2)心血管系ではほとんど検討を加えられていなかった NGFI-B 遺伝子が VSMC のアポトーシスに関与すること、の2点が示された。今後このようなメカニズムを紐解くことから新しい知見が得られ、動脈硬化に対する治療の応用へ結びつくものであると考えている。