

[ 別紙 2 ]

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 渡 辺 徳 光

血管平滑筋細胞 (VSMC) の増殖およびアポトーシスは、動脈硬化の発症、進展や冠動脈形成術後の再狭窄における重要な役割を演じていると考えられているが、その細胞内メカニズムには多くの転写因子が関与している。本研究はそのなかで2つの核内受容体、エストロゲン受容体 (ER) および Nerve Growth Factor Induced-B (NGFI-B)、に注目して検討を行い、下記の結果を得ている。

1. VSMC では内因性の ER  $\alpha$ 、ER  $\beta$  の両サブタイプとも発現していることを RT-PCR で確認し、ER のリガンドであるエストラジオール (E2) が血清刺激による VSMC の増殖を抑制することを確認した。作製したヒト ER  $\alpha$ 、ER  $\beta$  の cDNA を組み込んだアデノウイルスベクターを VSMC に過剰発現させ同様に血清刺激した。ER  $\alpha$  を感染させた細胞では 30 MOI 以下ではエストロゲン存在下でほとんど抑制作用に増強は認められなかったが、一方、5 MOI 以上の ER  $\beta$  を感染させた細胞ではエストロゲン存在下で 50 %以上の抑制増強作用を認め、ER  $\beta$  のドミナントネガティブ変異体を共感染させるとその作用は減弱した。細胞周期制御因子の一つである、サイクリン A について、E2 添加 18 時間後の発現を Western blotting で検討したところ、血清刺激によって VSMC でのサイクリン A の発現は増加した。ER  $\beta$  過剰発現 VSMC では E2 存在下で、そのサイクリン A の発現は減弱したが、ER  $\alpha$  過剰発現 VSMC では変化を認めなかった。これらの結果から E2

の VSMC 増殖抑制作用において ER  $\alpha$  よりも ER  $\beta$  がより強く関連し、その下流の応答遺伝子の一つにサイクリン A が挙げられる可能性が示された。

2. VSMC を低あるいは高細胞密度下の条件で Pyrrolidinedithiocarbamate (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。PDTC 添加による NGFI-B の発現の経時的変化を検討したところ、低細胞密度下では添加1時間後より発現し、その後、強力かつ持続した。一方、高細胞密度下では一過性であり、また、発現レベルは低値であった。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。VSMC のアポトーシスを誘導する他の薬剤では NGFI-B mRNA の発現誘導は全く認められず、VSMC の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を若干増強させたものの統計学的に有意ではなかった。以上より、直接的な因果関係は明らかにできなかったが、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。

以上、本論文は VSMC の増殖、細胞死について、核内受容体による調節機構の側面から検討を行った。エストロゲンによる VSMC 増殖抑制には ER  $\alpha$  よりも ER  $\beta$  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、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られ、学位の授与に値するものと考えられる。