

[別 紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名： 孫 輔 卿

本研究は心血管疾患の発生と深い関係がある血管石灰化においてその分子機序、また HMG Co-A 還元酵素阻害薬（スタチン）による影響を明らかにするため、培養ヒト大動脈血管平滑筋細胞（HASMC）にリンを刺激することにより血管石灰化を誘導する系にて、アポトーシスの関与と分子機序、またスタチンの効果を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. HASMC の石灰化は培地中のリン濃度を上げることにより誘導し、o-cresolphthalein complex 法により Ca 蓄積量の定量した結果、濃度（1.4~3.2 mmol/L）及び時間（3, 6, 10 日）依存的に増加した。また、von Kossa's 法による石灰化染色によった評価でも同じ結果が得られた。リン刺激による HASMC のアポトーシスは露出された histone を DNA と sandwich して検出する ELISA 法を用いて検討した結果、Ca 蓄積量と同じように濃度及び、時間依存的に増加した。リンにより誘導されたアポトーシスは caspase 依存的であり、caspase の阻害薬である ZVAD.fmk の添加によってアポトーシスも石灰化も有意に抑制された結果からアポトーシスは石灰化の誘導に必要であることが示された。
2. Gas6, Axl のタンパク発現と Gas6 の分泌が 2.6 mmol/L のリン刺激によって減少することを immunoblotting により示した。さらに、recombinant human Gas6 (rhGas6) を培地に添加すると、リン刺激によるアポトーシスも石灰化も濃度依存的に抑制さ

れた。また、rhGas6のアポトーシス、石灰化抑制効果は、受容体であるAxlの細胞外ドメイン(Axl-ECD; rhGas6と結合し、その作用を消去する)の添加によってブロックされることからリン刺激によるアポトーシス誘導にGas6-Axl系が関与していることが示された。

3. リン刺激によって活性型Aktが減少すること、rhGas6の添加によってp-Aktの発現が非リン刺激状態に戻ることがimmunoblottingにより示された。またPI3Kの特異的阻害薬であるwortmannin添加によってrhGas6によるAktリン酸化の復元効果ならびにrhGas6による石灰化抑制効果が消去されることが示され、Gas6-Axl系の下流のシグナル分子としてPI3K-Akt pathwayがあることが考えられた。リン刺激によるアポトーシスにおいてBcl2、Badのリン酸化が低下し、またrhGas6の添加によりBcl2とBadのリン酸化の低下を復元させることから、Bcl2 familyもGas6-Axl survival 経路に関与していることが示唆された。
4. スタチンの血管石灰化に対する影響において、水溶性スタチンであるプラバスタチンと、脂溶性スタチンであるアトルバスタチン、フルバスタチンはいずれも濃度依存的に、リン刺激(2.6 mmol/L)によるHASMCの石灰化を抑制した。von Kossa's法による石灰化染色によった評価でもスタチンの抑制効果が得られた。
5. リン刺激によって誘導されるアポトーシスを3種類のスタチンともに抑制し、同時にGas6, Axlの発現の増加、Akt、Badのリン酸化を増加させることが明らかになった。しかしながら、スタチンはもう一つの石灰化の機序として報告されているNPC活性に対して有意な抑制効果は示さなかった。このことから、スタチンによるHASMCの石灰化抑制効果はリンによるGas6-Axl系のdownregulationを阻止し、Akt、Badを介してアポトーシスを抑制することによってもたらされると考えられた。

以上、本論文はリン刺激による血管平滑筋細胞の石灰化において、アポトーシスの役割から、機序として Gas6-Axl survival pathway の関与を明らかにした。また様々な機序によって動脈硬化の進展を予防する作用を有すること (pleiotropic effect) が注目されているスタチンの血管石灰化の抑制効果及びその機序を明らかにした。本研究は血管石灰化の分子機序の解明及びその調節に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。