

論文の内容の要旨

論文題目 L-アスコルビン酸による血管平滑筋細胞の分化
および形質制御に関する細胞生物学的研究

氏 名 荒川 絵美

<序>

動脈硬化あるいは冠動脈形成術（PTCA）後再狭窄の主因のひとつに、平滑筋細胞の血管内膜への遊走亢進および異常増殖をあげることができる。これまでに平滑筋細胞の増殖を抑制する薬剤の探索が盛んに行われてきたが、細胞選択性や細胞毒性などの問題から、臨床上有効性が確認された物はほとんどない。そこで新たな視点で平滑筋細胞の増殖・遊走を特異的に抑制する薬剤を開発することが必要と考えられる。私は、新しい薬剤探索の指標として、平滑筋細胞の形質変換に着目した。動脈硬化巣で観察される平滑筋細胞は、正常の平滑筋細胞と比べ脱分化した形質を示し（形質変換）、増殖能、遊走能が亢進していると考えられている。そこで、平滑筋細胞の形質を脱分化型から分化型に誘導することができれば、平滑筋細胞の増殖・遊走を特異的に抑制できるのではないかと考えた。

これまでに平滑筋細胞の形質変換のメカニズムはほとんど明らかにされておらず、また脱分化した平滑筋の形質を分化型へ誘導できる因子は見つかっていない。その大きな理由として、平滑筋細胞の分化の簡便な指標がなかったこと、そして *in vitro* で平滑筋細胞の分化・脱分化を再現できる培養系が存在しなかったことが挙げられる。近年、主にウサギを用いた解析から、平滑筋の形質変換に相関して、分化マーカーの発現パターンが変化することがわかってきた。分化型平滑筋細胞では、平滑筋型ミオシン重鎖（SM1、SM2）、カルポニン-1、SM22 α といった平滑筋特異的タンパク質の発現が強い。一方、脱分化した平滑筋細胞では上記マーカーの発現は著しく減少し、非筋型ミオシン重鎖（SMemb）

などの発現が高くなっている。そこで、これらの分化マーカーの発現を指標に、*in vitro* で平滑筋細胞の形質変換を再現する系を構築できれば、平滑筋細胞分化のメカニズム解析が大きく進展し、また分化誘導を促進できるような形質制御薬の探索が可能になると考えた。

系の構築にあたり、平滑筋細胞への分化が可能な細胞として骨髄ストローマ細胞に注目した。骨髄ストローマ細胞は多分化能を有し、血球系細胞や中胚葉系の細胞に分化できることが知られている。近年、骨髄ストローマ細胞を接着培養系で長期間培養することにより、平滑筋様細胞に分化誘導できるという知見が報告された。そこで、温度感受性 SV40 large T 抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの骨髄より樹立されたストローマ細胞株 (TBR) を用い、平滑筋細胞への分化誘導系を構築した。そして、この分化誘導系の解析過程で、アスコルビン酸が平滑筋マーカーの発現を誘導することを見出した。

<結果と考察>

マウス・平滑筋分化マーカー遺伝子のクローニングと抗体の作製

平滑筋細胞の分化マーカーのなかでも、SM1 および SM2 は高度に分化した細胞にのみ発現し、脱分化過程の初期に発現が消失することから、鋭敏に分化を反映する有用なマーカーであるといえる。以下に述べるように、マウスやラット由来の細胞や動物モデルを用いて平滑筋細胞の形質変換を解析する際に、SM1 および SM2 遺伝子の発現を指標の一つとした。マウス SM1 および SM2 遺伝子の配列情報が報告されていなかったため、ウサギ SM2 遺伝子断片をプローブとし、マウス cDNA ライブラリーから完全長 cDNA をクローニングし、全塩基配列を決定した。

また、マウスおよびラットの SM1 を認識するモノクローナル抗体を作製した。ニワトリ砂囊平滑筋よりミオシタンパク質を精製し、これを抗原としてラットに免疫した。ラット脾臓細胞とミエローマ細胞 (P3-X63, Ag8-U1) を融合させハイブリドーマを作製し、マウス平滑筋型ミオシン重鎖に反応する抗体を産生するクローンを選択した。作製した SM1 抗体は、マウス、ラットの平滑筋型ミオシン重鎖 SM1/SM2 を特異的に認識することがウェスタンブロットにより確認された。さらにマウス・カルポニン-1、SM22 α GST 融合タンパクを大腸菌で生産し、これを抗原としてポリクローナル抗体を作製した。このようにして、マウス、ラットの平滑筋形質マーカーの検出系をそろえることができた。

平滑筋細胞への分化誘導系の構築と、分化誘導因子の探索

温度感受性 SV40 large T 抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの骨髄より樹立されたストローマ細胞株 (TBR) 24 クローンを、東北大・帯刀益夫先生から入手した。培養液、培養温度などの条件を変化させ、平滑筋特異的な分化マーカー (SM1、 α -アクチン、カルポニン-1、SM22 α) の発現を指標に、平滑筋細胞への分化能を持つクローンを探索した。その結果、培養液を arrested medium (RITC-80-7、2% FBS) から differentiation medium (α -MEM、10% FBS) に交換して2週間培養することにより、 α -アクチン、カルポニン-1、SM22 α のタンパク質レベルでの発現が誘導される2クローン (TBR-B 株、TBR-10-1 株) を見出した。平滑筋細胞の分化マーカーの発現が誘導される骨髄細胞株はこれまでに報告がなく、はじめての知見である。2つの培地の成分を比較し、differentiation medium

に多く含まれる成分の中から平滑筋マーカーの発現を誘導する因子を探索した。その結果、L-アスコルビン酸 (300 $\mu\text{mol/L}$: α -MEM にのみ含まれている) を arrested medium に添加して培養すると、平滑筋分化マーカーの発現が誘導されることが明らかとなり、L-アスコルビン酸は平滑筋細胞の形質制御作用を有する可能性が示唆された。

L-アスコルビン酸による *in vitro* 平滑筋形質変換制御作用

L-アスコルビン酸には抗酸化作用、細胞増殖抑制作用、創傷治癒作用など、抗動脈硬化作用に結びつく作用があることが知られているが、平滑筋細胞の形質に対する作用については報告されていない。そこで、ラット培養血管平滑筋細胞を用い、平滑筋形質マーカーの発現を指標に、L-アスコルビン酸の平滑筋細胞の形質に対する作用を調べた。平滑筋細胞は、生体から取り出して培養すると容易に脱分化することが知られている。L-アスコルビン酸を含まない培養液で平滑筋細胞を培養すると、10 日目には SM1 およびカルポニンの発現は消失した。一方、L-アスコルビン酸 (3~300 $\mu\text{mol/L}$) を添加した場合には、SM1 およびカルポニンの発現は濃度依存的に維持されることが明らかとなった。

L-アスコルビン酸による平滑筋形質制御メカニズム

アスコルビン酸には骨芽細胞や骨格筋細胞などの分化を促進する作用があることが報告されている。これらの細胞では、アスコルビン酸の分化促進作用はコラーゲン産生の亢進を介している。そこで、平滑筋細胞に対する作用にもコラーゲン産生が関与しているかどうかを、コラーゲン産生阻害剤・アゼチジン 2-カルボン酸を添加して検討した。平滑筋細胞の場合は、コラーゲン産生阻害剤が存在しても L-アスコルビン酸による発現上昇作用が認められ、コラーゲンとは別の機構で発現量を調節していることが示唆された。またアスコルビン酸類縁体のなかで、L-アスコルビン酸の前駆体であるグルノラクトン、酸化体であるデヒドロアスコルビン酸には発現上昇作用はなかった。一方、抗酸化作用のあるアスコルビン酸 2 リン酸やイソプロピリデンアスコルビン酸には L-アスコルビン酸と同様の発現上昇作用が認められた。このことから、L-アスコルビン酸および類縁体による平滑筋形質制御作用のメカニズムの 1 つとして抗酸化作用が考えられた。しかし、最近アスコルビン酸が ES 細胞を心筋細胞に分化させることが報告されたが、この系では抗酸化作用とは別のメカニズムと考えられている。アスコルビン酸特有の作用があるのかもしれない。

L-アスコルビン酸による *in vivo* 平滑筋形質制御作用

次に、生体内における L-アスコルビン酸の形質制御作用を調べるため、PTCA 後再狭窄のモデルである、ラット・バルーン傷害モデルに L-アスコルビン酸 (3 g/kg) を連続投与し、血管平滑筋細胞の形質の変化を調べた。コントロール群ではバルーン傷害後 1 週間で、傷害血管の平滑筋細胞が脱分化し、SM1 およびカルポニンの発現は減少した。これに対し L-アスコルビン酸投与群では、傷害血管において増殖してきた平滑筋細胞において SM1、カルポニンの発現が認められ、*in vivo* においても形質制御作用があることが示唆された。L-アスコルビン酸は、臨床で PTCA 後再狭窄抑制作用があることが既に報告されている。そのメカニズムの一つに平滑筋細胞の形質制御作用があると考えられる。

以上の結果から、L-アスコルビン酸には *in vitro* および *in vivo* において平滑筋細胞の分化および形質を制御する作用があることが示唆された。L-アスコルビン酸および類縁体は、平滑筋細胞の分化メカニズム解析の有用なツールとなること、また冠動脈疾患の治療薬に展開可能であることが考えられる。さらに今回構築した分化誘導系は、新たな治療薬の探索系として有望であると考えられる。

<まとめ>

温度感受性 SV40 large T 抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの骨髄より樹立されたストローマ細胞株 (TBR) を用いて平滑筋細胞への分化誘導系を構築した。そして、この分化誘導系を用いて、L-アスコルビン酸に平滑筋細胞への分化誘導能があることを見出した。さらに、L-アスコルビン酸には平滑筋細胞の形質を制御する作用があることを *in vitro* (培養平滑筋細胞) および *in vivo* (病態モデル) で明らかにした。