

審査の結果の要旨

氏名 荒川 絵美

動脈硬化あるいは冠動脈形成術（PTCA）後再狭窄の主因として、平滑筋細胞の血管内膜への遊走亢進および異常増殖がある。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てきた。荒川は、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、増殖能、遊走能が亢進している。そこで、平滑筋細胞の形質を脱分化型から分化型に誘導し、平滑筋細胞の増殖・遊走を特異的に抑制する方策を考えた。

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、平滑筋の形質変換に相関して、平滑筋特異的タンパク質（平滑筋型ミオシン重鎖（SM1、SM2）、カルポニン-1、SM22 α ）の発現パターンが変化することがわかってきた。そこで荒川は、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。

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。TBR 株 24 クローンに対して、培養液、培養温度などの条件を変化させ、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、分化マーカー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、本研究によるはじめての知見である。さらに荒川は、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分化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を見出し、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を示した。

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、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。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。

骨芽細胞や骨格筋細胞では、アスコルビン酸はコラーゲン産生の亢進を介して文化促進する。そこで荒川は、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。その結果、平滑筋細胞は、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、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いこと、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あることを明らかにした。このことから荒川は、L-アスコルビン酸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を示唆した。

次に荒川は、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。その結果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が、本研究から、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示唆される。

本研究において、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、L-アスコルビン酸および類縁体が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を示した。以上のような研究成果により、荒川絵美に対して、博士（薬学）の学位を授与するに値するものと認めた。