[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名　加 田 奈 々 絵

本研究は、血管リモデリング抑制に重要な作用をきたすと考えられる非環式レチノイド (ACR)の効果を明らかにするため、all-trans レチノイン酸 (ATRA)を比較対照とし、ACR の血管平滑筋細胞に対する効果の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. マウスカフ傷害モデルにコントロール(大豆油)、ATRA または ACR を負荷し、カフ断面を Elastica van Gieson 染色した結果、ACR 群では投与量依存性に新生内膜の形成が著明に抑制された。コントロール群、ATRA 群では新生内膜の形成が抑制されなかったことから、ACR は生体内で血管リモデリング抑制効果をもつことが示された。
2. 上記各群のマウスカフ傷害サンプルを用いて TUNEL 染色を行い、ACR 低容量群では、コントロール群に比べて新生内膜の細胞に TUNEL 陽性細胞を高率に認めた。また培養平滑筋細胞に ACR を負荷すると培養平滑筋細胞は高率に TUNEL 陽性を呈した。TUNEL 陽性細胞数は ACR の濃度増加に伴って上昇し、ACR は ATRA より濃度依存性に血管平滑筋細胞の増殖を抑制していた。ACR は血管平滑筋細胞のアポトーシスを誘導することが示された。
3. ACR または ATRA を負荷した血管平滑筋細胞の内因性レチノイン酸受容体(RAR)の発現を RT-PCR、ウエスタンブロットで検討し、RARα、RARγの発現はレチノイド投与による影響を受けないものの、RARβは ATRA より ACR のほうが早期にその発現を誘導することが示された。また ACR は RARβ存在下でもっとも、RAR 反応レスポンスエレメントの活性を上昇させることが、ルシフェラーゼアッセイにて示された。ATRA ではいずれの RAR サブタイプ存在下でも RAR 反応レスポンスエレメントの活性の上昇は同等であることから、ACR は RARβを優先的に介して作用していることが示された。

4. RARβを過剰発現させた血管平滑筋細胞は、RARβの発現量に比例してアポトーシスを生じた細胞の割合が上昇した。また ACR 低容量群のマウスカフ傷害サンプルを用いて RARβの免疫染色を行い、新生内膜の細胞に RARβ陽性細胞を高率に認めた。ACR による内因性の RARβの誘導または外因性の RARβの誘導が、血管平滑筋細胞のアポトーシスに関与していることが示された。
5. ACRはATRAよりKLF5安定発現細胞の増殖を抑制した。また免疫沈降ではACRは RARαに結合すると、KLF5 と RARαの結合を ATRA より減弱化させていた。さらに蛋白結合アッセイでは、ACR は KLF5-DNA binding domain と RARαの結合を ATRA より減弱化させていた。またルシフェラーゼアッセイによって、ACR は KLF5 と RARαの存在下で platelet-derived growth factor A の転写を抑制することが示された。ACR は RARβ低発現下では RARαを介し KLF5 の機能制御に関係している可能性があるものの、RARβ発現下では RARβを優先的に介して作用することから、この経路が ACR の効果発現に必要十分であるとは言い難いと考えられた。

以上、本論文は ACR の血管平滑筋細胞への効果の検討から、レチノイドの血管平滑筋細胞増殖抑制効果の作用機序の一つとして、in vivo においてレチノイドによりアポトーシスが誘導され細胞増殖抑制効果が生じること、また RARβが血管平滑筋細胞のアポトーシスを促進する機序があることを明らかにした。本研究はこれまで知られていなかった、in vivo でのレチノイドによる血管平滑筋細胞のアポトーシス促進、および血管平滑筋細胞の RARβの役割の解明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。