

## 審査の結果の要旨

氏名 田中 悌史

本研究は動脈硬化および炎症病態において重要な役割を担っていると考えられている serum amyloid A (SAA) および lysophosphatidylcholine (LPC) の分子生物学的役割を明らかにするため、培養ヒト冠動脈平滑筋細胞における SAA および LPC の作用について、特にシグナル伝達機構やイオンチャンネルに注目して検討を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. Fura2-AM を用いた細胞内カルシウムイオン濃度測定の結果、SAA および LPC は培養ヒト冠動脈平滑筋細胞において細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる。これは細胞外カルシウム free の状態と比較して、細胞外カルシウム存在下で著明に認められたことから、SAA および LPC による細胞内カルシウムイオン濃度上昇は主に細胞外からの流入によることが示唆された。
2. SAA による細胞内カルシウムイオン濃度上昇は非特異的な TRP チャンネル阻害薬である 2APB、SKF96365 によって抑制されたことから TRP チャンネルの関与が示唆された。LPC による細胞内カルシウムイオン濃度上昇は L 型および T 型カルシウムチャンネル阻害薬では抑制されず、非特異的陽イオンチャンネル阻害薬であるガドリニウムで抑制された。
3. 培養ヒト冠動脈平滑筋細胞においては TRP チャンネルファミリーのうち、TRPC1、C4、V1、V2、V4、M7、M8 の発現が確認され、さらに免疫染色およびウエスタンブロッティングの結果から、C1、C4、V4、M7 の発現が確認された。
4. 受容体に共役する G 蛋白質のうち、Gs 蛋白質の活性化薬であるコレラ毒素 (CTX)、Gi 蛋白質の阻害薬である百日咳毒素 (PTX) を用いた検討では、SAA による細胞内カルシウムイオン濃度上昇は PTX 前処置細胞で抑制された。しかし LPC による細胞内カルシウムイオン濃度上昇はいずれの毒素を前処置した細胞においても影響が認められなかった。またホスホリパーゼ (PLC) 阻害剤である U73122 を用いた検討でも、SAA によるカルシウムイオン濃度上昇のみ抑制された。このことから SAA による細胞内カルシウムイオン濃度上昇には Gi 蛋白質-ホスホリパーゼを介したシグナル伝達経路が関与していることが推測された。
5. これらのシグナル伝達経路に関与する TRP チャンネルの特定のため、TRPC4 に対する small interfering RNA (siRNA) による検討を行った。TRPC4 に対する

siRNA を transfection させた培養ヒト冠動脈平滑筋細胞においては、TRPC4 の mRNA 発現が抑制されるとともに、SAA による細胞内カルシウムイオン濃度上昇が抑制された。このことから培養ヒト冠動脈平滑筋細胞における SAA による細胞内カルシウムイオン濃度上昇には TRPC4 が関与していることが裏付けられた。

以上、本論文は培養ヒト冠動脈平滑筋細胞(hCASMCs)において、fura2-AM を用いた検討から、SAA および LPC が細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させることを明らかにした。さらに百日咳毒素・コレラ毒素・PLC 阻害薬を用いた検討から SAA によるこの作用には Gi 蛋白質-ホスホリパーゼ系のシグナル伝達経路を介していることが明らかとなり、さらに siRNA による検討から TRPC4 が関与していることが明らかとなった。

本研究は今まで未知に等しかった SAA によるヒト冠動脈平滑筋細胞におけるシグナル伝達経路の一端を解明し、動脈硬化および炎症病態における分子生物学的機構の解明に貢献すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。