

## 論文の内容の要旨

論文題目：血管平滑筋細胞の分化・増殖・遊走の機能解析及びその機能に対する食品由来成分の作用機構の検討

氏名：車 炳允

血管は血液を末梢臓器まで運び生体の恒常性を保つのが主要な役割であり、その構造は内腔、内膜、中膜、外膜で構成されている。

血管の病変による疾患の中で最も死亡率の高い動脈硬化（arteriosclerosis）は動脈壁が血管平滑筋細胞（vascular smooth muscle cells）の増殖によって肥厚し、リモデリングされ、弾性を失って硬くなり、その結果、内腔の狭窄あるいは機能の低下を示す動脈病変の総称である。

血管壁の中膜はほとんどが平滑筋細胞で構成されており、動脈硬化を予防・改善するには平滑筋細胞の形質変換・増殖・遊走のメカニズムを明らかにする必要がある。

平滑筋細胞による血管リモデリングには、細胞外基質を基質とするマトリックスメタロプロテアーゼ（matrix metalloproteinase : MMP）が深く関与していることが知られている。さらに、血管損傷によって刺激された血管細胞およびマクロファージはサイトカイン（主に、tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$ と

platelet-derived growth factor (PDGF) -BB) を分泌し、平滑筋細胞の形質変換・増殖・遊走能を調節していることが知られている。

本研究の目的は、(1) 粥状動脈硬化進行中の血管リモデリングにおける血管平滑筋細胞の形質変換とそれに伴う MMP 産生に対するサイトカインの作用機構を解析すること、(2) 老化に伴う心血管疾患を想定した *in vitro* モデルにおいて炎症性サイトカインの作用機構を解析すること、(3) サイトカインによるヒト平滑筋細胞の形質変換・増殖・遊走能に対する天然由来化合物の阻害作用を明らかにすることである。

## 1. ヒト平滑筋細胞の MMP-9 転写調節におけるシグナル伝達経路

粥状動脈硬化の進行に関与するとされているマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9) について、その転写調節におけるシグナル伝達経路の役割および重要性を検討した。

炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  はヒト動脈平滑筋細胞の MMP-9 分泌を刺激することを、ザイモグラフィおよびイムノブロット法により明らかにした。このほか TNF- $\alpha$  は転写レベルでも、MMP-9 の 5'フランキンク領域の 710-bp のプロモーター活性を刺激した。また、転写因子 NF- $\kappa$ B の結合部位 (-601) および AP-1 の結合部位 (-82) が、TNF- $\alpha$  によって活性化するシスエレメントであることを、ゲルシフトアッセイおよび変異解析によって突き止めた。細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) の阻害剤である U0126 で処理すると、TNF- $\alpha$  によって誘導される MMP-9 の発現およびプロモーター活性が大幅にダウンレギュレートされたが、不活性な類似体 U0124 は何ら作用しなかった。さらに、TNF- $\alpha$  によって刺激される NF- $\kappa$ B および AP-1 のトランス活性化は、U0126 で処理することによって阻害された。その他、ヒト動脈平滑筋細胞にドミナントネガティブ Ras (RasN17) を一過性にトランスフェクトすることにより、TNF- $\alpha$  によって誘導された ERK 活性、MMP-9 の産生およびプロモーター活性が抑制された。RasN17 が過剰発現すると、TNF- $\alpha$  によって刺激された NF- $\kappa$ B および AP-1 の活性も失われた。

以上のことから Ras/ERK 経路の活性化は、ヒト動脈平滑筋細胞における MMP-9 発現の誘導に関与するものであることが明らかとなった。さらに、転写因子 NF- $\kappa$ B および AP-1 が、TNF- $\alpha$  に反応したヒト動脈平滑筋細胞における Ras/ERK を介した MMP-9 の調節に関与することも明らかにした。

## 2. In vitro における MASMC 細胞の老化に伴う増殖能の変化

老化に伴う平滑筋細胞増殖能の増大、細胞周期調節因子の変化、in vitro 細胞老化モデルにおける血管リモデリングと MMP-9 発現の関連性を検討した。

マウス大動脈平滑筋の初代培養細胞の若齢（1～3 継代）細胞および高齢（25～30 継代）細胞について、細胞および分子レベルでの変化を検討した。

in vitro 細胞の老化が進むと平滑筋  $\alpha$  アクチン（細胞骨格のタンパク質であり伸縮性に関与するタンパク質）のレベルが有意に低下することが明らかになった。高齢マウス大動脈平滑筋細胞は若齢マウス大動脈平滑筋細胞よりも、ウシ胎児血清（FBS）の刺激に応答して増殖する能力が高いことが認められた。その他、高齢マウス大動脈平滑筋細胞はサイクリン D1、サイクリン E、CDK2、CDK4 などの細胞周期関連タンパク質の発現量、CDK2 および CDK4 によるキナーゼ活性が高まっていた。さらに、高齢細胞では CDK 阻害因子 p21 の量が増加し、p27 値は低下していた。TNF- $\alpha$  の刺激による MMP-9 の発現も高齢マウス大動脈平滑筋細胞では増大することが明らかになった。さらに、転写因子 NF- $\kappa$ B および AP-1 が高齢マウス大動脈平滑筋細胞における TNF- $\alpha$  の刺激による MMP-9 発現調節に関与することを突き止めた。以上の結果から、老化に伴う平滑筋細胞増殖能の増大、細胞周期調節因子の蓄積、および MMP-9 の発現増加などが血管リモデリングに深く関与していることが考えられる。

## 3. PDGF によるヒト大動脈平滑筋細胞の増殖に対する天然由来化合物の探索とその作用機構解明

PDGF-BB によるヒト平滑筋細胞の形質変換・増殖・遊走能に対する天然由来化合物の阻害作用を検討した。

PDGF-BB は、血管疾患の発生および進行に最も強力な増殖因子の一つであり、ステント後の再狭窄および粥状動脈硬化にも深く関与している。

天然由来化合物であるクリソエリオールは、フラボノイドの一種であり抗酸化活性および抗炎症活性などは知られていたが、本研究で平滑筋細胞増殖抑制作用を初めて見出した。

クリソエリオールは、PDGF（20 ng/mL）によって誘導されるヒト動脈平滑筋細胞の遊走を抑制した。また、クリソエリオールは、細胞毒性は示さない濃度で DNA 合成能を濃度依存的に抑制した。さらに、PDGF によるアクチンフィラメントの解離も遮断した。このことから、クリソエリオールは細胞の増殖

時に現れる細胞骨格の解離も抑制することが認められた。

さらにクリソエリオールは、PDGF 受容体 $\beta$ のリン酸化を濃度依存的に阻害し、ERK1/2、p38 および Akt のリン酸化など、PDGF 受容体 $\beta$ 下流のシグナル伝達経路も阻害した。

従って、クリソエリオールは PDGF による PDGF 受容体 $\beta$ のリン酸化や ERK1/2、p38 および Akt のリン酸化などのシグナル経路を阻害することで平滑筋細胞の遊走や増殖を抑制し、動脈硬化症の予防や改善に有用であると考えられる。

動脈硬化の予防および治療目標は炎症除去、病変進行阻止、および術後の再狭窄防止を図ることである。

本論文では平滑筋細胞の増殖や遊走に炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や増殖因子である PDGF-BB が関与すること、Ras/ERK 経路の活性化と転写因子 NF- $\kappa$ B および AP-1 が MMP-9 の調節に関与することを明らかにした。さらに、細胞老化が進むとサイトカインや増殖因子に対する感受性が高くなり、増殖能の増大、細胞周期調節因子の蓄積、および MMP-9 の発現増加などによる血管リモデリングが活性化されることも明らかにした。これらのシグナル伝達経路や転写因子は動脈硬化の病変進行阻止および術後の再狭窄防止のターゲットになると考えられる。

また、増殖因子の刺激による平滑筋細胞の増殖や遊走を阻止する天然由来低分子化合物としてクリソエリオールを見出し、その作用機構も明らかにした。これらの天然由来低分子化合物は動脈硬化の予防や改善に有用であることが期待される一方、その安全性については更なる検討が必要である。今後は非臨床試験および臨床試験を通じて知見が集積され、そのリスク・ベネフィットが議論されることが望まれる。