

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 車 炳允

血管病変の代表例である動脈硬化は、動脈壁が血管平滑筋細胞の増殖によって肥厚化し、リモデリングされ、弾性を失って硬化し、血管の狭窄や機能低下を起こす病変である。この予防・改善を考える上で、血管平滑筋の形質変換・増殖・遊走等のメカニズムとその制御因子を明らかにすることは重要である。本研究は、(1) 動脈硬化進行中の血管リモデリングにおける平滑筋細胞の形質変換とそれに伴う matrix metalloproteinase (MMP) 産生の機構の解析、(2) 老化に伴う心血管疾患を想定した *in vitro* モデルにおける炎症性サイトカインの作用機構の解析、(3) 細胞増殖因子が誘導する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の解析を目的におこなわれたもので3章からなる。

緒言に続く第1章では、ヒト動脈平滑筋での炎症に関わる MMP の産生調節機構について検討している。まず、炎症性サイトカインである TNF- α がヒト動脈平滑筋細胞の MMP-9 分泌を刺激することを見出し、それが MMP-9 の 5'調節領域 710-bp に存在するプロモーターの活性を刺激したことによる転写レベルの変化であることを見出した。また、転写因子 NF- κ B の結合部位 (-601) および AP-1 の結合部位 (-82) が、TNF- α によって活性化するシスエレメントであることを明らかにした。さらに、ドミナントネガティブ Ras (RasN17) を用い、TNF- α によって誘導される ERK リン酸化と MMP-9 の産生に Ras が関与していることを示した。以上のことから、Ras/ERK 経路の活性化が、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、さらに MMP-9 活性化に NF- κ B および AP-1 が関与することを明らかにした。

第2章では、老化に伴う平滑筋細胞増殖能の増大や細胞周期調節因子の変化を明らかにするために、*in vitro* 細胞老化モデルを用いて血管リモデリングと MMP-9 発現の関連性を検討している。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) 細胞を観察した結果、細胞の老化に伴う α アクチン量の有意な低下が認められた。また、若齢より高齢細胞の方が増殖因子などの刺激に対し高い増殖能を示した。さらに、高齢細胞では細胞周期関連タンパク質であるサイクリン D/E の発現量および CDK 2 や CDK 4 のキナーゼ活性が増加するとともに、CDK 阻害因子 p27 のレベルが低下していた。TNF- α の刺激による MMP-9 の発現はマウスの高齢平滑筋細胞でも増大すること、転写因子 NF- κ B および AP-1 が高齢細胞における TNF- α 刺激による MMP-9 発現調節に関与することも見出された。以上の結果から、細胞の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示唆された。平滑筋細胞における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推測している。

血小板由来因子 PDGF-BB はヒト平滑筋細胞の形質変換・増殖・遊走を刺激する。そこで第 3 章では、PDGF-BB によって誘導されるヒト大動脈平滑筋細胞の増殖、遊走、シグナル伝達経路の活性化などを抑制する天然由来化合物について検討している。天然物ライブラリーから見出されたフラボノイドの 1 つであるクリソエリオールは平滑筋細胞の増殖を濃度依存的に抑制し、さらにその遊走を顕著に抑制した。さらに、クリソエリオールは PDGF が誘導する細胞増殖に伴って観察される細胞骨格（アクチンフィラメント）の解離も抑制することが認められた。細胞増殖や遊走に関わる細胞内シグナル伝達経路に及ぼすクリソエリオールの影響について検討した結果、クリソエリオールは PDGF 受容体 β のリン酸化、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することが見出された。以上の結果から、動脈硬化症の予防や改善における本フラボノイドの有用性が期待できるとしている。

以上、本論文は、動脈硬化の進行に関わる血管平滑筋の増殖・分化・遊走などの機能の解析を炎症誘導物質、細胞の老化、天然化合物による制御といった多様な視点から検討したもので、学術的、応用的に貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。