

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
西口 太	主査 教授 花 房 俊 昭 副査 教授 北 浦 泰 紀 副査 教授 大 槻 勝 紀 副査 教授 宮 崎 瑞 夫 副査 教授 芝 山 雄 老
主論文題名 <b>Different migratory and proliferative properties of smooth muscle cells of coronary and femoral artery</b> (冠動脈と大腿動脈における平滑筋細胞遊走能および増殖能の差異に関する研究)	
学位論文内容の要旨	
<p>《目的》</p> <p>ヒト冠動脈の内膜面積は、50～60歳には中膜面積の4倍にも達するとされ、内膜肥厚は他動脈よりも早く、10歳代ですでに始まる。また経皮的冠動脈形成術 (PTCA) 後の再狭窄率は、大腿動脈に対する経皮的動脈形成術後の再狭窄率よりも高いことが知られている。これらの事実から、冠動脈は他動脈に比較して内膜肥厚を生じやすいと推測されてきた。しかし、冠動脈と他動脈の差異の詳細については未だ明らかではない。そこで我々は、冠動脈と他動脈の細胞生物学的差異を明らかにするため、イヌの動脈擦過モデル、およびブタ動脈の平滑筋細胞 (SMC) 培養系を用い、比較検討した。</p> <p>《方法》</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>イヌ動脈擦過モデルにおける検討: 雌性ビーグル犬 (10-12Kg) に 10g/日のコレステロール食負荷を2ヶ月間行ったのち、PTCA 用バルーンカテーテルを用いて冠動脈および大腿動脈を擦過した。両血管で傷害の程度を同等にするため、バルーン径:血管径=1.2 に統一し、直線部分のみを擦過した。擦過 28 日目の両血管を採取し、内膜/中膜面積比 (I/M) を計測した。次に、傷害3日目における中膜 SMC の増殖活性を検討するため、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を筋肉注射し、10 時間後に動物を屠殺して、免疫組織染色により BrdU の血管への取り込みを測定した。</li> <li>ブタ動脈平滑筋培養細胞における検討:       <ol style="list-style-type: none"> <li>細胞培養: ブタ冠動脈と大腿動脈からコラゲナーゼを用いて ex plant 法で初代培養を行い、in vitro における SMC の増殖能、遊走能につき比較検討した。</li> <li>細胞増殖能の検討: 血清 (10%胎牛血清) 刺激下における培養開始後 4 日目までの両 SMC の細胞増加度を比較した。次に、両 SMC を無血清の状態ですべて8時間培養した後の BrdU 取り込み率を測定した。</li> <li>細胞遊走能の検討: 改良型 Boyden chamber 法を用いて、PDGF-BB 及び血清刺激下の両 SMC の遊走能を比較検討した。また、培養皿に散布された両 SMC にチップにて擦過線を加え、21 時間後までの両 SMC の移動幅を測定して遊走能を比較検討した。</li> <li>細胞表現型の検討: 両 SMC における表現型の相違を調べるため、血清刺激下 5 日目の両 SMC を用いて、Western blot 法により SMC の表現型マーカーであるミオシン重鎖アイソフォームの SM2、SMemb、および中間系フィラメントであるデスミンの発現量について比較検討した。次に、両 SMC における血清刺激時のミオシン軽鎖リン酸化を、グリセロールポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて測定した。</li> <li>細胞内シグナル経路の検討: 両 SMC に対し、Rho-kinase の特異的阻害剤である Y-27632 とミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) の特異的阻害剤である ML-9 を添加し、両 SMC の PDGF-BB 刺激下の遊走活性について改良型 Boyden chamber 法を用いて検討した。</li> </ol> </li> </ol>	

#### 《結果》

1. イヌ動脈擦過モデルにおける検討:バルーン擦過 28 日目の冠動脈 (I/M=0.70±0.18) では、大腿動脈 (I/M=0.16±0.03) に比してより高度の内膜形成を認めた。傷害3日目の冠動脈 (46.3±5.0%) は大腿動脈 (8.8±2.5%) に比し、中膜の BrdU 取り込みが高率であった。この結果から、冠動脈の SMC は大腿動脈に比し、増殖活性が高く内膜形成が高度であると考えられた。
2. ブタ動脈平滑筋培養細胞における検討:冠動脈 SMC は大腿動脈 SMC に比し、有意に細胞数の増殖速度が速かった。また、冠動脈 SMC (81.5±4.6%) は大腿動脈 SMC (30.8±4.6%) に比し、有意に BrdU 取り込み率が高値であった。次に、PDGF-BB 及び血清刺激下の両 SMC の遊走能を比較すると、冠動脈 SMC が大腿動脈 SMC よりも有意に大きかった。また、チップ擦過後の両 SMC の移動幅も、冠動脈 SMC が大腿動脈 SMC に比し遊走能が大であった。以上より、培養細胞においても、冠動脈 SMC は増殖能および遊走能が大腿動脈 SMC よりも高いことが示唆された。血清刺激下 5 日目の両 SMC の間には、SM2、SMemb、デスミンなどの表現型マーカーの発現量に差は認めなかった。冠動脈 SMC は大腿動脈 SMC に比し、血清刺激前および刺激後 10 分、30 分において、リン酸化ミオシン軽鎖の割合が増大していた。しかも、血清刺激前の大腿動脈 SMC では冠動脈 SMC に比し 2 リン酸化ミオシン軽鎖の割合が低かった。阻害薬を用いた検討では、Y-27632 は両 SMC の遊走を共に抑制した。しかし、ML-9 は冠動脈 SMC の遊走を抑制したが、大腿動脈 SMC の遊走は抑制しなかった。

#### 《考察》

冠動脈の SMC は大腿動脈に比し、同等の傷害を受けてもより増殖活性が高く、内膜形成が高度であることが明らかになった。さらに、培養細胞においても、冠動脈 SMC は増殖能および遊走能が大腿動脈 SMC よりも高いことが示唆された。SMC には、成人中膜に主に存在し増殖能や遊走能の低い収縮型 SMC と、胎児中膜や新生内膜に存在し増殖能や遊走能の高い分泌型 SMC という表現型の異なる 2 種の SMC が存在するとされる。しかし、次の理由により両 SMC の増殖能、遊走能の違いは表現型の差によるものではないことが示唆された。

ミオシン軽鎖のリン酸化は、筋細胞の収縮に必須であるが、近年、細胞増殖や遊走においてもその重要性が報告されている。本研究では、両 SMC 間で血清に対するアクトミオシン系の活性様式が異なることが明らかになった。その差が冠動脈 SMC と大腿動脈 SMC の遊走能の差に関与している可能性が考えられる。ミオシン軽鎖のリン酸化は Rho-kinase と MLCK の両者により制御されている。そこで、SMC の遊走能に対し両キナーゼがどの様に影響しているかを調べるため、Y-27632 と ML-9 を用い、PDGF-BB 刺激下の遊走活性について改良型 Boyden chamber 法を用いて検討した。その結果、冠動脈 SMC では Rho-kinase と MLCK の両者がミオシン軽鎖のリン酸化に関与しているが、大腿動脈 SMC では MLCK の関与が低いと考えられた。

#### 《結論》

冠動脈は大腿動脈に比べ細胞増殖や遊走をおこしやすい。その差には、ミオシン軽鎖のリン酸化を制御する Rho-kinase と MLCK のバランスの差が関与していると考えられる。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第976号	氏名	西口 太
論文審査担当者	主査 教授 花房 俊昭 副査 教授 北 浦 泰 副査 教授 大槻 勝紀 副査 教授 宮崎 瑞夫 副査 教授 芝山 雄老		
主論文題名			
Different migratory and proliferative properties of smooth muscle cells of coronary and femoral artery (冠動脈と大腿動脈における平滑筋細胞遊走能および増殖能の差異に関する研究)			
論文審査結果の要旨			
<p>冠動脈は他の動脈に比べて内膜肥厚を生じやすいとされているが、その差異が何に起因するかについては未だ明らかではない。申請者は本研究において、冠動脈の細胞生物学的特性を明らかにするため、イヌの動脈擦過モデル、およびブタ動脈の平滑筋細胞 (SMC) 培養系を用い、比較検討している。</p> <p>イヌ動脈擦過モデルにおける検討では、冠動脈の SMC は大腿動脈に比し、増殖活性が高く内膜形成が高度であることを示している。ブタ動脈平滑筋培養細胞における検討でも、冠動脈 SMC は大腿動脈 SMC に比し、有意に増殖能・遊走能が高いことを示している。次に、SMC のミオシン軽鎖リン酸化の程度を分析し、冠動脈 SMC は大腿動脈 SMC に比し、血清刺激前および刺激後のリン酸化ミオシン軽鎖の割合が増大している成績を得ている。この成績は、両 SMC 間で血清に対するアクチン系系の活性様式が異なることが、冠動脈 SMC と大腿動脈 SMC の遊走能の差に関与している可能性を示している。さらに、ミオシン軽鎖のリン酸化酵素の阻害薬を用いた検討において、Rho キナーゼ阻害薬である Y-27632 は両 SMC の遊走を共に抑制している。一方、ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) 阻害薬である ML-9 は、冠動脈 SMC の遊走を抑制したが、大腿動脈 SMC の遊走は抑制しなかった。その結果、冠動脈 SMC では Rho キナーゼと MLCK の両者がミオシン軽鎖のリン酸化に関与しているが、大腿動脈 SMC では MLCK の関与が少ないと考えられる。</p> <p>本研究は、冠動脈と大腿動脈における平滑筋細胞の遊走能および増殖能に差異があることを実証している。またそのような差が生ずる一因として、ミオシン軽鎖のリン酸化を制御する Rho-kinase と MLCK のバランスの差が関与していることを明らかにしている。冠動脈疾患の病態に平滑筋細胞の増殖や遊走が大きく関わっていることより、本研究で得られた知見は、今後の冠動脈疾患の治療を考える上で重要な意味を持つと思われる。</p> <p>以上により、本論文が本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌)</p> <p>Atherosclerosis 171: 39-47, 2003</p>			