

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	羽賀将衛
学位論文題目			
Oscillatory shear stress increases smooth muscle cell proliferation and Akt phosphorylation. (動揺性血流ずり応力は血管平滑筋細胞の増殖と Akt リン酸化を促進する)			
共著者名 Akimasa Yamashita, Jacek Paszkowiak, Bauer E. Sumpio, Alan Dardik			
Journal of Vascular Surgery 誌 37 巻 1277 頁～1284 頁 平成 15 年 6 月			
研究目的			
<p>血管を構築するすべての成分は、循環動態によって生じる血圧および血管張力の作用を受けるが、通常の状態においては、内皮細胞のみが血流の生み出すずり応力(shear stress)に暴露される。しかしながら、血管傷害などにより内皮細胞が脱落すると、血流面に露出した血管平滑筋は shear stress に暴露され何らかの作用を受けると考えられる。一方、経皮的動脈形成術後の再狭窄や動脈バイパス術に用いた自家静脈グラフトの内膜肥厚においては血管平滑筋の増殖が見られ、内皮細胞傷害に伴う平滑筋細胞の血流への暴露、および病的状況における shear stress の量的および質的変化が平滑筋細胞の増殖に影響する事が推測される。</p> <p>laminar shear stress 本研究においては、安定した層状の laminar shear stress とは異なる動揺性の oscillatory shear stress が、血管平滑筋の増殖にどのように影響するか検討した。</p>			
材料・方法			
【細胞の採取、培養と shear stress への暴露】			
<p>最寄りの屠殺場にて、ウシの胸部大動脈を屠殺直後に譲り受け、直ちに PBS 液に浸漬した。縦切開し外膜を剥離、内膜を擦過除去した後、5mm 四方の切片とし、細胞培養皿において 10%ウシ血漿加培養液(Dulbecco modified Eagle medium, DMEM)に浅く浸漬した。光学顕微鏡にて紡錘形の細胞が遊走、増殖していることを確認した後、大動脈切片を除去、細胞を継代培養した。この細胞が平滑筋細胞であることは、形態的特徴および α-actin 抗体反応により確認した。</p>			

I型コラーゲンでコーティングした six-well plate の各 well に passage 3 から 6 の平滑筋細胞 50 万個を seeding し、0%血漿 DMEM に 24 時間おいた後、20%ウシ血漿加 DMEM に代え、LabLine 社製 orbital shaker を用いて平均動脈レベルである 14 dyne/cm² の shear stress に暴露、または静止状態に保った（コントロール群、0 dyne/cm²）。また、実験条件により、20%ウシ血漿加 DMEM に LY294002 (10 μmol/L) または wortmannin (25 nmol/L) を加えた。

【細胞数測定】

shear stress (0 または 14 dyne/cm²) 暴露前および暴露後 1、3、5 日に、各 well の細胞数を Coulter 社製 Model ZM 自動測定機を用いて測定した。

【³[H] thymidine 取込みの測定】

細胞数が増加した場合、それが DNA 合成の増加によるものかを確認するため、³[H] thymidine の取込みを測定した。20%ウシ血漿加 DMEM に ³[H] thymidine を加え 1 μCi/mL とし、shear stress (0 または 14 dyne/cm²) 暴露後 1、3、5 日に、Beckmann 社製 scintillation counter を用いて ³[H] thymidine の取込みを測定した。

【Akt リン酸化の分析】

細胞数の増加に関与する要因としては、細胞増殖の他、cell survival の促進があげられるが、本研究では、cell survival の promotor のひとつである Akt の活性を分析した。shear stress (14 dyne/cm²) 暴露後の平滑筋細胞における総 Akt およびリン酸化 Akt の発現を、ウェスタンブロット法により分析した。

成 績

six-well plate の各 well に 50 万個 seeding された平滑筋細胞は、0%血漿 DMEM において 24 時間で平均 342,560 個まで減少した。20%ウシ血漿加 DMEM に代えることにより再び細胞数は増加したが、shear stress (14 dyne/cm²) 暴露群ではコントロール群と比較して、shear stress 暴露 5 日までに平均 20.1%多く増加した。また、³[H] thymidine の取込みも、shear stress (14 dyne/cm²) 暴露群ではコントロール群と比較して、shear stress 暴露 5 日までに平均 33.4%多く増加した。

血管平滑筋を平均動脈レベルである 14 dyne/cm² shear stress に暴露することより、暴露後 60 分をピークとする Akt リン酸化の促進が認められた。この shear stress による Akt リン酸化の促進は、LY294002 または wortmannin によって抑制された。

考 案

本研究の結果は、次のように要約される。すなわち、血管平滑筋は、平均動脈レベルの動揺性 shear stress に反応して、細胞増殖と³ [H] thymidine の取込みを促進させ、また Akt の活性化も促進させた。

shear stress が血管平滑筋の増殖を促進させるという本研究の結果は、他の研究者たちの報告と異なるものであった。Sterpetti, Ueba はいずれも、shear stress は血管平滑筋の増殖を抑制すると報告している。しかし、彼らが用いたのは laminar shear stress であり、本研究における oscillatory shear stress とは性状が異なる shear stress である。異なる性状の shear stress の影響は、細胞増殖に対して異なるタイプの刺激として作用したと考えられる。laminar shear stress は安定した層流を反映したモデルであり、oscillatory shear stress のほうがより生理的な血流に近いと思われる。病的状況における血流のモデルとしては、laminar shear stress よりも oscillatory shear stress のほうが適しているであろう。

細胞数の増加は、細胞増殖の促進だけでなく cell survival の促進によってももたらされる。Akt は、血管平滑筋を含むさまざまな種類の細胞において cell survival を促進しアポトーシスを抑制することが知られている。本研究では shear stress が血管平滑筋において Akt の活性化を促進させることを示したが、このことは、shear stress による平滑筋細胞数の増加は、細胞増殖だけでなく cell survival の促進によっても説明される可能性を示唆する。

血管平滑筋において、growth factor などの刺激に反応して Akt が活性化されることが報告されており、また、growth factor による細胞増殖の促進が PI3K-Akt 系刺激伝達経路を介することも報告されている。血管平滑筋細胞は、生体内で通常は shear stress に曝されることはないが、内皮細胞の脱落を伴う動脈損傷によって、平滑筋細胞は動脈レベルの shear stress に暴露されることになる。本研究で示された shear stress による平滑筋における Akt の活性化は、血管損傷後の平滑筋増殖において PI3K-Akt 系が活性化されることの機序を説明しうる可能性がある。

結 語

血管平滑筋は、動揺性血流ずり応力に対して直接反応し、DNA 合成、細胞増殖および PI3-kinase-Akt 系信号伝達経路の活性化を促進する。これらの結果は、血管内皮細胞の脱落を伴う血管傷害において血管平滑筋が増殖する機序の一因を示唆する。

引用文献

1. Ueba H, Kawakami M, Yaginuma T. Shear stress as an inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation : role of transforming growth factor - β 1 and tissue-type plasminogen activator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1512-1516/
2. Dimmeler S, Assmus B, Hermann C, Haendeler J, Zeiher AM. Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells : involvement in suppression of apoptosis. *Circ Res* 1998;83:334-341.
3. Duan C, Bauchat JR, Hsieh T. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for insulin-like growth factor-I-induced vascular smooth muscle proliferation and migration. *Circ Res* 2000;86:15-23.

参考論文

1. Haga M, Chen A, Gortler D, Dardik A, Sumpio B E: Shear stress and cyclic strain may suppress apoptosis in endothelial cells by different ways. *Endothelium* 2003;10(3):149-157.
2. 羽賀將衛、大谷則史、清川恵子、川上敏晃：腹部大動脈、腸骨動脈領域における傍腹直筋切開と腹部横切開との比較. *日本心臓血管外科学会雑誌* 1998; 27(5):293-296.
3. 羽賀將衛、大谷則史、川上敏晃：下肢血行再建術後自家静脈グラフト瘤の1例. *日本血管外科学会雑誌* 1997;6(7)849-852.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	羽賀 将衛
審査委員長 笹嶋 唯博 ㊞			
審査委員 高井 章 ㊞			
審査委員 奥村 利勝 ㊞			
学 位 論 文 題 目			
Oscillatory shear stress increases smooth muscle cell proliferation and Akt phosphorylation.			
(動揺性血流ずり応力は血管平滑筋細胞の 増殖と Akt リン酸化を促進する)			
<p>血管平滑筋細胞は、通常、一層の内皮細胞に覆われており、生理的条件下では血流のずり応力、shear stress にさらされることはない。</p> <p>しかし、バルーン血管拡張術や何らかの内皮損傷といった病的状況においては、血管平滑筋が血流面に現れ、shear stress による影響を受けると考えられる。一方、動脈バイパス手術に使用された自家静脈グラフトやバルーン血管拡張術後の再狭窄病変においては、血管平滑筋の増殖を伴う内膜肥厚観察されるが、平滑筋細胞の数の増加には、細胞増殖とともにアポトーシスの抑制、cell survival も関与していると推測される。そこで本論文では、血管平滑筋細胞の増殖および cell survival において、shear stress がどのように作用を及ぼすかを検討した。</p> <p>実験の結果、(1) 14 dyne/cm² の sheara stress に暴露された血管平滑筋細胞では、コントロール群 (0 dyne/cm²) に比べて平均約 20% 多く細胞数が増加した。(2) トリチウム thymidine の取込みも、14 dyne shear stress 群ではコントロール群に比べて平均約 33% 多く増加した。</p>			

(3) cell survival の promotor のひとつである Akt は、血管平滑筋細胞を平均動脈レベルである 14 dyne/cm² shear stress に暴露することにより、活性化の促進が見られた。

安定した層流ずり応力である laminar shear stress を用いた研究者たちは、shear stress は血管平滑筋細胞の増殖を抑制すると報告したが、本研究で用いた oscillatory shear stress とは異なるタイプの shear stress であり、本研究で念頭においた病的状況のモデルとしては、oscillatory shear stress のほうが、より実際の血流に近いと考えられる。

本研究の結果、病的状況における血流の shear stress は、血管平滑筋細胞の増殖を促進させることが明示され、また、shear stress は血管平滑筋細胞における Akt の活性化も促進させアポトーシスを抑制することが示唆された。これらは、末梢動脈の閉塞性疾患の病態あるいはバイパス術後のグラフト不全の病態に対する研究の発展に貢献するところ大であると考えられる。なお、論文提出者に対する論文内容および関連領域に対する質問に対しては、適切、明解な回答が得られ、学力も十分と判断された。以上より、本審査委員会は、本論文は博士（医学）に値すると判定した。