

## 学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	浅田 秀典
学 位 論 文 題 目			
<p>Sustained orbital shear stress stimulates smooth muscle cell proliferation via the extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 pathway. (持続的な乱流シェアストレスは、ERK 1/2経路を介して血管平滑筋細胞の増殖を刺激する)</p> <p>Paszkowiak J, Teso D, Alvi K, Thorisson A, Franttini J, Kudo FA, Sumpio BE, Dardik A. と共著</p> <p>J Vasc. Surg. 2005 Oct;42(4):772-80. 平成17年10月</p>			
研 究 目 的			
<p>乱流シェアストレスは、<i>in vivo</i>実験において平滑筋細胞の増殖能と遊走能を刺激する。この作用は、特に内皮細胞障害部位において顕著である。持続的なシェアストレスが、<i>in vitro</i>においても血管平滑筋細胞の増殖能を刺激するか否かを確認するため、乱流シェアストレスによる平滑筋細胞への影響、特に増殖能、形質転換およびextracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2)の活性化を検討した。</p>			
材 料 ・ 方 法			
<p>ウシ胸部大動脈から血管平滑筋細胞を採取、継代培養し、継代3代から6代までの細胞を使用した。この血管平滑筋細胞を10日間210rpmのorbital shear stressに暴露した。この際、培養液にERK1/2の活性化阻害剤であるPD98059(10<math>\mu</math>M)またはp38の活性化阻害剤であるSB203580(10<math>\mu</math>M)を添加した群と添加しなかった群で、以下の検討を行った。増殖能は、直接細胞数を測定するとともにproliferation cell nuclear antigen (PCNA)の発現数を測定した。さらにウエスタンブロットにより、平滑筋細胞のERK1/2の活性化とphenotypic markers (<math>\alpha</math>-actin, calponin, vimentin, <math>\beta</math>-actin)を検討した。</p>			

## 成 績

10日間のorbital shear stressの暴露により、平滑筋細胞の細胞数は、静的状態に置いたコントロールより75%増加した。分化型フェノタイプマーカー ( $\alpha$ -actin, calponin) は減少し、合成型フェノタイプマーカー (vimentin,  $\beta$ -actin) は増加した。ERK1/2は、orbital shear stressにより活性化された。さらにERK1/2の阻害剤であるPD98059の存在下では、細胞数の増加は認められなかったにも関わらず、p38の阻害剤であるSB203580の存在下では細胞数増加が認められた。またPD98059の存在下では、各フェノタイプマーカーの変化は抑制された。

## 考 案

今回我々は、*in vitro*実験において長期にわたるorbital shear stressは、血管平滑筋細胞の増殖能を刺激するとともに、少なくともERK1/2経路がこの増殖能に関係していることを明らかにした。また同時にこのERK1/2経路がorbital shear stressによる平滑筋細胞の形質転換にも関わっていると推測した。

*in vivo*実験では、血管グラフトにかかる流量(laminar flow)を増加させると平滑筋細胞の増殖と内膜肥厚が抑制されることが知られている。さらに*in vitro*でも24時間のlaminar shear stress暴露により平滑筋細胞の増殖が抑制されることも示されている。一方、臨床において頸動脈分岐部には、oscillatory and orbital shear stressがかかっていると思われ、さらにラットの実験では、バルーン障害を起こした頸動脈では平滑筋細胞の増殖とERK1/2の活性化が認められている<sup>1)</sup>。Angioplasty後などに起こる内皮細胞脱落障害部位においては、より複雑で不規則なシェアストレスがかかると考えられ、今回我々が使用したorbital shear stressモデルは、laminar flow モデルより臨床に近いモデルであると思われる。教室では、すでにorbital shear stressへの短期暴露により平滑筋細胞の増殖能が約20%増加したことを報告しているが、今回は、長期暴露により75%の増殖能増加を示した。

我々はまた、orbital shear stressがERK1/2経路を刺激し、さらにorbital shear stressにより刺激された平滑筋細胞増殖能は、mitogen-activated protein kinase (MAPK) ERK1/2経路の活性化に少なくとも一部分は依存していることも確認した。これらのことは、この経路の活性化が、平滑筋細胞増殖能の刺激に反応していることを示している<sup>2)</sup>。さらにERK1/2は、Jun N-terminal kinaseやp38などの他のMAPKs より平滑筋細胞増殖により関与しており、我々の検討でも orbital shear stressの平滑筋細胞増殖にp38ではなくERK1/2経路が反応していた。

血管平滑筋細胞は、形質転換することが知られており、動脈硬化病変や血管内障害部位では、分化型から合成型への形質転換により平滑筋細胞は増殖・遊走し、結果としてプラーク形成や狭窄の原因となる<sup>3)</sup>。持続的なERK1/2の活性化がこの形質転換に関与していることが示されており、今回の検討でも長期のorbital shear stressにより、分化型のマーカーである $\alpha$ -actin, calponinの減少、合成型マーカーであるvimentin,  $\beta$ -actinの増加が確認された。したがって、ERK1/2経路は平滑筋細胞の増殖のみならず形質転換にも寄与していると考えられた。

平滑筋細胞内の調節遺伝子は解明されつつあり、シェアストレスに対する調節遺伝子が解明されれば、平滑筋細胞の増殖・形質転換の抑制が可能となり、将来的には動脈硬化調節やangioplastyなどの血管内治療後の再狭窄抑制効果が期待される。

## 結 論

*in vitro*実験において、血管平滑筋細胞への長期のorbital shear stressの暴露は、直接的に平滑筋細胞の増殖能を刺激した。これには少なくともERK1/2経路が関わっていると考えられる。ERK1/2経路は、同時に平滑筋細胞の分化型から合成型への形質転換にも寄与していると推測された。これらの結果は、血管内損傷後におこるシェアストレスによる平滑筋細胞増殖が、薬物的調節が可能な細胞内シグナル伝達経路により制御されていることを示唆している。

引 用 文 献

1. Koyama H, Olson NE, Reidy MA. Cell signaling in injured rat arteries. *Thromb Haemost* 1999;82:806-9.
2. Malek A, Alper S, Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA*1999;282:2035-42.
3. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-26

参 考 论 文

1. Asada H, Sasajima T, Inaba M, Azuma N, Akasaka N, Uchida H, et al. Venous blood flow through vein grafts before harvesting minimizes endothelial cell desquamation immediately after implantation. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2004 Apr;45(2):139-42.
2. Dardik A, Chen L, Frattini J, Asada H, Aziz F, Kudo FA, et al. Differential effects of orbital and laminar shear stress on endothelial cells. *J Vasc Surg*. 2005 May;41(5):869-80.

## 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	浅田秀典
<p>審査委員長 小川勝洋 ㊞</p> <p>審査委員 長谷部直幸 ㊞</p> <p>審査委員 笹嶋唯博 ㊞</p>			
<p>学位論文題目</p> <p>Sustained orbital shear stress stimulates smooth muscle cell proliferation via the extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 pathway.</p> <p>(持続的な乱流シェアストレスは、ERK 1/2 経路を介して血管平滑筋の増殖を刺激する)</p>			
<p>血液の乱流ストレスは血管平滑筋細胞の増殖を刺激することが知られており、この現象は頸動脈分岐部などの乱流の生じやすい部位に動脈硬化症が起こりやすいことと関係していると考えられている。</p> <p>本学位論文提出者らは大動脈平滑筋細胞を用いて in vitro で乱流ストレスによる細胞増殖と形質変化を検討し、さらにそれらに関する細胞内シグナル伝達経路を解析した。</p> <p>3-6代継代した牛の大動脈平滑筋細胞を乱流ストレス下で10日間培養したところ、静止状態においたコントロール</p>			

に比較して 75%細胞数が増加し、それに伴って分化形質のマーカーである  $\alpha$ -actin、calponin の発現が低下し、逆に合成型形質のマーカーである  $\beta$ -actin と vimentin の発現が亢進した。一方、乱流ストレス下にある平滑筋細胞を MEK - ERK1/2 系路の阻害剤である PD98059 で処理したところ、細胞増殖と合成型形質が抑制されたが、p38 の阻害剤である SB203580 ではそのような抑制が起らなかった。したがって、増殖反応および合成型形質発現には主に MEK - ERK1/2 経路が関わっていることが明らかになった。これらの成績は動脈硬化症や angioplasty に伴う再狭窄などに対する薬物治療の可能性を期待させるものであり、血管治療分野の発展に貢献すると考えられる。本学位提出者については試問審査での質疑応答でも適切な解答が得られ、よって本審査委員会は本論文が学位論文に値するものと判定した。