

# 博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

学位番号乙第 2672 号

学位申請者 : なが 永      やま 山      だい 大      じ 二

主 論 文 : Effects of serotonin on expression of the LDL receptor family member LR11 and 7-ketocholesterol-induced apoptosis in human vascular smooth muscle cells

(セロトニンがヒト血管平滑筋細胞における LR11 発現と、7-ketocholesterol が誘発するアポトーシスに与える影響)

著 者 : Daiji Nagayama, Noriko Ishihara, Hideaki Bujo, Kohji Shirai, Ichiro Tatsuno

公 表 誌 : Biochemical and Biophysical Research Communications 446 (4) : 906-910, 2014

論文内容の要旨 :

【背景及び目的】近年、血管平滑筋細胞 (VSMCs) の血管中膜から内皮への遊走に LDL 受容体ファミリーである LR11 の発現が関与し、内皮肥厚の一因となりうることが報告されている。また、不安定プラークにおいては周辺の VSMCs 消失を伴ったコレステロール酸化物 (オキシステロール) の蓄積が認められ、その機序としてオキシステロール自体が VSMCs のアポトーシスを惹起することを我々は報告している。VSMCs の遊走、増殖、アポトーシスは動脈硬化の進展において主要な変化といえるが、しかしその制御機構はまだ不明な点が多い。一方、セロトニン (5-HT) は VSMCs の増殖因子として作用し、動脈硬化と関連することが知られている。我々は選択的 5-HT<sub>2A</sub> 受容体拮抗薬であるサルボグレラートが、血管弾性指標である Cardio-ankle vascular index を低下させる (血管弾性能を改善させる) ことを報告している。しかし、5-HT が動脈硬化の進展において果たす役割は十分解明されていない。

我々は今研究において VSMCs を用い、LR11 の発現及びオキシステロールが誘発するアポトーシスに対して 5-HT

が与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】ヒト大腿動脈由来の VSMCs を用い、in vitro における細胞増殖 (Hemocytometer にて測定) および、LR11 の発現ならびに 7 ケトコレステロール (7KCHO、オキシステロールの一種) が誘発するアポトーシスに対して 5-HT が与える影響を検討した。細胞増殖及び LR11 発現に関してはサルボグレラートが 5-HT の作用に与える影響も同時に検討した。LR11 は reverse transcription PCR 法による mRNA 発現をもって評価した。アポトーシスはフローサイトメトリーを用いた Propidium iodide 法にて Sub-G1 期細胞の定量を行うことでその割合を測定し、カスパーゼ活性は FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit (BD Pharmingen) 及び Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega, Wisconsin) の 2 種類の手法をそれぞれ用い測定した。

【結果】VSMCs 培養開始 8 日目までの時点で、5-HT は濃度 (1~100  $\mu$ M) 依存的に VSMCs の増殖を促進させ、その効果はサルボグレラート (10  $\mu$ M) 同時添加にて有意に抑制 (-22%) された。また、VSMCs 培養開始 72 時間後に 5-HT (1~100  $\mu$ M) 及びサルボグレラート (10  $\mu$ M) を 72 時間同時添加したところ、5-HT は単独で濃度依存的に LR11 mRNA 発現を促進し、その効果はサルボグレラート同時添加にて抑制された。VSMCs 培養開始 48 時間後より 5-HT (100  $\mu$ M) を 96 時間単独添加した場合、VSMCs におけるカスパーゼ 3(/7)活性及びアポトーシスの程度に差は認めなかったが、培養開始 72 時間後より 7KCHO (50  $\mu$ M) を 72 時間単独添加した場合ではそれぞれ明らかな増加を認めた。培養開始 48 時間後より 5-HT (100  $\mu$ M) を 96 時間、7KCHO (50  $\mu$ M) を 72 時間 (5-HT 添加 24 時間後より同時に) 添加したところ、7KCHO 単独添加で増加したカスパーゼ 3(/7)活性及びアポトーシスの程度は低下した。

【考察】5-HT は VSMCs の増殖促進及び、LR11 発現促進を介した血管中膜から内皮への VSMCs 遊走促進によって血管内皮肥厚を引き起こす。内皮の器質的損傷を契機に局所に凝集した血小板より放出された 5-HT は、このようにして損傷部位を補修しているものと想定できる。サルボグレラートはこういった 5-HT の作用を抑制することで血管内皮の肥厚を防ぎ、抗動脈硬化作用を発揮しうるものと考えられる。一方、7KCHO はカスパーゼ 3(/7)を介した VSMCs のアポトーシスを誘発し不安定プラークの形成に寄与しうるが、5-HT 添加はその効果を抑制する作用を有していた。5-HT による血管内皮肥厚の促進作用及び不安定プラーク形成の抑制作用は、動脈硬化の進展を考える上では一見相反するようと思われるが、いずれも血管の器質的な障害を修復・防御する 5-HT 特有の作用とみなすことができ、これらは血管リモデリングのメカニズムにおける新たな知見といえる。

## 1. 論文審査の要旨および担当者

学位番号乙第 2672 号	氏 名	永 山 大 二
論文審査担当者	主 査	東 丸 貴 信
	副 査	本 村 昇
	副 査	池 田 隆 徳
	副 査	盛 田 俊 介
	副 査	杉 山 篤
<p>論文審査の結果の要旨 :</p> <p>セロトニン (5-HT) は血管平滑筋細胞 (VSMCs) の増殖因子として作用し、動脈硬化の進展を生じることが知られており、LR11 は VSMCs の増殖型への形質転換や内膜から中膜への遊走に関係することが知られている。一方、選択的 5-HT<sub>2A</sub> 受容体拮抗薬であるサルボグレラートは、血管拡張作用、血栓抑制作用及び狭窄抑制作用があり、心血管疾患の治療に使用されている。また、著者らは 5-HT が血管弾性の指標を低下させることを報告してきた。</p> <p>ヒト大腿動脈由来の VSMCs を用いた本研究では、5-HT の濃度依存的に VSMCs の増殖が促進され、その効果はサルボグレラート同時添加にて有意に抑制された。また、5-HT は単独で濃度依存的に LR11 mRNA 発現を促進し、これもサルボグレラート同時添加にて抑制された。VSMCs 培養開始 5-HT を単独添加した場合、アポトーシスやカスパーゼ活性の程度に差は見られなかった。しかし、7 ケトコレステロール (7KCHO) を単独添加で、それぞれ明らかな増加を認めた。一方、5-HT と 7KCHO を添加したところ、7KCHO 単独添加で増加したカスパーゼ 3(/7) 活性及びアポトーシスの程度は低下した。</p> <p>5HT の血管増殖作用は知られていたが、LR11 との関係は明らかでなかった。今回の検討により 5-HT が VSMCs の増殖を促進し LR11 の発現を確認できたことより、5HT が LR11 を介して VSMCs の血管中膜から内皮への遊走促進を生じ、動脈硬化進展に関与することが明らかになってきた。サルボグレラートは、5-HT の作用を抑制することで抗動脈硬化作用を発揮しうるものと考えられた。一方、7KCHO は VSMCs のアポトーシスを誘発し、冠動脈などのプラークの脆弱化を生じうるが、5-HT はその効果を抑制する作用も有していることが明らかになった。</p> <p>審査委員会においては多くの質問があったが、申請者はすべての質問に的確に答えることができた。5-HT の動脈硬化進展への関与は 5HT 局所高濃度の可能性やその非特異な LR11 による中膜平滑筋遊走と形質転換やアポトーシスによることが明らかとなった。抗セロトニン薬は平滑筋への直接作用や LR11 産生抑制作用があるが、アポトーシスと無関係であることが示唆された。また、血管内皮障害と血小板活性化により 5-HT が大量に放出され、血管収縮、LR11 を介した細胞遊走と細胞増殖が生じていることが明らかになったが、アポトーシス抑制作用など抗動脈硬化作用も認められた。5-HT による血管内皮肥厚の促進及び不安定プラーク形成の抑制作用は、相反するように考えられるが、基本的には血管の器質的な障害を修復・防御する 5-HT 特有の作用で血管リモデリングの新たなメカニズムが示唆された。よって本論文は、学位授与に値すると判断した。</p>		