

原稿


(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Argatroban, specific thrombin inhibitor, induced phenotype change of cultured rabbit vascular smooth muscle cells

(特異的合成トロンビンインヒビター、アルガトロバンは培養家兎血管平滑筋細胞の形質変換を誘導した)

氏名 吉長正富 (直筆) 

「目的」	トロンピンを含む凝固因子や組織因子がインターベンション治療後の血管再狭窄に関与すると報告されている。また、選択的トロンピン阻害薬であるアルガトロバンの血管内膜傷害部位局所への投与は再狭窄を抑制するが、他のトロンピン阻害薬では抑制効果が見られない。これは、アルガトロバンのトロンピン阻害を介さない、血管内皮細胞または血管平滑筋細胞への直接作用を示唆するものである。本研究では、家兎培養血管平滑筋細胞の形質変換における、アルガトロバンによる直接作用の有無を評価した。
「方法」	血管平滑筋細胞の形質変換を評価するため、形質変換分子マーカーである myosin heavy chain (MHC) アイソフォーム (SM1、SM2 及び SMemb) の mRNA 発現量を逆転写 PCR (RT-PCR) を用いて測定した。即ち、アルガトロバン (10 または 50 $\mu\text{g/ml}$) を含む無血清培地を用いて家兎培養血管平滑筋細胞を 3 時間または 24 時間培養後、

*論文要旨は3枚(1200字以内)にまとめること。

グ	ア	ニ	ジ	ン	チ	オ	シ	ア	ネ	ー	ト	法	に	よ	り	4	X	10 ⁵	個	の
培	養	細	胞	よ	り	total	RNA	を	抽	出	し	、	逆	転	写	反	応	後	、	
MHC	アイ	ソ	フ	ォ	ー	ム	cDNA	特	異	的	な	プ	ラ	イ	マ	ー	を	用		
い	て	mRNA	の	発	現	量	を	測	定	し	た	。	ま	た	、	MHC	アイ	ソ		
フ	ォ	ー	ム	mRNA	発	現	局	在	を	<i>in situ</i>	hybridization	に	よ	り	調	べ				
た	。	さ	ら	に	、	他	の	形	質	変	換	分	子	マ	ー	カ	ー	と	し	
て	の	plasminogen	activator	inhibitor	type	1	(PAI-1)	、	β -actin	及	び							
内	部	標	準	と	し	て	glyceraldehyde-3-phosphate	dehydrogenase	(GAPDH)	mRNA	の									
発	現	量	を	測	定	し	た	。												
「	結	果	」	<i>in situ</i>	hybridization	の	結	果	、	MHC	アイ	ソ	フ	ォ	ー					
ム	mRNA	は	アル	ガ	ト	ロ	バ	ン	刺	激	細	胞	群	で	、	均	一	な		
発	現	が	見	ら	れ	た	。	アル	ガ	ト	ロ	バ	ン	と	培	養	平	滑		
筋	細	胞	と	の	3	時	間	反	応	で	は	、	SM1/SM2	mRNA	発	現	量	に		
は	有	意	差	を	認	め	な	か	っ	た	が	、	SMemb	mRNA	発	現	量	、		
SMemb	蛋	白	量	の	有	意	な	上	昇	を	認	め	た	。	ま	た	、			
PAI-1	、	β -actin	mRNA	量	は	3	、	24	時	間	曝	露	で	は	、	有	意			
に	上	昇	し	た	。	こ	れ	ら	の	結	果	か	ら	、	アル	ガ	ト	ロ		
バ	ン	は	直	接	的	に	血	管	平	滑	筋	の	形	質	変	換	を	惹	起	
す	る	の	が	認	め	ら	れ	た	。											

「	考	察	」	こ	れ	ま	で	、	選	択	的	ト	ロ	ン	ビ	ン	阻	害	薬
で	あ	る	ア	ル	ガ	ト	ロ	バ	ン	の	血	管	平	滑	筋	細	胞	へ	の
直	接	的	作	用	に	つ	い	て	の	報	告	は	見	ら	れ	て	い	な	
い	。	今	回	我	々	の	実	験	に	て	、	ア	ル	ガ	ト	ロ	バ	ン	が
培	養	血	管	平	滑	筋	細	胞	に	直	接	作	用	し	、	SMemb	、		
PAI-1	及	び	β -actin mRNA	発	現	量	を	増	加	さ	せ	、	合	成	型	へ			
の	形	質	変	換	を	誘	導	す	る	の	が	観	察	さ	れ	た	。	し	か
し	な	が	ら	、	ア	ル	ガ	ト	ロ	バ	ン	の	血	管	平	滑	筋	細	胞
に	お	け	る	作	用	点	は	未	だ	不	明	で	あ	り	、	今	後	は	血
管	平	滑	筋	の	形	質	変	換	に	お	け	る	、	ア	ル	ガ	ト	ロ	バ
ン	の	SMemb	遺	伝	子	発	現	に	対	す	る	作	用	機	序	を	、		
mRNA	及	び	蛋	白	レ	ベ	ル	で	明	ら	か	に	し	た	い	。			

論文審査結果の要旨

(1)

報告番号	課程博 * 論文博	第 号	氏 名	吉 長 正 富
論文審査委員	平成 15 年 2 月 27 日			
	主査教授	須 田 一		印
	副査教授	吉 見 直 己		印
副査教授	坂 梨 又 郎		印	
(論 文 題 目)				
Argatroban, specific thrombin inhibitor, induced phenotype change of cultured rabbit vascular smooth muscle cells				
(特異的合成トロンピンインヒビター、アルガトロバンは培養家兎血管平滑筋細胞の形質変換を誘導した)				
(論文審査結果の要旨)				
上記論文に対して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義と学術的水準について慎重に審査し、以下のような審査結果を得た。				
1. 研究に至る背景と目的				
血管狭窄に対する再開通のために施行される経皮的冠動脈形成術等の血管再建術では、施行後短期間の観察では成功例が多くみられるが、長期間の観察では、再狭窄発生率は20-50%と高い。血管壁血栓は、粥状動脈硬化病変部位やインターベンション治療後に生じる血管再狭窄形成に関与すると報告されている。特に、トロンピンや組織因子等の凝固因子の関与が認められている。従って、様々な抗血栓剤が血管再狭窄予防目的で臨床及び基礎研究で試みられている。選択的トロンピン阻害薬であるアルガトロバンの血管内膜傷害部位局所への投与は、再狭窄を抑制するが、他のトロンピン阻害薬では抑制効果が見られないと報告されている。これは、アルガトロバンの、トロンピン阻害を介さない血管内皮細胞または血管平滑筋細胞への、直接作用を示唆するものである。本論文では、家兎培養血管平滑筋細胞の形質変換における、アルガトロバンの直接作用の有無を評価している。				

- 備考 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書とすること。
- 2 要旨は800字・1200字以内にまとめること。
- 3 *印は記入しないこと。

論文審査結果の要旨

(2)

2. 研究内容

血管平滑筋細胞の形質変換を評価するために、形質変換分子マーカーである myosin heavy chain (MHC) アイソフォーム (SM1, SM2 及び SMemb) の mRNA 発現局在を *in situ* hybridization 法により調べた。アルガトロバン (10 または 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) または血小板由来成長因子 (PDGF-BB, 10 または 50 ng/ml) を含む無血清培地を用いて家兎培養血管平滑筋細胞を 3 時間培養した。MHC アイソフォーム mRNA の発現が、アルガトロバン及び PDGF-BB に暴露した細胞で見られた。次に、MHC アイソフォーム mRNA 発現量を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を用いて測定した。即ち、グアニジンチオシアネート法により 4×10^5 個の培養細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応後、MHC アイソフォーム cDNA の特異的なプライマーを用いて mRNA の発現量を測定した。培養平滑筋細胞をアルガトロバンに 3 時間暴露すると、SM1 及び SM2 mRNA 発現量に有意な変化は見られなかったが、SMemb mRNA 発現量は有意に上昇した。さらに、SMemb 蛋白量は、ウエスタンブロット法による検討では、アルガトロバン 3 時間暴露で有意に上昇した。また、他の形質変換分子マーカーの plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1)、 β -actin 及び glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA の発現量の検討では、アルガトロバン 3、24 時間曝露で PAI-1、 β -actin mRNA 量の有意な上昇がみられた。

これらの結果から、アルガトロバンが、培養血管平滑筋の形質変換を直接的に惹起しているのが示された。

3. 研究成果の意義と学術的水準

本研究では、家兎大動脈由来血管平滑筋細胞を用いて、選択的トロンビン阻害薬であるアルガトロバンを直接的に培養血管平滑筋細胞へ作用させ、各種の平滑筋形質変換マーカーの動態を詳細に調べている。特に、*in situ* hybridization 法、RT-PCR 法及びウエスタンブロット法を駆使して、アルガトロバンによる培養血管平滑筋細胞の SMemb mRNA 発現量と同時にその蛋白量の増加を明らかにしたのは、血管平滑筋の形質変換機序の今後の解明にも大きく寄与するものである。アルガトロバンのトロンビン阻害薬としての薬理作用以外の作用を初めて示した点でも、その研究成果は国際的に認められる高水準にあるものと判断される。

以上により、本論文は学位授与に十分に値するものと判断した。