

|              |                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Inhibition of the p53 Tumor Suppressor Gene Results in Growth of Human Aortic Vascular Smooth Muscle Cells : Potential Role of p53 in Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell growth                             |
| Author(s)    | 青木, 元邦                                                                                                                                                                                                             |
| Citation     | 大阪大学, 1999, 博士論文                                                                                                                                                                                                   |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                    |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/43085">https://hdl.handle.net/11094/43085</a>                                                                                                                                |
| rights       |                                                                                                                                                                                                                    |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照ください</a> 。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |                                                                                                                                                                                                                                              |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 青 木 元 邦                                                                                                                                                                                                                                      |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                                                                                    |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 4 9 7 8 号                                                                                                                                                                                                                                |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 11 年 10 月 29 日                                                                                                                                                                                                                           |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当                                                                                                                                                                                                                             |
| 学 位 論 文 名     | Inhibition of the p53 Tumor Suppressor Gene Results in Growth of Human Aortic Vascular Smooth Muscle Cells: Potential Role of p53 in Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell growth<br>(p53遺伝子によるヒト血管平滑筋細胞増殖の抑制: 血管平滑筋細胞増殖制御機構における p53の役割) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 荻原 俊男<br>(副査)<br>教 授 金田 安史 教 授 青笹 克之                                                                                                                                                                                             |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### (目的)

冠動脈形成術(PTCA)後の再狭窄あるいは動脈硬化病変における血管平滑筋細胞の異常増殖は循環器領域における大きな課題である。血管平滑筋細胞の増殖には種々の増殖因子が関与しているが、最終的に細胞周期の進展、すなわち細胞周期調節遺伝子群の発現抑制が重要な役割を果たしている。実際、細胞周期調節遺伝子(cdk2 kinase、PCNA、E2F、cyclinA など)の制御による治療が遺伝子治療として実現しつつある。この観点から、細胞周期を負に調節する癌抑制遺伝子 Rb、p53 もまた、血管平滑筋細胞の増殖機構に深くかかわっていると考えられる。

一方、PTCA 後の再狭窄病変においてサイトメガロウイルス感染とそれに伴う p53 の活性喪失が約 3 割の症例で見られたとの報告があり、また、サイトメガロウイルス感染が再狭窄の危険因子であるとの報告も続いた。これらの報告は病変部の血管平滑筋細胞の増殖機構への p53 の関与を強く示唆するものである。また、p53 はアポトーシス誘導遺伝子としても知られており、平滑筋細胞の生(増殖)と死(アポトーシス)のバランスの上でも、その機構解明は重要である。

そこで本研究では、再狭窄病変、動脈硬化病変における平滑筋細胞の増殖制御機構を解明するため、癌抑制遺伝子 p53、Rb に注目し、アンチセンスを用いてその増殖への関与、アポトーシス誘導への関与について検討した。

### (方法)

実験にはヒト血管平滑筋細胞を用いた。5%血清培地にてコンフルエントにした後、血清飢餓状態にて静止期に同調させた。その後、HVJ-liposome 法を用いて Rb、p53 のアンチセンスオリゴ(RbAS 導入群、p53AS 導入群、Rb & p53AS 導入群)(各15 uM)あるいはセンスオリゴ(各15 uM)を導入、そのまま血清飢餓状態にて培養した。導入 3 日後、ウエスタンブロットにてアンチセンスによる各遺伝子発現の抑制を確認し、<sup>3</sup>H-thymidine の取り込みにて DNA 合成を、WST assay にて細胞数を、FACS にて細胞周期進展を各群で検討した。

また核染色、DNA fragmentation ELISA にてアポトーシス細胞の検出を行い、そのメカニズムとして p53、bax、bcl-2 の発現レベルをウエスタンブロットにて検討した。

(成績)

各アンチセンス導入にてそれぞれの蛋白の発現は有意に抑制された。さらに各アンチセンス導入群はコントロール群に比し有意な DNA 合成の増加を認めた。p53AS あるいは Rb & p53AS 導入群にて細胞数の増加を認めたが、RbAS 導入群では細胞数に有意な変化はなかった。

RbAS 導入群における細胞数増加を伴わない DNA 合成の増加について G1/S 期以降のアポトーシスの関与を考え、アポトーシス細胞の検出を行ったところ、核染色、DNA fragmentation ELISA にてこの群における有意なアポトーシス細胞の増加を認めた。同時に RbAS 導入群において p53 の過剰発現を認めたが、p53AS を同時に導入 (Rb & p53AS) することにより、アポトーシス細胞の増加は抑制され、p53 を介したアポトーシスの誘導が示唆された。

さらに RbAS 導入群でアポトーシス促進遺伝子である bax の発現増強と抑制遺伝子である bcl-2 の発現増強も認めた。bax/bcl-2 の ratio は増加しており、p53 の過剰発現による ratio の増加がアポトーシス誘導の機序であると考えられた。

(総括)

p53AS 導入群において細胞増殖を伴う細胞周期進展が見られたが、RbAS 導入群では p53 の過剰発現に伴うアポトーシス細胞の増加が認められた。この効果は p53 のアンチセンスを共導入することにより抑制され、p53 を介したアポトーシスであることが考えられた。また、同時に bax/bcl-2 の ratio は増加し、p53-bax の経路がアポトーシスの機序として示唆された。

このように、p53 の活性喪失は、過度の細胞周期進展とアポトーシス抑制作用により、血管平滑筋の異常増殖に深く関与していると考えられる。癌抑制遺伝子の発現調節は再狭窄あるいは動脈硬化病変で重要な役割を果たしていると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

癌抑制遺伝子 Rb、p53 は細胞周期を負に制御する因子として重要である。実際いくつかの癌において、これらの遺伝子の変異とともに、過度の細胞周期進展による細胞増殖が観察されている。冠動脈形成術 (PTCA) 後の再狭窄において、血管平滑筋細胞の異常増殖による新生内膜肥厚が問題となるが、近年このような血管病変における p53 の機能喪失が注目されている。すなわち、再狭窄病変の約 3 割にサイトメガロウイルス感染とそれに伴う p53 の機能喪失が見られるとの報告であり、それに次いでサイトメガロ感染自体が再狭窄の臨床的な危険因子であるとの報告もなされた。このことは、p53 の細胞周期調節遺伝子としての機能喪失が血管平滑筋細胞の過度の細胞周期進展と細胞増殖を引き起こし、同時にアポトーシス誘導因子としての機能喪失が細胞死を抑制し増殖を加速させるという病態を示唆する。本研究では培養ヒト血管平滑筋細胞を用いてこのメカニズムを解明している。癌抑制遺伝子 Rb、p53 のアンチセンスを作成し、その導入が血清飢餓状態においてなお細胞周期進展を引き起こすことを示した。興味深いことに Rb のアンチセンス導入群では DNA 合成 (S 期) の増加は確認されたものの細胞数増加は見られず、アポトーシス細胞の有為な増加が検出された。同時にこの群では p53 の過剰発現が認められ、p53 を介したアポトーシスと考えられた。事実、p53 のアンチセンスを共導入することによりこのアポトーシスは有意に抑制されている。

本研究では p53 の発現をアンチセンスにより抑制することで、血管平滑筋細胞の過度の細胞周期進展と細胞死 (アポトーシス) の抑制による細胞増殖を認めた。さらに他の癌抑制遺伝子 Rb の発現を同時に抑えることでその作用は増強され、癌抑制遺伝子の細胞周期制御が血管平滑筋細胞においても重要であることを示している。本研究は p53 の機能喪失が再狭窄の重要な危険因子であるとの報告を培養系において証明したものであり、さらに血管病変への遺伝子治療の可能性をも示唆しており、学位に値すると思われる。