



|              |  |
|--------------|--|
| Title        | Study of oxidative stress production by Timp-3-deficient vascular smooth muscle cells in culture   |
| Author(s)    | 孫, 新   |
| Citation     | 大阪大学, 2005, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/45415">https://hdl.handle.net/11094/45415</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|               |   |
|---------------|---|
| 氏 名           | 孫 新   |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)   |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 9 2 7 9 号   |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 17 年 3 月 25 日  |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>医学系研究科生体制御医学専攻  |
| 学 位 論 文 名     | Study of oxidative stress production by Timp-3-deficient vascular smooth muscle cells in culture<br>(Timp-3 を欠損した培養血管平滑筋細胞による酸化ストレス産生の解析) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 荻原 俊男<br><br>(副査)<br>教 授 祖父江憲治 教 授 下村伊一郎  |

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 「目的」

細胞外基質は細胞の微小環境を構成する組織であり、細胞の機能や運命に影響を与えることが知られている。細胞外基質はコラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン、などのタンパク質によって構成されており、合成と分解のバランスによって恒常性が維持されている。細胞外基質を分解しているのは主に Matrix Metalloproteinase (MMP) と呼ばれるプロテアーゼである。MMP の活性を抑制している内因性の因子には Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (Timp) と呼ばれるタンパク質が存在する。Timp には Timp-1 から Timp-4 まで 4 種類が報告されており、それぞれのアミノ酸配列の相同性は 35~50% である。Timp-3 は細胞外基質に結合して存在するという点で他の Timp とは大きく異なっている。また腫瘍細胞の増殖を抑制し、血管平滑筋細胞、腫瘍細胞、上皮細胞にアポトーシスを誘導することが知られている。今回はこの Timp-3 に注目し、Timp-3 のノックアウトマウスから血管平滑筋細胞を培養して Timp-3 と酸化ストレスに関する研究を行った。

#### 「方法及び成績」

##### 1) ノックアウトマウス作製

Timp-3 のノックアウトマウスは胎児幹細胞を用いた遺伝子ターゲティング法により作製した。

##### 2) 培養平滑筋細胞の樹立

12 週齢の野生型および Timp-3 ノックアウトマウスを PBS にて還流し、胸部から腹部の大動脈を摘出し、縦方向に切開した後、内皮を擦り取り外膜をきれいに取り除いた。移植片を約 8 mm<sup>3</sup> の大きさに切り離し、10%FCS を含む D-MEM を用いて約 3 週間培養した。初代培養がコンフルエントに達した後、トリプシンを用いて細胞を回収し分散した。培養した細胞が平滑筋細胞であることは平滑筋細胞特異的なマーカーである  $\alpha$  アクチンに対する抗体を用いた染色で確認した。この培養細胞は形態学的には野生型と同じであり、増殖速度も野生型と同等であると考えられた。

##### 3) Timp-3 発現の回復

Timp-3 の構造遺伝子を含む cDNA をマウス腎臓 cDNA ライブラリーより high fidelity Taq を用いて増幅し、発現ベクターを pcDNA3.1 に挿入して Timp-3 発現ベクターを作製した。この発現ベクターを Timp-3 欠損平滑筋細胞に

導入した結果は Timp-3 の発現が回復していることが RT-PCR で確認された。

#### 4) ザイモグラフィー

野生型及び Timp-3 欠損平滑筋細胞の MMP 活性をザイモグラフィーで解析した。細胞を血清無添加の D-MEM で 24 時間培養し、その培養上清をゼラチン (1 mg/ml) を含む SDS ゲルで泳動、37°C 一晚ゼラチン消化の後クマシーで染色した。その結果、Timp-3 欠損平滑筋細胞の培養上清では明らかな MMP-2 活性の上昇が認められた、MMP-9 の著名な活性は野生型細胞およびノックアウト型細胞ともに認められなかった。

#### 5) 酸化ストレス

酸化ストレスの測定には Dihydroethidium による染色を用いた。野生型および Timp-3 欠損細胞に  $10^{-7}$  M の Angiotensin II を添加し、6 時間後の酸化ストレスの発生を蛍光顕微鏡下に観察した。野生型の細胞においては酸化ストレスの発生が認められたが、Timp-3 欠損細胞においてはほとんど認められなかった。発現ベクターの導入により Timp-3 発現を回復させると酸化ストレスの産生にも回復がみられた。

#### 「総括」

Timp-3 遺伝子は常染色体優性遺伝の疾患である Sorsby's fundus dystrophy の原因遺伝子である。Timp-3 の S156C 変異においては MMP 抑制活性が減少しており、血管新生が亢進しているものと考えられている。この論文では培養細胞における Timp-3 の発現と MMP 活性および酸化ストレスの関係に着目して研究を行った。Timp-3 欠損細胞は野生型細胞と同様に継代後 3、4 日でコンフルエントとなり、増殖速度は野生型とほぼ同じであると考えられた。この培養細胞は形態学的にも野生型と同じであった。しかし、培養液を用いたザイモグラフィーにおいては明らかに野生型と差があり、MMP-2 活性の上昇が見られた。MMP-9 については明らかな活性は野生型、ノックアウト細胞ともにみられなかった。このことは培養平滑筋細胞において Timp-3 が MMP-2 活性の抑制に重要であることを示している。一方、酸化ストレスの産生においては明らかに Timp-3 欠損細胞での減少が認められた。しかもこの減少は Timp-3 の発現ベクターを用いて回復させることによって再び上昇した。このことは酸化ストレスの産生が Timp-3 発現によってポジティブに制御される可能性を示唆している。酸化ストレスが MMP 活性に影響を与えるという報告はすでにいくつかなされているが、逆に MMP 活性を左右する Timp-3 の発現が酸化ストレスを制御するという報告はこれが初めてである。

Timp-3 は 1991 年に最初にクローニングされたタンパク質であり、その後多くの機能が追加され多機能タンパク質であることが報告されてきたが、酸化ストレスとの関係についてはいまだに明らかにされていない。今回の成績は Timp-3 の発現と酸化ストレスとの関係を強く示唆するものである。

### 論文審査の結果の要旨

Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 (Timp-3) は Matrix Metalloproteinase (MMP) の活性を負に制御している内因性の阻害因子のひとつである。本論文においては、Timp-3 をノックアウトしたマウスから大動脈由来の血管平滑筋細胞を培養し、Angiotensin II による酸化ストレス産生に関する研究を行った。

Timp-3 欠損細胞は野生型細胞と同様に継代後 3、4 日でコンフルエントとなり、増殖速度は野生型とほぼ同じであると考えられた。この培養細胞は形態学的にも野生型と同じであった。しかし、培養液を用いたザイモグラフィーにおいては明らかに野生型と差があり、MMP-2 活性の上昇が認められた。MMP-9 については野生型、ノックアウト細胞ともに明らかな活性はみられなかった。このことは培養平滑筋細胞において Timp-3 が MMP-2 活性の抑制に重要であることを示唆している。一方、酸化ストレスの産生においては明らかに Timp-3 欠損細胞での減少が認められた。しかもこの減少は発現ベクターを用いて Timp-3 を回復させることによって再び上昇した。このことは酸化ストレスの産生が Timp-3 発現によってポジティブに制御される可能性を示している。

酸化ストレスは血管中膜平滑筋細胞の形質転換 (脱分化) さらに脱分化平滑筋細胞の増殖、遊走を誘起し、動脈硬化症発症のトリガーとなる可能性が示唆されている。従って、本研究により明らかにされた酸化ストレス産生における Timp-3 の関与は動脈硬化の研究にとって有意義な知見であり、基礎および臨床医学の両側面から重要な研究であるといえる。よって、本論文は博士 (医学) の学位授与に値するものとする。