

医研第342号

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Elevation of intracellular cAMP inhibited cell proliferation and migration induced by platelet-derived growth factor in cultured rat vascular smooth muscle cells

(細胞内 cAMP の上昇は血小板由来増殖因子刺激に伴うラット培養血管平滑筋細胞の細胞増殖および遊走を抑制した)

氏名 木村 安貴



【目的】	アテローム性動脈硬化症にみられる
内膜の肥厚には、血小板由来増殖因子	
(PDGF)等の増殖因子刺激による血管平滑筋	
細胞(VSMC)の細胞増殖および遊走が関与す	
ることが知られている。細胞内環状ヌクレオ	
チド濃度上昇は、VSMCの増殖および遊走を抑	
制するのが報告されている。しかしながら、	
PDGF刺激に伴う増殖および遊走亢進への環状	
ヌクレオチドの効果は不明である。本研究	
は、細胞内環状ヌクレオチドであるcAMPおよ	
びcGMPが増殖因子、特にPDGF刺激によるVSMC	
の増殖および遊走亢進への抑制効果について	
検討した。【方法】10% FBS-DMEM下で培養した	
ラット胎児性大動脈由来血管平滑筋細胞A7r5	
に dibutyryl cAMP (db-cAMP) (0-3 mM)、dibutyryl	
cGMP (db-cGMP) (0-3 mM)、type 3 phosphodiesterase	
inhibitor である olprinone hydrochloride (OPN) (0-1	
mM) および forskolin (FSK) (0, 0.1 mM) を曝	
露後、細胞内cAMP濃度、細胞増殖および遊走	
細胞数を測定した。細胞内cAMP濃度はTropix	

*要旨は3枚(1200字以内)にまとめること。

(20×20)

cAMP-Screen chemiluminescent ELISA system を用いて測定し
 た。細胞増殖は 0-72 時間培養した VSMC に WST-1
 を添加し、吸光度 (415 nm) を測定することよ
 り求めた。遊走細胞数は、VSMC を cell culture insert
 (8 μ m pore size) で 24 時間培養し、calcein-AM で蛍光
 染色後、膜孔を通過した遊走細胞数を計測し
 た。さらに、PDGF-BB を含む無血清培地下の条
 件でも同様な実験を行った。【結果】 db-cAMP
 (3 mM)、OPN (1 mM) および FSK (0.1 mM)
 曝露 72 時間後では、VSMC の細胞内 cAMP 濃度は
 有意に上昇した。db-cAMP は VSMC の増殖を濃度
 依存性に有意に抑制したが、db-cGMP は抑制し
 なかった。OPN (1 mM) は、VSMC の増殖を抑
 制した。さらに db-cAMP (0.3 mM) 共存下では、
 OPN による増殖抑制効果は増大した。db-cAMP
 (3 mM) は対照に比して VSMC の遊走細胞数を
 有意に減少したが (16.3 \pm 1.9 vs. 3.3 \pm 0.5
 cells/HPF)、db-cGMP では有意な減少はみられな
 かった (13.4 \pm 0.7 vs. 12.1 \pm 0.8 cells/HPF)。OPN
 (1 mM) 単独、db-cAMP (0.3, 3 mM) 存在下で

*要旨は 3 枚 (1200 字以内) にまとめること。

(20×20)




OPN	(1 mM)	お	よ	び	FSK	(0.1 mM)	曝	露	に	よ	り				
遊	走	細	胞	数	は	有	意	に	減	少	し	た	。	PDGF-BB	(2			
nM)	刺	激	に	よ	る	、	増	殖	お	よ	び	遊	走	の	亢	進	は	、
db	cAMP	(3 mM)	、	OPN	(1 mM)	お	よ	び	FSK						
(0.1 mM)	い	づ	れ	の	曝	露	に	お	い	て	も	有	意	に	抑	制	
さ	れ	た	。	【	考	察	】	細	胞	内	cAMP	の	上	昇	は	、	VSMC		
に	お	け	る	PDGF-BB	刺	激	に	伴	う	細	胞	増	殖	お	よ	び	遊		
走	を	抑	制	し	た	。	従	っ	て	、	PDGF	刺	激	に	伴	う	VSMC		
の	増	殖	お	よ	び	遊	走	を	担	う	シ	グ	ナ	ル	伝	達	経	路	と
cAMP	を	介	す	る	シ	グ	ナ	ル	伝	達	経	路	は	cross-talk	す	る			
こ	と	が	判	明	し	た	。	cAMP	上	昇	に	よ	る	VSMC	の	増			
殖	、	遊	走	の	抑	制	機	序	の	解	明	は	、	血	管	内	膜	肥	厚
の	防	止	お	よ	び	治	療	法	の	確	立	の	基	盤	と	な	る	と	考
え	ら	れ	る	。															

*要旨は3枚(1200字以内)にまとめること。

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

(1)

報告番号	課程博 * 第342号 論文博	氏名	木村 安貴
論文審査委員	審査日	平成22年2月8日	
	主査教授	大屋 忍 聊 	
	副査教授	陣野 吉廣 	
	副査教授	松崎 吾 玄 	
(論文題目)			
Elevation of intracellular cAMP inhibited cell proliferation and migration induced by platelet-derived growth factor in cultured rat vascular smooth muscle cells (細胞内 cAMP の上昇は血小板由来増殖因子刺激に伴うラット培養血管平滑筋細胞の細胞増殖および遊走を抑制した)			
(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(実験方法および結果)、研究の成果の意義と学術的水準について慎重に審査し、以下の審査結果を得た。			
I 研究の背景と目的			
アテローム性動脈硬化症にみられる内膜の肥厚には、血小板由来増殖因子(PDGF)等の増殖因子刺激による血管平滑筋細胞(VSMC)の増殖および遊走が関与することが知られている。細胞内環状ヌクレオチド濃度上昇は、VSMCの細胞増殖および遊走を抑制することが報告されており、血管病態の治療に貢献することが期待されている。しかしながら、環状ヌクレオチドの細胞増殖および遊走の機序、特にPDGF刺激に伴う増殖および遊走亢進に対する、環状ヌクレオチドの効果は不明である。本研究は、PDGF刺激に伴うVSMCの増殖および遊走亢進に対する細胞内環状ヌクレオチドであるcAMPおよびcGMPの抑制効果について検討した。			
II 論文の内容			
実験方法:			
10% FBS-DMEM 下で培養した胎児ラット大動脈由来培養血管平滑筋細胞株 A7r5 を dibutyryl			

備考 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。

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)

cAMP (db-cAMP) (0~3 mM)、dibutyryl cGMP (db-cGMP) (0~3 mM)、type 3 phosphodiesterase inhibitor である olprinone hydrochloride (OPN) (0~1 mM) および forskolin (FSK) (0, 0.1 mM) を曝露後、細胞増殖、細胞内 cAMP 濃度および遊走細胞数を測定した。細胞内 cAMP 濃度は Tropix cAMP-Screen chemiluminescent ELISA system を用いて測定し、細胞増殖は 0~72 時間培養後、(生細胞数測定試薬) WST-1 を用いて測定した。遊走細胞数は、VSMC を cell culture insert (8- μ m pore size) で 24 時間培養し、calcein-AM で蛍光染色後、膜孔を通過した遊走細胞数を計測した。さらに、PDGF-BB を含む無血清培地下の条件でも同様な実験を行った。

実験結果と考察

db-cAMP は VSMC の増殖を濃度依存性に有意に抑制したが、db-cGMP は抑制しなかった。db-cAMP (3 mM)、OPN (1 mM) および FSK (0.1 mM) 曝露 72 時間後では、VSMC の細胞内 cAMP 濃度は有意に上昇した。OPN (1 mM) は VSMC の増殖を抑制した。さらに db-cAMP (0.3 mM) 共存下では、OPN による増殖抑制効果は増大した。db-cAMP (3 mM) は対照に比して VSMC の遊走細胞数を有意に減少したが、db-cGMP では有意な減少はみられなかった。OPN (1 mM) 曝露により遊走細胞数を有意に減少した。さらに OPN の抑制効果は db-cAMP (0.3, 3 mM) 共存下で増強した。また FSK (0.1 mM) の曝露においても有意に減少した。PDGF-BB (2 nM) 刺激による増殖および遊走の亢進は、db-cAMP (3 mM)、OPN (1 mM) および FSK (0.1 mM) の曝露により有意に抑制された。以上の結果より細胞内 cAMP の上昇は、PDGF-BB 刺激に伴う VSMC の増殖および遊走を抑制することが明らかとなった。すなわち、PDGF 刺激に伴う VSMC の増殖および遊走を担うシグナル伝達経路は、cAMP を介するシグナル伝達経路により制御される可能性がある。cAMP 上昇による VSMC の増殖および遊走の抑制機序の解明は、血管内膜肥厚の防止および治療法の確立の基盤となると考えられる。

III 研究成果の意義と学術的水準

本研究の成果は、PDGF 刺激に伴う血管平滑筋細胞の増殖および遊走亢進に対する細胞内 cAMP の抑制機序についての詳細を検証したものである。

以上により、本論文は学位授与に十分に値する内容であると判断した。