

審査の結果の要旨

氏名 七尾（濱井） 道子

本研究は、加齢とともに増加する動脈硬化や心血管イベントの危険因子である血管石灰化に対して、性ホルモン及び性ホルモン様作用をもつ漢方薬の抑制作用とその機序を明らかにすることを目的として、ヒト大動脈平滑筋細胞を用いてリン刺激による石灰化誘導モデルで検討を行い、下記の結果を得ている。

1. エストロゲンはリン刺激（2.6 mM）により誘導される石灰化に対してカルシウム沈着量の定量（o-cresolphthalein complex 法）と von Kossa 法による石灰化染色で評価したところ、生理的濃度（1~100 nM）で石灰化を有意に抑制した。この作用はエストロゲン受容体（ER） α の特異的阻害剤である MPP や ER α の siRNA により打ち消されるが、ER β の選択的阻害剤である PHTPP や ER β の siRNA による影響はなかった結果から、エストロゲンによる血管平滑筋細胞の石灰化抑制作用は ER α を介した作用であることが示唆された。
2. アポトーシスはリン刺激による血管石灰化の重要な機序であり、アポトーシスに対するエストロゲンの作用を histone と DNA の sandwich ELISA 法および TUNEL 染色を用いて検討した結果、エストロゲンは濃度依存的にアポトーシスを抑制した。さらに、リン刺激によるアポトーシスはビタミン K 依存タンパクである growth arrest specific gene6 (Gas6) と Akt survival 経路の抑制によるものであり、Gas6 と pAkt のタンパク発現に対するエストロゲンの作用についてウエスタンブロット法を用いて検討した。その結果、エストロゲンはリン刺激により抑制された Gas6 および pAkt の発現を回復させた。さらに、このエストロゲンの作用はすべて MPP を加えることで打ち消されることから、エストロゲンは ER α を介して Gas6/Akt survival 経路を活性化し、アポトーシスを抑制することで血管石灰化を抑制する機序が明らかになった。
3. エストロゲンによる Gas6 の発現増加は転写活性を促進する作用によるものであることをルシフェラーゼアッセイで確認した。また MPP はエストロゲンによる Gas6 の転写活性をブロックすることが分かった。
4. リン刺激による Gas6 転写活性の抑制や石灰化に対して、細胞膜を貫通しない E2-BSA は影響しないことからエストロゲンによる Gas6 制御および血管石灰化の抑制は転写を介する genomic 作用であった。
5. 性ホルモン様作用を有する漢方薬補剤成分である黄耆（オウギ）の astragaloside IV、芍薬（シャクヤク）の paeoniflorin と albiflorin、当帰（トウキ）の butylidene phthalide、人參（ニンジン）の ginsenoside Rb1、淫羊藿（インヨウカク）の icariin はリン刺激によるヒト

大動脈平滑筋細胞の石灰化に対して性ホルモンと類似した石灰化抑制作用を示した。

6. 高齢者に対してよく処方される補中益気湯や人参養栄湯に含まれる代表的な補気剤成分である astragaloside IV (AS-IV) と ginsenoside Rb1 (Rb1) に注目して検討を進めたところ、AS-IVの石灰化抑制作用はMPPにより打ち消されることと、Rb1の石灰化抑制作用はアンドロゲン受容体阻害剤である bicalutamide により打ち消されたことがわかった。これらの結果から AS-IVはエストロゲンと同様に ER α を介して、Rb1はアンドロゲンと同様に AR を介して石灰化を抑制することが示唆された。
7. ヒト乳がん細胞株 (MCF-7) およびヒト前立腺がん細胞株 (LNCaP) を用いて、AS-IV および Rb1 の estrogen response element (ERE) 、 androgen response element (ARE) 活性 (ルシフェラーゼアッセイ) と細胞増殖 (MTS 法) に対する影響を検討した結果、MCF-7において AS-IVは ERE 活性を上昇させ、細胞増殖を促進したが、Rb1は LNCaP での ARE 活性および細胞増殖に影響はなかった。
8. Rb1による血管平滑筋細胞の石灰化抑制機序は、Gas6の転写活性とタンパク発現の増加を介したアポトーシス抑制であった。また、Rb1のアポトーシス抑制作用は bicalutamide により打ち消されることから、ARを介する機序が明らかになった。
9. LNCaPにおいて、アンドロゲンの応答遺伝子である prostate specific antigen (PSA)の転写活性やタンパク発現はテストステロンで増加するが、Rb1をテストステロンと同時に添加した条件下では PSAの転写活性やタンパク発現が有意に抑制された。これらの結果から、Rb1はテストステロンの作用に対して拮抗作用を示し、selective androgen receptor modulator (SARM) としての可能性が示唆された。テストステロンと異なる Rb1の SARMとしての作用機序については、AR応答遺伝子プロモーター上の結合部位の違いや、共役因子の違いが関与する可能性が考えられる。

以上、エストロゲンの血管石灰化に対する抑制機序は ER α を介した Gas6の転写活性化によるアポトーシス抑制であることを明らかにした。また、漢方薬補剤成分である Rb1にはテストステロンと類似した血管石灰化の抑制作用があり、ARを介した Gas6/Akt survival 経路の活性化によるアポトーシス抑制がその機序であった。一方、LNCaPではテストステロンと異なり、Rb1単独では ARE活性を持たないがテストステロンの作用に対しては拮抗作用があることから、血管平滑筋細胞と前立腺がん細胞では異なる作用を持つことが明らかになった。Rb1の血管保護作用と組織特異的な作用機序を解明することが、高齢者の心血管疾患の新たな治療戦略の一助となると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。