

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 池 末 昌 弘

学位論文題名

血管傷害後新生内膜形成におけるシンデカン-4の機能解析

【背景と目的】

新生内膜の過形成は、動脈硬化の進展や血管形成術後の再狭窄などの病態において重要な役割を果たしている。近年、冠動脈疾患などにおける動脈硬化による血管の狭窄を治療する目的で、経皮的冠動脈形成術が施行されるようになった。最近開発された薬剤溶出ステントは、血管形成術後の再狭窄率を著明に減少させることがわかり、実際の臨床の場で広く使用されるようになっているが、血管内皮の再内皮化の抑制によるステント内血栓症を起こす恐れがあり、その予防のため抗血小板療法を継続しなければならないという大きな問題がある。そのため、血管障害後の新生内膜形成の病態を解明することが、新生内膜形成を抑制するより安全で有効な治療法を開発するために必要である。

シンデカン-4 (Syn4) は、シンデカンファミリー分子の一つで、炎症や組織障害に対する生体防御に重要な働きを持つことが知られている。また、血管傷害後の血管壁において、Syn4の発現が亢進することが報告されている。更に、*in vitro*ではThrombinによるVSMCの細胞増殖や遊走に、Syn4が機能することが報告されている。これらの背景より、Syn4の血管障害後の新生内膜形成への関与と、その分子機構を明らかにすることを目的とし、本研究を行った。

【材料と方法】

ワイヤーによるマウス大腿動脈血管障害モデルを作成し、経時的に傷害血管を摘出し、血管におけるSyn4遺伝子発現変化をリアルタイムPCRで検討した。Wild type (WT) マウスと、Syn4欠損 (Syn4^{-/-}) マウスに血管障害を与え、経時的に血管を摘出し新生内膜形成の比較および組織学的検討を行った。

血管平滑筋細胞 (VSMC) の機能を検討するために、WT マウス及び Syn4^{-/-} マウスから VSMC を単離し、Basic fibroblast growth factor (bFGF)、もしくはPlatelet derived growth factor (PDGF)-BBにより誘導される細胞増殖能の比較検討を行った。更に同細胞において細胞内シグナル伝達 (ERK 及び Akt のリン酸化)、及び増殖に関与する蛋白発現 (Cyclin D1 及び Bcl-2) の比較検討を行った。

さらに、骨髄細胞上の Syn4 の新生内膜形成における機能を検討するために、WT マウスと Syn4^{-/-} マウスから骨髄を採取し、骨髄移植により、WT マウスの骨髄を WT マウスに移植した対照 (BMT^{WT}→WT) マウス、WT マウスの骨髄を Syn4^{-/-} マウスに移植した血管壁 Syn4 欠損 (BMT^{WT}→Syn4^{-/-}) マウス、Syn4^{-/-} マウスの骨髄を WT マウスに移植した骨髄由来細胞 Syn4 欠損 (BMT^{Syn4^{-/-}}→WT) マウスの三系統を作成し、血管傷害後の新生内膜形成を比較した。さらに、WT 及び Syn4^{-/-} マウスにおける血管傷害前後の VPC の末梢血における割合、及び WT マウスにおける血管傷害前後の血管平滑筋前駆細胞 (VPC) 細胞表面における Syn4 の発現をフローサイトメトリーで検討した。

【結果】

1. 血管障害モデルにおいて、血管障害 6 時間後に Syn4 の遺伝子発現亢進が認められた。また、Syn4^{-/-}マウスでは、WT マウスと比較して血管障害 28 日後における新生内膜面積が減少していた。
2. 血管障害 14 日後における、Ki-67 陽性増殖細胞の割合が Syn4^{-/-}マウスで有意に低下していたが、血管内皮の再内皮化には差がみられなかった。
3. WT マウス及び Syn4^{-/-}マウスから単離した VSMC の検討では、Syn4^{-/-} VSMC では WT VSMC と比較して、bFGF もしくは PDGF-BB により誘導される細胞増殖、ERK のリン酸化、Cyclin D1 及び Bcl-2 の発現の亢進が、いずれも減弱していた。
4. 骨髄移植を用いた検討では、新生内膜の面積は、骨髄細胞と血管壁共に Syn4 を発現する BMT^{WT→WT} マウスと比較して、骨髄細胞は Syn4 を発現し血管壁で Syn4 を欠損した BMT^{WT→Syn4^{-/-}}マウス、及び骨髄細胞は Syn4 を欠損し血管壁で Syn4 を発現する BMT^{Syn4^{-/-}→WT} マウスで、有意に減少していた。更に BMT^{WT→Syn4^{-/-}}マウスと BMT^{Syn4^{-/-}→WT} マウス間の比較では、有意な差は認められなかった。
5. Syn4^{-/-}マウスでは、WT マウスと比較して血管障害前の末梢血中 VPC の割合が有意に少なく、血管傷害後動員される末梢血中 VPC の割合の増加もみられなかった。さらに、VPC における Syn4 発現を検討したところ、血管障害 6 時間後という早期にその増加がみられ、血管障害 1 日後には通常の発現に回復していた。

【考察】

本研究では、Syn4 が VSMC の増殖を調節することにより血管障害後の新生内膜形成に関与することを明らかにした。更に Syn4^{-/-} マウスでは、WT マウスと比較して、血管内皮の再内皮化の抑制は認められなかったことから、Syn4 の抑制が血管障害後の新生内膜形成抑制の治療の標的となりうることを示唆された。

In vitro の実験により、Syn4 は bFGF もしくは PDGF-BB により誘導される VSMC の細胞増殖を調節していた。更に bFGF もしくは PDGF-BB により誘導される VSMC の ERK の活性化と、Cyclin D1 及び Bcl-2 の蛋白発現には、bFGF/PKC α シグナル伝達経路が関係していること、また、このシグナル伝達経路は Syn4 に依存していることを明らかにした。

また、BMT^{WT→WT} と比較して、BMT^{WT→Syn4^{-/-}}マウス及び BMT^{Syn4^{-/-}→WT} マウスで新生内膜の面積が減少していたことと、Syn4^{-/-} マウスにおいて血管障害前後の末梢血中の VPC の割合が、WT マウスと比較していずれも低下していたことから、VSMC のみならず、骨髄中の VPC における Syn4 も血管障害後の新生内膜形成に関与することが示唆された。

【結論】

Syn4 は血管平滑筋細胞の増殖と血管平滑筋細胞前駆細胞の動員を制御することで、血管傷害後の新生内膜形成に深く関与している。