

in vitro 虚血再灌流モデルによる
血管内皮細胞のずり応力誘導遺伝子の解析

学位論文内容の要旨

多くの組織では血流が減少すると、酸素、エネルギーの欠如とともに有害な代謝産物の除去作用にも障害を生じる。虚血による壊死巣を確実に縮小する手段としては再還流による虚血状態の解除が必須である。しかし一過性の臓器虚血のあとの臓器血流再開後に、組織細胞死、組織能障害を生じる。一過性の虚血後に生じるこのような障害を虚血再灌流障害と呼ぶ。特に虚血再灌流障害における血管内皮細胞の関与は大きい。

再灌流時における血管内皮細胞では、活性酸素等のフリーラジカルの産生、細胞内 Ca^{2+} 過負荷、サイトカインの産生や好中球、リンパ球、マクロファージ等血液細胞の組織への動員・浸潤、血管透過性の亢進や、血管内皮細胞における接着因子の発現誘導、ずり応力の変化等が起こる事が報告されている。

ずり応力は血管の粥状硬化病変との関わりから広く研究がなされてきた。その結果、生体にとって生理的な流速のずり応力は血管内皮細胞のアポトーシスを抑制するとされている。しかしながら虚血再灌流障害における血管内皮細胞の変化に対して、ずり応力がどのように関与しているかは明らかではない。本研究では、「虚血状態は血管内皮細胞のアポトーシスを引き起こし、還流に伴うずり応力負荷がそのアポトーシスを抑制する。これはある種の遺伝子発現によって制御されている」という仮説を立て、その検証を試みた。本研究の目的は、第一に *In vitro* において無栄養下における血管内皮細胞を虚血条件疑似モデルとし、血管内皮細胞のアポトーシス変化を調べること。第二に再灌流条件として虚血条件下の血管内皮細胞にずり応力を負荷し、血管内皮細胞のアポトーシス変化を調べること。第三にこれらの負荷より起こる血管内皮細胞の変化によって発現が変化する遺伝子を同定すること。第四に発現量の変化した遺伝子の血管内皮細胞におよぼす機能を解析することである。

虚血条件が血管内皮細胞の生存に与える影響を明らかにするために、*In vitro* 虚血培養条件における血管内皮細胞の経時的アポトーシス変化の割合を flow cytometry 法により検出した。負荷 12 時間後より 30% 以上のアポトーシスを認めた。この結果は、血管内皮細胞が 12 時間以上の虚血条件においてアポトーシス変化を起こすことを示している。次に、虚血培養により誘導されるアポトーシスにおけるずり応力負荷の影響を検討するために、12、24 時間の虚血培養条件でそれぞれにずり応力を負荷して血管内皮細胞のアポトーシス

の割合を同様に検出した。虚血条件の 12, 24 時間後に認められたアポトーシスがずり応力負荷群において有意に減少していることが観察された。

過去の報告から血管内皮細胞に対するずり応力の負荷は、様々な遺伝子発現を誘導することが知られている。このことと前述の結果を加味して考慮すると、ずり応力は何らかの遺伝子発現を介して虚血条件により誘導されるアポトーシスを制御していると考えられる。そこで、虚血培養条件群と虚血培養条件下・ずり応力負荷群の 2 群間のアポトーシス変化に伴い発現が変化する遺伝子を探索した結果 7 種の遺伝子が見い出された。

同定された遺伝子のうち、これまでにずり応力との関係が報告されていない遺伝子 **Rab39** に注目した。始めに、**Rab39** の遺伝子発現量変化の再現性を確認するため、虚血培養条件およびずり応力負荷条件における **Rab39** 遺伝子の発現量を RT-PCR 法及び real-time PCR 法により検出した。その結果、虚血培養条件群に対してずり応力負荷群では、約 13 倍の **Rab39** 遺伝子の発現増加が認められた。次に、虚血条件により誘導される細胞死に対する **Rab39** 遺伝子発現の影響を検討するために以下の検討を行った。即ち、血管内皮細胞に **Rab39** と標識マーカー GFP を共に強制発現し、24 時間虚血培養条件で負荷後、flow cytometry 法にて GFP 陽性細胞の割合を細胞生存率の指標として検出した。**Rab39** 強制発現群での GFP 陽性細胞は全細胞数の 62.6%であったのに対し、コントロールプラスミド導入群では 25%であった。

本研究で示した **Rab39** を強制発現した血管内皮細胞の細胞死抵抗性獲得は、虚血条件における血管内皮細胞のアポトーシス制御に **Rab39** が大きな役割をしめす可能性を示唆するものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浪 明 男

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 筒 井 裕 之

学 位 論 文 題 名

in vitro 虚血再灌流モデルによる

血管内皮細胞のずり応力誘導遺伝子の解析

多くの組織では一過性の臓器虚血のあとの臓器血流再開後に組織細胞死、組織能障害を生じる。このような障害を虚血再灌流障害と呼び虚血再灌流障害における血管内皮細胞の関与は大きい。

再灌流時における血管内皮細胞への刺激については様々な報告がされているが機械的刺激であるずり応力については明らかにされていない。

生体内で生理的ずり応力は血管内皮細胞のアポトーシスを抑制するとされている。演者らは、「虚血状態は血管内皮細胞のアポトーシスを引き起こし、還流に伴うずり応力負荷がそのアポトーシスを抑制する。これはある種の遺伝子発現によって制御されている」という仮説を立て、その検証を試みた。本研究の目的は、第一に *In vitro* において無栄養下における血管内皮細胞を虚血条件疑似モデルとし、血管内皮細胞のアポトーシス変化を調べること。第二に再灌流条件として虚血条件下の血管内皮細胞にずり応力を負荷し、血管内皮細胞のアポトーシス変化を調べること。第三にこれらの負荷より起こる血管内皮細胞の変化によって発現が変化する遺伝子を同定すること。第四に発現量の変化した遺伝子の血管内皮細胞におよぼす機能を解析することである。

虚血条件が血管内皮細胞の生存に与える影響を明らかにするために、*In vitro* 虚血培養条件における血管内皮細胞の経時的アポトーシス変化の割合を flow cytometry 法により検出した。負荷 12 時間後より 30% 以上のアポトーシスを認めた。この結果は、血管内皮細胞が 12 時間以上の虚血条件においてアポトーシス変化を起こすことを示している。次に、虚血培養により誘導されるアポトーシスにおけるずり応力負荷の影響を検討するために、12、24 時間の虚血培養条件でそれぞれにずり応力を負荷して血管内皮細胞のアポトーシスの割合を同様に検出した。虚血条件の 12、24 時間後に認められたアポトーシスがずり応力負荷群において有意に減少していることが観察された。

虚血培養条件群と虚血培養条件下・ずり応力負荷群の 2 群間のアポトーシス変化に伴い発現が変化する遺伝子を Gene Fishing 法を用い探索した結果 7 種の

遺伝子が見い出された。

同定された遺伝子のうち、Rab39 の遺伝子発現量変化の再現性を確認するため、虚血培養条件およびずり応力負荷条件における Rab39 遺伝子の発現量を RT-PCR 法及び real-time PCR 法により検出した。その結果、虚血培養条件群に対してずり応力負荷群では、約 13 倍の Rab39 遺伝子の発現増加が認められた。次に、虚血条件により誘導される細胞死に対する Rab39 遺伝子発現の影響を検討するために以下の検討を行った。即ち、血管内皮細胞に Rab39 と標識マーカー-GFP を共に強制発現し、24 時間虚血培養条件で負荷後、flow cytometry 法にて GFP 陽性細胞の割合を細胞生存率の指標として検出した。Rab39 強制発現群での GFP 陽性細胞は全細胞数の 62.6%であったのに対し、コントロールプラスミド導入群では 25%であった。

本研究で示した Rab39 を強制発現した血管内皮細胞の細胞死抵抗性獲得は、虚血条件における血管内皮細胞のアポトーシス制御に Rab39 が大きな役割をしめす可能性を示唆するものである。

審査にあたり、筒井裕之教授から、(1) ずり応力による Rab39 の過剰発現が血管内皮細胞のアポトーシスを抑制しているのか、また Rab39 の発現を抑制することでアポトーシスが誘導されるのかについて、(2) Rab39 のシグナリングパスウェイについて、(3) 四肢切断における治療の現状について、三浪明男教授から (4) 発現遺伝子解析において Gene fishing 法の有用性について、(5) Rab39 の虚血再灌流障害制御の有用性について、(6) Rab39 生体内導入における多臓器における影響について、上出利光教授から (7) ずり応力負荷の力及び時間の変化と血管内皮細胞の生存率及び Rab39 の発現量の変化の関係について、(8) Rab39 と他の虚血再灌流障害関連遺伝子との関係について、以上これら (1) ~ (8) の質問に対して今回行った実験結果と過去の文献を引用し適切に回答した。

この論文は、虚血再灌流障害における血管内皮細胞への影響について *in vitro* 虚血再灌流モデルによりずり応力の関与とずり応力により誘導された遺伝子 Rab39 の同定及びその機能を証明したことは高く評価され、今後のこの遺伝子による虚血再灌流障害の制御に大いに期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。