

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

学位論文内容の要旨

【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が示唆された。

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。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 筒 井 裕 之
副 査 教 授 久 下 裕 司
副 査 教 授 川 口 秀 明
副 査 教 授 田 中 淳 司
副 査 教 授 上 出 利 光

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

学位論文において申請者は、血管傷害後新生内膜の形成に対し、シンデカン-4 (Syn4) が関与することを明らかにし、その分子機序について詳細な報告を行った。

申請者は最初に、血管傷害モデルを用いて、血管傷害後新生内膜形成に対し Syn4 が関与するかを検討した。その結果、Wild type (WT) マウスにおける、血管傷害後早期の Syn4 mRNA 発現上昇と、シンデカン-4 欠損マウスにおける、血管障害後新生内膜形成の著明な低下を見出し、血管傷害後新生内膜形成における Syn4 の関与を明らかにした。さらに、Syn4 は、傷害血管における内皮の再内皮化とアポトーシスには影響しないが、新生内膜、及び中膜における血管平滑筋細胞 (VSMC) の増殖に関与することを示唆した。そこで、VSMC の増殖における Syn4 の機能について検討することを目的に、WT 及び Syn4 欠損マウスから VSMC を採取し、初代培養による *In vitro* の検討を行ったところ、Syn4 は Basic fibroblast growth factor (bFGF) /Protein kinase C alpha (PKC α) のシグナル伝達経路に関与し、Extracellular signal-regulated kinase (ERK) を活性化させ、その下流の cyclin D1 及び B cell lymphoma 2 (Bcl-2) の発現誘導により細胞増殖を促すことを明らかにした。

血管傷害後の新生内膜形成には、中膜から遊走する VSMC だけでなく、骨髄から動員される骨髄由来血管平滑筋前駆細胞 (VPC) も新生内膜を構成する細胞となり、血管傷害後の新生内膜形成に重要な機能を担うことが報告されている。以上の理由から申請者は、WT マウス、及び Syn4 欠損マウス各々をドナーもしくはレシピエントとし、骨髄移植により、骨髄由来細胞 Syn4 発現、血管壁 Syn4 発現キメラマウス、骨髄由来細胞 Syn4 発現、血管壁 Syn4 欠損キメラマウス、骨髄由来細胞 Syn4 欠損、血管壁 Syn4 発現キメラマウスを作製し、血管傷害モデルによる検討を行ったところ、新生内膜の形成には、血管壁、骨髄由来細胞いずれにおいても Syn4 の発現が関与することを見出した。さらに、血管平滑筋前駆細胞 (VPC) の動員に Syn4 が機能することを示した。

以上の研究内容について、副査の久下裕司教授より、1) 傷害血管における早期の Syn4 mRNA

発現変化が新生内膜形成に与える影響について、2) VSMC における Syn4 の shedding に対する関与について、副査の川口秀明教授より、3) bFGF と Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) による Syn4 を介さない独立したシグナル伝達経路について 4) 血管壁 VSMC もしくは骨髄由来 VPC の新生内膜形成に対する関与の重要性について、5) 臨床を見据えた場合の Syn4 抑制の手段について、副査の田中淳司准教授より、6) 骨髄移植の条件について、7) 骨髄中及び血中 VPC 数について、8) 傷害血管における Syn4 のタンパク質レベルでの発現変化について、主査の筒井裕之教授より、9) Syn4 以外の他のシンデカンファミリー分子における血管傷害後新生内膜形成における関与について、10) Syn4 欠損による他の分子の発現への影響について、11) Syn4 発現変化が報告されている他の疾患と Syn4 発現に影響を与える因子について、副査の上出利光教授より、12) 内皮の再内皮化に関して、14 日以外での検討の有無について、13) VSMC 遊走に対する Syn4 の関与の有無について、14) VPC と定義した細胞の VSMC への分化の確認の有無について質問を受けた。申請者は何れの質問に対しても、自己の実験データや過去の報告を引用しながら概ね適切な回答をなし得た。

この論文は、Syn4 が血管傷害後新生内膜の形成に関与することを証明した。その分子機序として、1) Syn4 は bFGF/PKC α シグナル伝達経路に機能し、cyclin D1 及び Bcl-2 発現を導くことで VSMC 増殖を促すこと、2) Syn4 は VPC の動員に機能することが明らかとなった。一方で、Syn4 は内皮の再内皮化に影響を及ぼさないことを証明している。これらの成果は、Syn4 が臨床において、現在でも重大な問題が残されている、血管形成術後の再狭窄に対する新たな治療標的となることを示唆するものである。

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。