

氏名	みわけん 三和健
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第529号
学位授与年月日	平成17年 9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Inhibition of ets, an essential transcription factor for angiogenesis, to prevent the development of abdominal aortic aneurysm in a rat model (血管新生時の必須転写因子阻害によるラットモデルにおける腹部大動脈瘤進展の抑制)
学位論文審査委員	(主査) 井上貴央 (副査) 村脇義和 應儀成二

学位論文の内容の要旨

腹部大動脈瘤では、炎症が中膜の構造破壊に関与し、外膜のリモデリングを促進して瘤化の進展に重要な役割を果たしている。血管のリモデリングには、マクロファージ、平滑筋細胞、内皮細胞から分泌されるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)が作用する。この蛋白分解酵素とその mRNA が大動脈瘤の症例で増加していることから、MMPs が大動脈瘤の進展に関与していると考えられている。従って、MMPs 活性を抑制する薬物治療的戦略は、動脈瘤の拡大を阻止し、外科的治療を回避することができるものと期待される。ets は MMPs を制御する転写因子であるが、大動脈瘤の病態における ets の役割は未だ十分に解明されていない。そこで、本研究では動脈瘤の進展過程における ets の役割を検討した。

方法

動物実験では、雄の Wistar 系ラットにエラスターゼ暴露によって腹部大動脈瘤を作製した。この大動脈瘤に 400 nmol/cm² の ets デコイを含有するシートを被覆して、血管外壁よりデコイを導入した。また、コントロール群として、スクランブルデコイ(scrambled decoy: SD)を導入した。エラスターゼ投与後、超音波断層法により瘤径の変化を計測した。瘤壁の総 RNA を抽出し、electrophoretic mobility shift assay により ets の活性を、Western blot によりエラスチンの発現を定量した。さらに、RT-PCR や Real-time PCR を用いて、MMPs の mRNA 発現を測定した。病理組織学的には、HE 染色により動脈瘤の構造を、Miller's elastin and van Gieson's (EVG) 染色によりエラスチンを評価した。また、*in situ* gelatin zymography により、MMPs 活性を測

定した。ex vivoの実験では、ヒト大動脈瘤の培養組織にデコイを導入し、etsの活性やMMPsの発現を分析した。

結 果

ラットを用いたモデル実験では、デコイ導入は主に大動脈の外膜側に確認できた。EMSAでは、SD導入群に比べ、etsデコイの導入はetsの活性を抑制した($P < 0.01$)。超音波断層法では、デコイ導入群は、SD導入群よりエラストラーゼ投与後の瘤径拡大を68%抑制し、その抑制効果は、エラストラーゼ投与の4週後にも認められた。病理組織学的分析において、動脈径の拡大や外膜肥厚は、etsデコイの導入により抑制された。EVG染色によって、etsデコイの導入によるエラスチンの破壊抑制が示され、その抑制効果は、エラスチンのWestern blotでも確認できた($P < 0.05$ vs SD)。RT-PCR、及びReal-time PCRによって、MMP-3、MMP-9のmRNA発現はetsデコイの導入により抑制されたことが明らかになった($P < 0.01$)。さらに、in situ gelatin zymographyによって、動脈外膜におけるMMPの活性が有意に抑制されていることが分かった。

ヒト大動脈瘤の実験では、etsの活性は、大動脈瘤の最大部より頸部で上昇しており($P < 0.01$)、培養組織へのetsデコイの導入ではMMP-1、MMP-9の分泌が抑制された($P < 0.05$)。

考 察

腹部大動脈瘤の進展には、MMPs (特にMMP9)が重要な役割を果たすと考えられている。MMPsは大動脈壁の中膜や外膜のマクロファージで発現し、大動脈壁のエラスチンを破壊して、血管のリモデリングを誘導し、引いては大動脈瘤が進展すると考えられている。一方、etsは細胞外基質の破壊に関与する蛋白分解酵素を認識する遺伝子の転写活性に必要とされる。従って、etsはMMPsを介して、腹部大動脈瘤の進展に関与している可能性があると考えられる。

本研究では、腹部大動脈瘤の進展におけるetsの役割を解明するため、etsデコイの導入により、ラットモデルとヒト大動脈瘤組織にて検討した。ラットの大動脈瘤の作製に使用したエラストラーゼには、遺伝子のプロモーター領域に二つのetsファミリーのコンセンサス配列が含まれており、陽性のフィードバックが存在する可能性がある。従って、ヒトの腹部大動脈瘤とは異なる病態も推定されている。

ラットモデル実験では、ets活性、MMP-3、MMP-9のmRNA発現を抑制するとともに、大動脈瘤の拡大が抑制された。さらに、病理組織学的分析によって、etsデコイによって細胞外基質の破壊と大動脈瘤の拡大が抑制されたことが明らかになった。ヒト大動脈瘤の組織培養において、etsデコイは、ets活性を抑制するとともに、MMP-1、MMP-9の発現を選択的に抑制した。以上の結果から、etsはMMPsの活性を介して大動脈瘤の拡大に重要な役割を果たしていることが示唆された。しかしながら、大動脈瘤の進展には、TIMPsやNFkBなどの複雑な因子が介在することが報告されており、今後これらの因子との関係をさらに検討する必要があると思われる。

結 論

ets デコイを導入したラット大動脈瘤モデル実験、並びにヒト大動脈瘤組織実験において、ets は MMPs を介して大動脈瘤の進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、大動脈への ets デコイの導入により、ラットモデル並びにヒト大動脈瘤組織において、大動脈瘤の進展過程における ets の役割について分析したものである。その結果、ラット大動脈へのデコイ導入により、ets の活性を抑制し、エラスターゼ投与後の瘤径拡大を 68%抑制したこと、また、病理組織学的分析において、エラスターゼ投与による動脈拡大や外膜肥厚を抑制したこと、EVG 染色では、エラスチンの破壊を抑制したこと、その抑制効果は、エラスチンの Western blot でも確認できたこと、そして、RT-PCR、及び Real-time PCR による MMP-3、MMP-9 の mRNA 発現を抑制したこと、*in situ* gelatin zymography では、動脈の外膜における MMP の活性を有意に抑制したこと、ヒト大動脈瘤の組織培養において、ets 活性の抑制と共に、MMP-1、MMP-9 の発現を選択的に抑制したことが明らかになった。

これらの知見は、腹部大動脈瘤の進展における ets の役割の解明に大きく寄与するものであり、明らかに学術の水準を高めたものと認められる。