

氏名	い がわ ごう 井 川 剛
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第545号
学位授与年月日	平成18年 3月10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	細胞質ホスホリパーゼ A2 α 欠損による動脈硬化の抑制
学位論文審査委員	(主査) 重政千秋 (副査) 井藤久雄 久留一郎

学位論文の内容の要旨

動脈硬化の病態には粥状硬化とそれ以外の動脈硬化があり、前者は脂質・糖質・炎症細胞・血管細胞からなる粥腫を中心とした血管病変を、後者は血管平滑筋細胞・弾性線維・間葉系細胞の増殖・肥厚を中心とした病変を意味している。臨床における血管病変はこの両方の特徴を合併することが多く、その治療には両メカニズムの解明・治療法の開発が必要不可欠である。ここ約10年の間に粥状硬化については炎症との関連が指摘され、炎症細胞の粥状硬化に及ぼす影響や血管の炎症を抑制する方法が盛んに検討されるようになってきているが、動脈硬化と炎症との関連についてはほとんど報告されていない。また炎症反応に関する経路として細胞膜のリン脂質が細胞質型 phospholipase A2 (cPLA2) を介してアラキドン酸に代謝されプロスタグランジンやロイコトリエンが産生される系であるアラキドン酸カスケードが最も良く知られており、プロスタノイドと粥状硬化との関連が報告されている。これらのことから、cPLA2 α 遺伝子欠損マウス [cPLA2 α (-/-)] を用いて cPLA2 の動脈硬化形成における役割を検討した。

方法

実験に用いるマウスの cPLA2 α 遺伝子型は PCR 法にて確認した。オスの野生型マウス [cPLA2 α (+/+)] と cPLA2 α (-/-) を用いて、左総頸動脈を結紮 28 日後に、総頸動脈の新生内膜面積/血管面積比を計測し病理学的形態評価を行うとともに、新生内膜の構成細胞について、 α smooth muscle cell actin 免疫組織化学染色を用いて評価した。また cPLA2 α (+/+) と cPLA2 α (-/-) の左総頸動脈結紮 6 日後に心臓より採血し、血漿プロスタグランジン E2 (PGE2) の濃度を市販の ELISA キットを用いて測定し、比較した。c57bl/6J マウスの胸部大動脈の血管平滑筋細胞 (vascular smooth muscle cells: VSMCs) を組織培養し、cPLA2 阻害薬である AACOF3 添加 48 時間後の細胞数と培養液中の PGE2 濃度を測定した。さらに c57bl/6J マウスにプロテオースペプトンで腹膜刺激して得た腹腔内マクロファージとマウス VSMCs の共培養を行い、VSMCs の

細胞増加数を計測した。

結 果

cPLA2 α (+/+) の左総頸動脈結紮部位近位側では新生内膜の強い増殖が認められ、同部位における cPLA2 α (-/-) の新生内膜面積 / 血管面積比は有意に減少していた [cPLA2 α (+/+) : 50.62 \pm 57.50, cPLA2 α (-/-) : 10.32 \pm 24.84, $p < 0.01$]。 α smooth muscle cell actin 免疫組織化学染色の結果、この新生内膜を構成する細胞はほとんどが VSMCs であった。培養 VSMCs 増殖は AACOF3 添加により有意な影響は認められなかったが、培養液中の PGE2 の濃度は AACOF3 添加により有意に減少した ($p < 0.05$)。cPLA2 α (+/+) と cPLA2 α (-/-) 両群の左総頸動脈結紮 6 日後の血漿 PGE2 濃度に有意差は認めなかった。腹腔内マクロファージとマウス VSMCs の共培養による VSMCs の細胞数増加は認められなかった。

考 察

今回 *in vivo* において、cPLA2 α (-/-) マウスでは、cPLA2 α (+/+) マウスに比して新生内膜の増殖が抑制され動脈硬化が抑制されることが示された。頸動脈結紮モデルは血管内皮細胞が保存されたままの状態では血管中膜・新生内膜が肥厚するモデルであり、臨床的には高血圧などによる動脈硬化のモデルと考えられ、cPLA2 α の抑制は動脈硬化を抑制しうる可能性を示唆している。新生内膜の構成細胞のほとんどが VSMCs であることから、*in vitro* で cPLA2 阻害薬で VSMCs の cPLA2 活性を抑制したが、増殖は抑制しなかった。このことは VSMCs そのものの cPLA2 活性は VSMCs 増殖には関与しておらず、cPLA2 阻害のターゲットは VSMCs ではない可能性を示唆している。頸動脈を結紮した cPLA2 α (+/+) マウスと cPLA2 α (-/-) マウスの血漿中の PGE2 濃度に有意差は認められず、循環血漿中のアラキドン酸代謝産物が新生内膜増殖へ関与する可能性は否定的と考えられた。炎症細胞の代表格であるマクロファージと VSMCs の共培養を行ったが、マクロファージによる VSMCs の増殖作用は認められず、マクロファージの新生内膜増殖への関与の可能性も低いものと考えられた。これらの結果から cPLA2 α 遺伝子欠損による新生内膜増殖抑制のメカニズムとしては、VSMCs 自身の cPLA2 α や催炎症性プロスタノイドを含む炎症反応は関与していないものと考えられた。本実験モデルは血管内皮細胞が保存されたまま血流が遮断され物理的な刺激が急激に変化するため、VSMCs や血管内皮細胞への物理的・化学的刺激で cPLA2 α の関与する経路が活性化され、VSMCs の増殖が刺激されて新生内膜増殖を起こしている可能性が考えられるが、今後詳細なメカニズムを検討する必要がある。今回の結果は cPLA2 の動脈硬化への関与が示唆され、今後その詳細な機序の解明がなされることにより動脈硬化治療のさらなる発展が期待される。

結 論

cPLA2 α (-/-) マウスでは動脈硬化が抑制されることが示された。その機序として VSMCs 自身の cPLA2 活性、循環血漿中の炎症性プロスタノイドの関与、またマクロファージの VSMCs への直接的な関与は否定的と考えられ、今後本実験モデルを用いて物理的・化学的刺激と cPLA2 の関与する経路と

の関連などについて検討する必要がある。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は炎症と動脈硬化の関連を調べるため、細胞質型 phospholipase A2 (cPLA2) α 遺伝子欠損マウスを用い、cPLA2 の動脈硬化への関与を検討したものである。その結果、cPLA2 α 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比べ動脈硬化である血管の新生内膜増殖が抑制された。新生内膜の主な構成細胞である血管平滑筋細胞 (VSMCs) 自身の cPLA2 の関与、循環血漿中のプロスタグランジン E₂、またマクロファージの VSMCs 増殖への関与も否定的であった。これらの結果から、cPLA2 α 遺伝子欠損マウスにおける動脈硬化のメカニズムとして VSMCs 自身の cPLA2 α や催炎症性プロスタノイドを含む炎症反応の関与は否定的であり、他の物理的刺激などにより cPLA2 α の関与する経路が活性化され、VSMCs の増殖が刺激されて新生内膜増殖を起こしている可能性を示唆した。本論文の内容は、動脈硬化に起因する虚血性疾患の分野で、動脈硬化への炎症の関与を示唆するものであり、明らかに学術の水準を高めたものと認める。