

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 吹野 恵子

本研究は、虚血性疾患における側副血行路の形成に、臨床的に大きな影響を与えると考えられている加齢および遺伝的要因の違いに着目し、マウスを用いて老化抑制遺伝子および遺伝的背景の相違が血管新生能に与える影響とそのメカニズムを検討し、より有効で安全な血管新生療法の可能性を検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. 外来導入遺伝子による血管新生療法として、ウイルスベクターを用いた場合の安全性が必ずしも確立されてはいないため、プラスミドを直接筋肉内に注射する投与方法が安全で、かつ安価な方法として広く用いられているが、遺伝子導入効率が低く、また発現効率が個体間で大きく異なることが問題となっていた。本研究ではこれまでに遺伝子導入効率を上昇させるとの報告のある electroporation とプラスミド筋注の併用により、ウイルスベクターに匹敵する遺伝子導入効率を得ることができることを β -ガラクトシダーゼアッセイおよびルシフェラーゼアッセイを用いて2つの方法を直接比較することで示した。
2. 遺伝的背景の異なる3系統の inbred マウス (C57BL/6J, C3H/HeN, BALB/c) を用いて下肢虚血モデルを作成し、血流の回復をレーザードップラーシステムを用いて経時的に検討したところ、血流の回復が3系統のマウスで著しく異なっていることが示された。さらに、それぞれのマウスで形成された新生血管を CD31 に対する免疫染色で検出し、 1mm^2 当たりの新生血管密度を計測したところ、血流の回復に相関して新生血管密度も各系統のマウスで異なっていることが示された。
3. 3系統のマウスを用いて下肢虚血モデルを作成し、虚血刺激に暴露された下肢筋肉を採取し、血管新生において中心的な役割を果たすと考えられている VEGF の発現量を RT-PCR にて検討したところ、マウスの血管新生能と VEGF の発現量が相関していることが示された。しかしながら、VEGF 遺伝子を electroporation を用いて導入した実験では、血管新生能の高いマウスでは外来 VEGF の投与に良く反応したが、最も血管新生能の低かったマウス(BALB/c

マウス)ではほとんど反応が見られないことが示された。さらに、各系統のマウスにおける 2 種類の VEGF 受容体、すなわち VEGFR-1(Flt-1)および VEGFR-2(Flk-1/KDR)の発現量を下肢筋肉を用いたウェスタンブロッティングで検討したところ、血管新生能が低下しているマウスでは、VEGF のみならず、血管新生において重要であると言われている受容体 VEGFR-2(Flk-1/KDR)の発現誘導が著しく低下していることが示された。以上より、有効な治療的血管新生を得るためには VEGF 単独投与では不十分である可能性が示された。

4. 血管新生能と関連が深いと言われている炎症細胞の浸潤について免疫染色を用いて各系統のマウスで検討したところ、T 細胞およびマクロファージの浸潤が、血管新生能の低いマウスでは低下していることが示された。

5. 血管新生能に関する形質の遺伝形式を調べるため、最も血管新生能の高かったマウス(C57BL6/J)と最も血管新生能の低かったマウス(BALB/c)の hybrid マウスを作成し、その血管新生能を同様の方法で検討したところ、F1 マウスでは C57BL6/J に近い形質を示すことが示された。このことから、この形質が優性遺伝する可能性が示唆された。

5. 加齢動物における血管新生能低下のメカニズムの一つであると言われている、加齢による内皮機能の障害を制御すると考えられる老化抑制遺伝子 klotho の血管新生能に与える影響を、挿入突然変異により klotho 遺伝子の発現を低下させた klotho マウスのヘテロ接合体を用いて検討した。他の実験と同様に下肢虚血モデルを作成し、血流の回復および新生血管の形成を検討したところ、klotho 遺伝子の発現が低下したマウスでは血流の回復、新生血管の形成ともに野生型マウスより低下していることが示され、klotho 遺伝子が直接的、または間接的に血管新生能の制御に関与している可能性が示唆された。

以上、本論文は成体における血管新生能の違いが遺伝的に規定されていることを 3 系統の遺伝的に異なるマウスを用いて虚血刺激に対する血流の回復および新生血管の形成を解析することで明らかにし、その血管新生能の違いが成長因子の発現量のみでなく、その受容体システムの発現にも大きく影響されていることを明らかにした。また、ウイルスベクターを用いずに外来遺伝子を導入する方法として electroporation の有効性を検討し、ウイルスベクターに匹敵する遺伝子導入効率を得られることを示した。さらに、加齢現象を制御すると考

えられる klotho の発現が低下したマウスを用いて血管特異的に AM を過剰発現する遺伝子改変マウスでその血管新生能を検討し、klotho 遺伝子が血管新生能の制御に関わる可能性を明らかにした。以上の結果は血管新生の病態整理の解明に寄与するものであり、今後、有効な血管新生療法を考える上で臨床応用につながる科学的貢献度の非常に高い研究であり、本学の医学博士論文として学位の授与に値するものと考えらる。