

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 村田幸久

論文題目

低酸素誘発性肺高血圧症における肺動脈内皮機能障害機構と治療法に関する研究
Studies on the mechanism of vascular endothelial impairments and approaches to therapy for hypoxia-induced pulmonary hypertension

肺高血圧症は慢性気道閉塞疾患や僧帽弁狭窄など生体が低酸素状態になる心肺疾患に併発し、肺血管に限局して発症する。血管内皮細胞は NO を始めとする血管弛緩物質を放出することによって、血圧を調節する働きを担っている。内皮細胞の機能障害は肺高血圧症の病態発症と進行に重要な要因であると考えられてきたが、その詳細な機構は明らかにされていない。また近年ウイルスベクターを用いた遺伝子治療が様々な血管病態に有効であると考えられているが、ベクター感染によって誘起される血管壁の炎症が問題となっている。

これらの背景を踏まえ、本研究では 1) 肺高血圧症における肺動脈内皮機能障害機構の解明、2) 肺高血圧症治療法の探索について、肺動脈の低酸素下器官培養技術 (*in vitro*) と低酸素誘発性肺高血圧症モデルラット (*in vivo*) の 2 つの実験系を用いて検討し、以下の結果を得ている。

1. 低酸素誘発性肺高血圧ラット肺動脈における血管内皮 NO 産生障害のメカニズムの解析

本項目では低酸素環境下(10%O₂)で 1 週間飼育したラットを肺高血圧症モデルとして用いた。低酸素負荷摘出肺動脈では、Carbachol (CCh)刺激時の NO 産生量減少が確認された。内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) は Ca²⁺流入後、細胞膜構造蛋白質 caveolin-1 からの解離、さらにはリン酸化酵素である Akt による eNOS のリン酸化などの複雑な制御を受ける。本研究では eNOS 活性系に関わるこれら機能蛋白質群と eNOS との相互関係を中心に検討を進めた。Whole-mount immunostaining 解析により、肺動脈内皮細胞の萎縮と eNOS 蛋白質の細胞膜への濃縮が観察され、さらに免疫沈降法を用いた検討で、低酸素負荷標本において CCh 刺激による eNOS の caveolin-1 からの解離が減少していることを明らかにした。

2. HMG-CoA 還元酵素阻害剤、Fluvastatin の低酸素誘発性肺高血圧ラット肺動脈における内皮細胞保護効果の検討

1 mg/kg Fluvastatin の連日経口投与は 1-3 週間低酸素環境下で飼育したラットに観察される肺高血圧症状を改善することが明らかにした。eNOS の蛋白翻訳以降の活性機構に対する Fluvastatin の効果を検討した結果、Fluvastatin は低酸素負荷による肺動脈内皮細胞の萎縮、内皮細胞内の eNOS と caveolin-1 蛋白質の濃縮を抑制し、その結果受容体刺激による eNOS

リン酸化量減少を有意に回復させることが分かった。

3. 長期低酸素負荷ウサギ肺動脈組織培養標本における血管内皮 NO 産生障害のメカニズムの解析

本項目ではウサギ内肺動脈を無菌的に摘出し、低酸素環境下(5%O₂)で1週間培養したものをを用いて検討した。低酸素環境下において7日間培養した肺動脈において、NO 産生量の低下とそれに伴う内皮依存性弛緩反応の低下が認められた。組織学的な検討の結果、低酸素環境下で培養した内肺動脈内皮細胞では、細胞は萎縮し、細胞内の eNOS と caveolin の細胞内局在に変化が認められた。

4. 糖質コルチコイド、Dexamethasone の低酸素負荷肺動脈組織培養標本における内皮細胞保護効果の検討

本項目においても上記ウサギ肺動脈の1週間低酸素環境下(5%O₂)肺動脈組織培養標本を用いた。3 μM Dexamethasone の同時処置は1週間低酸素負荷肺動脈標本において見られた内皮依存性弛緩反応障害と NO 産生能低下を有意に回復させた。さらに、形態学的検討により Dexamethasone は長期低酸素負荷による肺動脈内皮細胞の萎縮を抑制することを見出した。

5. アデノウイルスベクター感染に対する肺動脈内皮細胞の抗ウイルス感染機構の解析と Dexamethasone の遺伝子導入効率向上効果

β-galactosidase adenovirus vector (β-gal-Ad)を肺動脈組織培養標本に感染させると内皮細胞はアポトーシスを起こし、内弾性板より剥離していることが観察された。RT-PCR の結果これらの障害は内皮細胞内の炎症を伴っていることが分かった。3μM Dexamethasone を β-gal-Ad 感染と同時に処置するとサイトカイン発現は抑制され、内皮細胞の形態と機能を維持したままβ-gal の発現量は大幅に上昇することが分かった。

以上、本研究の結果から、長期低酸素負荷肺高血圧症モデルラットの肺動脈内皮細胞における NO 産生能の低下は内皮細胞の形態変化を伴った、NO 合成系に関わる機能蛋白質と eNOS の相互関係異常によることが初めて示された。HMG-CoA 還元酵素阻害剤はこれら eNOS 蛋白質翻訳以降の異常を改善することにより、低酸素誘発性肺高血圧病態の発症、進行抑制に効果を発揮することが明らかとなった。他方組織培養法を用いた研究においては、低酸素が直接肺動脈内皮細胞に障害を誘起すること、更に Dexamethasone は本系において低酸素誘発性肺動脈内皮細胞障害に回復効果をもつことを明らかにした。そして、血管内皮細胞には細胞特異的に抗アデノウイルス感染機構が存在し、かつ遺伝子導入効率に抑制をかけていること、さらに Dexamethasone はこの内皮細胞の抗アデノウイルス感染機構を抑制し遺伝子導入効率を有意に上げることが明らかにされた。

以上のように、本研究は難治性疾患肺高血圧症に関し、低酸素モデルを用いて多角的に検討したものであり、学術上寄与するところは少なくない。よって審査員一同は本論文が博士(獣医学)の学位に値するものと判断した。