

論文の内容の要旨

論文題目 ずり応力による細動脈拡張に関する研究

ジストロフィン欠損マウスにおける拡張障害

指導教官 形成外科 朝戸裕貴助教授

東京大学大学院医学研究科

平成12年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 佐藤克二郎

筋ジストロフィーは骨格筋の変性・壊死を主病変とし、臨床的には進行性の筋力低下をみる遺伝性の疾患である。ジストロフィンとは細胞骨格蛋白の一つで、この欠損により筋細胞の脆弱性が高まり、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)が発症する。患者は10歳頃より歩行困難となり、30代には呼吸不全、あるいは心不全で死亡する。心不全については病理学上、心筋の壊死が冠動脈の末梢の特定部位におこることが知られている。

DMDに対して全身の骨格筋および心筋におけるジストロフィンの永続的な発現による症状改善を目指して、現在遺伝子治療が試みられている。しかしジストロフィンの分子量が大きいため、使用可能なウイルスベクターに組み込みができない、あるいは短縮型ジストロフィンを使用しても免疫による導入低下な

どで未だ臨床応用が困難な状態である。現在確立された治療法としてはステロイド剤の投与のみである。今後、造血幹細胞の使用等、再生医療の手法を用いた治療の発展が期待されるが、現在の患者を対象とした治療研究・開発も継続されている。とくに心不全については、血管拡張剤の投与が行われている。

ジストロフィンの細胞からの欠損により、筋細胞膜鞘 (sarcolemma) からジストロフィン・グリコプロテイン複合体(DGC)の全てが欠損する。DGCの構成要素の一つに $\alpha 1$ シントロフィンがあり、神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)はそれに結合し sarcolemma に固定されている。一酸化窒素(NO)は血管拡張因子として、体内で合成酵素(NOS)により産生される。ジストロフィン欠損では、nNOSはmRNAの発現から低下しており、筋再生がおこなわれても細胞の成熟が低い内に再び筋が壊死するために、結果として筋からnNOSが著しく減弱すると考えられている。nNOSの欠損により筋収縮時のNO合成量が減少し、アドレナリン作動薬による血管収縮に拮抗する血管拡張能に障害があることが知られていた。またDMDのモデルマウスである *mdx* マウスにおいては頸動脈、腸管膜動脈では必ずり応力に対する拡張能が障害されていた。今回我々は、*mdx* マウス、DGCの構成要素である $\alpha 1$ シントロフィンの欠損マウス ($\alpha 1syn^{-/-}$)、そしてNOSのアイソフォームの中で細胞に構成的に発現するnNOSと内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の欠損マウス ($nNOS^{-/-}$ と $eNOS^{-/-}$) を用いて、薬剤および必ずり応力に対する骨格筋内細動脈の血管拡張に関して、睾丸挙筋を用いた実験系を開発し、生理学的および組織学的な検討を行いnNOSの発現とその機能に関して研究を行った。血行を保ったまま骨格筋内の細動脈を観察するために、従来ラットで広く行われ

ていた睪丸挙筋を用いた実験方法を、顕微鏡を使用してマウスに応用した。麻酔後にマウスを実験用ステージに載せ、囊状になった睪丸挙筋を、神経血管を避けて切離し生理学的緩衝液を環流させながら、薬剤投与と結紮によりずり応力を加えた。

血管拡張を示す薬剤として NOS の刺激薬であるアセチルコリンと NO の供給をするソディウムニトロプルシドを用いた。両薬剤ともに、どの遺伝子欠損マウスも対照となるマウスとの間で細動脈の拡張性に有意な差がなかった。しかし、ずり応力に対する血管拡張反応は NOS の阻害剤により拮抗し、*mdx* マウスと *nNOS*^{-/-} においては対照とするマウスに対して拡張性の減少が有意に認められた。一方 *α1syn*^{-/-} においてはその野生型と有意差を認めず、また *eNOS*^{-/-} においても同様だった。これらの拡張性の差は組織内における nNOS の細胞内での分布には依存せず、発現量に起因すると考えられた。

組織学的な検討では *mdx* マウス以外に筋の壊死再生を呈するマウスはなく、また明らかな血管構造の異常も認めなかった。nNOS に対する免疫組織染色では *mdx* マウスと *nNOS*^{-/-} においては、ほぼ nNOS の発現は見られなかった。*α1syn*^{-/-} においては sarcolemma に固定されず細胞質内にとどまって発現していた。しかし *eNOS*^{-/-} においては細胞質内に弱いものの nNOS の発現が見られ、代償的な upregulation が起こっている可能性が示唆された。また *nNOS*^{-/-} においても代償的な eNOS 発現増強の可能性が示唆された。

本研究によりジストロフィン欠損において、骨格筋内の細動脈がずり応力に対する血管調節が不十分であることを示し、それが nNOS に起因することを明ら

かにした。*mdx* の nNOS トランスジェニックマウスでは、その病理型が改善する事が既に報告されており、本研究の結果と合わせて nNOS 欠損による不十分な血管拡張応答がジストロフィン欠損における骨格筋での病理型に関与すると考えられた。また、本研究がずり応力とそれに対する nNOS の関係を明らかにしたことは、今後筋ジストロフィーにおいて血管調節の影響について研究することの有用性を保証するものである。ジストロフィン欠損の骨格筋内でも血管拡張薬が有効に働くことを示唆し、現在遺伝子治療を含め、ステロイド剤以外に有効な治療法が確立されていない DMD の表現型を改善するために、血管拡張薬による薬剤治療が一つの可能な選択肢であることを示した。