

審査の結果の要旨

氏名 和田 裕美

本研究は、我が国において世界平均の2倍の発生頻度である「くも膜下出血」について、その病態を明らかにするため、ラットを用いて網羅的遺伝子解析を行った。正常脳血管の遺伝子レベルでの臓器特異性、およびくも膜下出血モデルにおける経時的遺伝子発現の変化を解析し、仮説を導き出したうえで、GFP トランスジェニックラットを用いた骨髄移植モデルにより、仮説検証を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 組織検体および初代培養細胞における網羅的遺伝子解析を行った結果、神経系発達期において重要な遺伝子群である Notch system、Ephrin system、Neuropilin-1 などが体血管を含め、成体血管系に存在していた。特に脳血管では、内皮細胞において Notch-1 とリガンドである jagged-1、および Ephrin A1 が特異的に発現しており、この Notch system は、くも膜組織に特異的に発現していた BMP-7 と内皮細胞における相互作用が認められたことが報告されている。また、動脈特異的に発現する Ephrin B2 の受容体である Eph B2 がくも膜組織に存在していた。さらに、VEGF 受容体であり、血管透過性および内皮細胞の migration を誘導することが報告されている Neuropilin-1 については、大動脈には発現しているものの、脳血管には発現せず、くも膜組織にのみ発現していた。これらの結果は、脳血管系は大動脈血管と異なる発現型をもち、くも膜組織と機能的相互作用を有している可能性を示唆するものであった。

2. ラットくも膜下出血を用いた網羅的遺伝子解析の結果、くも膜下出血に続く血管攣縮早期には、ウィリス動脈輪・くも膜組織いずれにおいても Fas-Fas ligand apoptosis が関与し、続く攣縮極期には Stress induced/Bax induced apoptosis、さらにウィリス動脈輪では TNFR induced apoptosis が関与していることを示す結果が得られた。同時期に抽出された遺伝子群には、多くの Hematopoietic stem cell (HSC)、前駆細胞に関連した遺伝子群が含まれ、くも膜組織で BMP システムの活性化が起こっており、この BMP と相互作用を持つ Notch/Noggin/FGF/Wnt system に関する遺伝子群すべてが BMP の経路を活性化する方向に動いていた。しかし、ウィ

リス動脈輪では、BMP の細胞内シグナルに関する蛋白の OAZ が高発現していた以外は、続くシグナル伝達に関する遺伝子の発現が低下しており、この系以外の幹細胞・前駆細胞関連遺伝子群においても同様の結果であった。さらに、内皮細胞における NO 産生機能回復に関係した Klotho が同時期にくも膜組織で高発現していたものの、Klotho ノックアウトマウス同様に calpastatin が低下しており、ウィリス動脈輪における機能回復が攣縮極期では困難な状況にあることを示す結果であった。攣縮回復期 day14 においては、くも膜組織において BMP/FGF/Shh system に関連した遺伝子群が抽出され、Shh 経路の抑制、BMP 経路の回復が認められた。このことは、くも膜下出血後の機能回復にくも膜組織とウィリス動脈輪の相互作用が重要な役割を持っていることを示すとともに、この相互作用が攣縮極期には発揮できないでいることを示唆する結果でもあった。

3. これらの遺伝子解析結果をふまえて、我々は、くも膜下出血に続く脳血管攣縮の病態に、アポトーシスを主体とした血管内皮細胞障害による NO 産生低下などの機能障害が攣縮発生に関与し、攣縮からの回復にはこれらの機能修復として骨髄由来内皮細胞の動員による内皮再生が必要とされているのではないかという仮説を立てた。この仮説を検証するため、攣縮血管における内皮細胞のアポトーシスについては、TUNEL 染色法により攣縮極期 Day7 におけるアポトーシスを確認し、さらに GFP transgenic rat を用いた骨髄移植モデルによるくも膜下出血モデルを用いて、共焦点顕微鏡による骨髄由来幹細胞の分布を観察した。結果、攣縮回復期にあたる Day14 をピークに骨髄由来内皮細胞の増加が確認された。このことは、骨髄由来内皮細胞の動員がくも膜下出血発症後、二週間かけて行われ、かつ攣縮からの回復に寄与している可能性を示唆するものであり、我々の仮説を支持する結果であった。さらに、攣縮回復後の Day21 にはその細胞数が統計学的には有意でないものの減少傾向を認めていることから、骨髄由来内皮細胞は攣縮からの回復後、自家内皮細胞に置き換えられている可能性も考えられた。

以上、本論文は、脳血管における網羅的遺伝子解析に始まる特異な遺伝子発現型の検討によって、脳血管系は体血管と異なる発現型をもち、くも膜組織と機能的相互作用を持つ可能性を見出し、くも膜下出血における血管攣縮期の遺伝子解析に基づいて、アポトーシスを主体とする内皮脱落が攣縮の誘因の1つであり、骨髄由来内皮細胞による内皮修復によって攣縮が解除されるという仮説を組み立てるに至った。さらに、骨髄移植ラットを用いた解析によりそれを支持する結果を得て、骨髄由来内皮前駆細胞の動員作用が攣縮回復に効果を発揮する可能性を明らかにし

た. よって, 未だ解明されていない、くも膜下出血における血管攣縮発生の機序に新たな知見を与え, 新たな治療法の確立に重要な貢献をなすと考えられ, 学位の授与に値するものと考えられる.