

論文の内容の要旨

論文題目 アドレノメデュリンの血管新生作用に関する研究

指導教官 永井良三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 阿部美南

【研究の背景】

アドレノメデュリン(adrenomedullin ; AM)は、ヒト褐色細胞腫組織抽出液から発見された強力な血管拡張性ペプチドである。しかし、AM は副腎髄質だけでなく全身の様々な臓器で発現・分泌されており、肺・腎臓・心臓・血管など循環調節に重要な臓器での発現量が多い。強力で持続時間の長い血管拡張作用を持ち、アルドステロンの分泌抑制作用や利尿作用などで全体として血圧を低下させる方向に作用する。この血管作用の少なくとも一部は内皮依存性であり、NO を介する事が知られている。また AM による NO 遊離作用は phosphatidy inositol 3-kinase (PI3K) /Akt を刺激し、内皮型 NO 合成酵素(eNOS)を活性化することが知られている。また単に血管作用ばかりでなく、血管平滑筋や心筋細胞増殖抑制作用、血管内皮細胞のアポトーシス抑制作用を有し、各種の臓器障害に対し臓器保護的に作用していると考えられている。AM 遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスは血圧の低下が確認されているが、AM の欠損マウスは homo(-/-)では胎児致死に至り、hetero(+/-)では各種の臓器障害を伴うことが報告されている。この報告も AM が生体において重要な物質であることを示している。また、AM は病的状態、つまりは虚血や炎症といった血管新生と深く関わると思われる状態で非常に発現が増強していることが報告されている。こういった事実から、我々は AM が血管新生に対して何らかの影響をもっているのではないかと考えた。そこで我々は、外因性に投与した AM の過剰発現した組織が、急性虚血に対して、側副血行促進を増強するのではという仮説を立て、いくつかの研究を試みた。

実験 I

【方法】

野生型 C57/BL6 female マウスを用いて、下肢虚血モデルで AM の側副血行路に対する作用を研究した。35 週齢の野生型 C57/BL6 female マウスの右大腿動脈を結紮し下肢虚血モデルを作成した。1 群には毎週ヒト AM を発現した plasmid、もう一群にはコントロールとして pcDNA を発現した plasmid を虚血筋肉に注射し、さらに electroporation を施行し、AM の遺伝子を導入した (AM 群、コントロール群各 n=8)。毎週レーザー Doppler により血流を測定し、5 週間後にはマウスをすべて屠殺し、下肢の筋肉を採取した。抗 CD31 抗体免疫染色を施行し、毛細血管数を測定した。筋肉は一部 Western blotting を施行し、AM 蛋白の発現を調べた。また、屠殺時には心臓から血液を採取し、血漿中の AM 濃度も測定した。また、マウスの系統や性別により AM に対する反応に対して差異や特異性がある可能性も否定できないと考え、更に C57/BL6 male マウス・C3H/He female マウス・C3H/He male マウスで、同様の実験を行った。更に、内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) が血管拡張をはじめとする様々な作用、血管新生に対する報告を踏まえ、AM の作用と eNOS の関連を調べるために eNOS 遺伝子欠損マウスを用いて、AM の遺伝子導入・下肢虚血手術を施行し、全く同様の実験を行った。

【結果】

野生型 C57/BL6 female マウスにおいて、血漿中のアドレノデュリン濃度は AM 注射群でコントロール群に比較して有意に上昇しており (非虚血群 $0.667 \pm 0.373 \text{ fmol/ml}$ 、コントロール群 $0.902 \pm 0.301 \text{ fmol/ml}$ 、AM 群 $4.31 \pm 0.949 \text{ fmol/ml}$ 、AM 群 vs. コントロール群 $p=0.002$ 、AM 群 vs. 非虚血マウス群 $p=0.004$)、また下肢筋肉中でも AM 蛋白の過剰発現が認められた。毎週レーザー Doppler により下肢血流を測定したところ、AM 群ではコントロール群に比較して著明に下肢血流量が増加していた (AM 群 1.424 ± 0.103 vs. コントロール群 0.656 ± 0.2114 、屠殺時、 $P=0.011$)。PcDNA を注射したコントロールマウスでは虚血側の下肢の脱落がしばしば認められたが、AM を遺伝子導入したマウスではそれは全く認められなかった。下肢虚血筋の抗 CD31 免疫染色にて確認したところ、AM 注射群はコントロール群に比べて、著明に毛細血管密度が増加していた (コントロール群 $=407.5 \pm 56.47/\text{mm}^2$ vs. AM 群 $=662.29 \pm 66.38/\text{mm}^2$ 、 $p=0.0043$)。C57/BL6 male マウス・C3H/He female マウス・C3H/He male マウスでも、ほとんど同様の結果が認められた。

これらのことから、AM の作用に再現性があり、より普遍的であることが証明された。しかし、これらの実験と全く同じ手技を、eNOS 遺伝子欠損マウスで行ったところ、下肢虚血手術後の血流の回復は AM 群でもコントロール群でもほとんど同様に認められず、毛細血管密度もほとんど回復しなかった。

実験II

【研究の背景】

次いで実験 I の結果を踏まえ、AM が血管新生を促進する際の細胞の由来を検討した。具体的には骨髄由来の血管内皮前駆細胞の関与を想定した。骨髄幹細胞とその分化・内皮前駆細胞をはじめとする前駆細胞の概念は近年最も注目されており、虚血に対する骨髄由来内皮前駆細胞の動員は生理的な応答で構成されているが、サイトカインや可溶性受容体、接着因子などにより制御されている。VEGF はマウスでは虚血に対する骨髄前駆細胞の動員に最も重要な mediator と考えられている。こういった報告から我々は AM の血管新生作用に対しても、内皮前駆細胞が関与しているのではないかと考え、骨髄由来細胞・内皮前駆細胞に対して、AM がどのように作用し、血管新生と関連するかを調べるため再度骨髄移植マウスに下肢虚血を導入し、AM の投与実験を行った。

【方法】

我々は骨髄由来の内皮前駆細胞が AM の血管新生作用と関わっている可能性を調べるために、GFP マウス(Green fluorescence protein transfected mouse、ROSA26 マウス(LacZ マウス)を使用し、骨髄移植モデルを作成した。放射線照射を施行した 15 週齢の C57BL/6J female マウスに GFP マウスおよび LacZ マウスの骨髄細胞を尾静脈から静脈内注射し、骨髄移植を施行した。骨髄移植から 8 週間後に、眼窩から採血し、骨髄置換率を測定し、骨髄移植の成功を確認した(置換率 90%以上)。さらに 1 群には毎週ヒト AM を発現した plasmid、もう一群にはコントロールとして pcDNA を発現した plasmid を遺伝子導入した(AM 群、コントロール群各 n=12)。下肢虚血モデル作成のための手術、レーザー Doppler による血流の測定を続けた。抗 CD31 抗体免疫染色を施行による毛細血管数の測定は実験 I と同様である。また、下肢筋肉の一部は蛍光顕微鏡を用いて骨髄由来細胞(GFP 陽性細胞)を観察した。LacZ 骨髄移植マウスは β galactosidase 染色を施行し、LacZ 陽性細胞を観察した。更に標本に抗 CD31 蛍光免疫染色を施行した。また、sacrifice 時には心臓から血液を採取し、末梢血と骨髄から細胞を採取し、FACS analysis を施行し、Sca-1 (stem cell antigen 1)陽性細胞・c-kit 陽性細胞を測定した。

【結果】

AM 遺伝子導入群ではコントロール群(pcDNA 導入群)に比較し、虚血下肢の有意な血流回復が認められ(AM 群 1.424 ± 0.103 vs. コントロール群 0.656 ± 0.2114 , 屠殺時、 $P=0.011$)、屠殺時の下肢虚血筋の毛細血管密度も有意な増加が認められた(コントロール群 $=395.62 \pm 65.02/\text{mm}^2$ vs. AM 群 $=657.23 \pm 39.66/\text{mm}^2$, $p=0.0022$)。また、蛍光顕微鏡にて、AM 群は有意に下肢虚血筋肉中に GFP 陽性細胞が認められ、その一部は CD31 陽性であった。コントロール群では GFP 陽性細胞は有意に少なく、非虚血筋ではほとんど認められなかった。

(非虚血筋群=0.521±0.02/mm² vs.コントロール群=16.458±3.32/mm² vs. AM群=29.609±4.53/mm²、AM群 vs. コントロール群 p=0.0406、AM群 vs. 非虚血下肢筋肉群 p=0.0006、コントロール群 vs. 非虚血下肢筋肉群 p=0.0013)。末梢血の FACS analysis では、AM群の Sca1 陽性細胞の有意な増加が認められた(AM群 6.07±0.102%、コントロール群 3.7±0.073%、p=0.046)。同様に LacZ マウスの骨髄移植モデルを使用した実験でも、AM 遺伝子導入群ではコントロール群(pcDNA 導入群)に比較し、虚血下肢の有意に大きな血流回復が認められ、屠殺時、下肢虚血筋の毛細血管密度の有意な上昇が認められた。また、β galactosidase 染色にて、AM群は有意に下肢虚血筋肉中に LacZ 陽性細胞が認められた。コントロール群では LacZ 陽性細胞は非常に少なく、非虚血筋ではほとんど認められなかった(AM群 3.222±0.667%、コントロール群 0.278±0.373%、p=0.001)。末梢血の FACS analysis では、AM群の Sca1 陽性細胞と c-kit 陽性細胞の有意な増加が認められた (AM群 7.250±2.104% vs. コントロール群 3.900±1.119%、p=0.007)。このことから AMが血管の障害(虚血)に対して、骨髄由来細胞の動員を促進し、血管新生を促す可能性が示唆された。

【考察および結語】

AMは血流を改善し、毛細血管密度を増加させることから虚血に対して側副血行路を促進するが、その作用は eNOS 遺伝子欠損マウスで全く損なわれることから、AMの効果発現のためには eNOS が重要であると思われる。我々は当初より AMは PI3K/Akt pathway を通じ eNOS、NO を介して血管新生作用を発揮すると考えていたが、その機序として更に内皮前駆細胞の動員が血管新生に効果的に作用している可能性が考えられた。血管内皮細胞の動員は様々な病的ストレス、血管の障害・虚血・炎症などに対して、組織の修復のため行われると考えられ、また、VEGFをはじめとするサイトカインや可溶性受容体、接着因子などが内皮前駆細胞の動員を増強し、血管新生を促すという報告もなされている。近年、血管新生時の内皮前駆細胞の動員に NO が重要な役割を果たしていることが明らかにされた。骨髄移植モデルを用いた実験では AM を遺伝子導入したマウスでは末梢血・骨髄とも Sca1 陽性細胞・c-kit 陽性細胞の数が増加しており、さらに増加した新生血管には有意に骨髄由来細胞が増加しており、また、一部の細胞は CD31 陽性であった。以上から AMは PI3K/Akt pathway を活性化し eNOS、NO を介し内皮前駆細胞の動員を促し、急性の虚血組織に対して血管新生に効果的に作用していると考えられる。