

審査の結果の要旨

氏名 阿部美南

本研究は血管拡張性ペプチドとして発見されたアドレノメデュリン (adrenomedullin ; AM)の可能性を明らかにするため、その血管新生作用を中心にマウスの下肢虚血モデルを用いて実験を試みて下記の結果を得ている。

1. 野生型 C57/BL6 female の下肢虚血モデルに AM を遺伝子導入したところ、コントロール群と比較して著明な側副血行路の改善が認められた (AM 群、コントロール群各 n=8)。さらにコントロール群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。また、それに伴い、下肢虚血筋肉の抗 CD31 抗体免疫染色により AM 群の毛細血管密度の上昇も認められた。屠殺時には心臓から血液を採取し、血漿中の AM 濃度も測定したところ、AM 投与群の血漿中の AM 濃度の優位な上昇が認められ遺伝子導入の有効性が確認できた。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が、同様の結果を得た。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。

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。これより 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。

2. 実験 1 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、骨髄由来の血管内皮前駆細胞の関与を考え、骨髄移植マウス(GFP マウス (Green fluorescence protein transfected mouse)、ROSA26 マウス(LacZ マウス))を使い同様の実験を試みた。放射線照射を施行した 15 週齢の C57BL/6J female マウスに GFP マウスまたは LacZ マウスの骨髄細胞を尾静脈に注射し、骨髄移植を施行し、下肢虚血手術を施行した。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)ところ、AM 群の血流の著明な改善と毛細血管密度の上昇が認められた。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)を観察したところ 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。同様に 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ところ 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。また、屠殺時には末梢血から細胞を採取し、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ところ、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。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。実験 1,2 より、AM は 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。

以上、本論文は下肢虚血モデルマウス・eNOS 欠損マウス・骨髄移植マウスを使用して、急性の虚血組織に対する AM の血流改善効果を証明し、さらにその機序について解明を試みている。本研究は AM の作用を明らかにし、その臨床応用の可能性も考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。