

論文の内容の要旨

論文題目 Gene Expression Pattern in Aortic Aneurysms

和訳 大動脈瘤における遺伝子発現様式の検討

指導教官 高本眞一教授

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

外科学専攻

氏名 竹谷 剛

要旨

研究の背景・目的：

本邦において胸部大動脈瘤は年々増加傾向にある。大動脈瘤における遺伝子発現の研究は、これまで動物モデルによる検討や、主に閉塞性動脈疾患を持つ人の大動脈、血管病変を持たない人の遺体より採取した大動脈を対象として行われ、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) をはじめとしたいくつかの遺伝子の発現が増強していることが報告されている。しかしこれらの研究は個体差や患者背景の違い、検体採取における条件の違いを見ている可能性があった。また、報告されている大動脈瘤の動物モデルでは、動脈瘤の成因がヒトのそれと異なっていると考えられ、ヒトにおける動脈硬化性大動脈瘤の発生と進展に関わる詳細なメカニズムは未だ明らかにされていない。

また、MMPは血管のリモデリングに関与することが知られており、動脈硬化や動脈瘤形成への直接的な関与が報告されている。しかし血管壁において MMP 発現増強に至るプロセスは明らかとなっていない。

研究 (A) 本研究は約 13,000 遺伝子を搭載したマイクロアレイを用い、手術時に採取した同一個人の大動脈瘤壁と正常径大動脈の遺伝子発現の相違を調べることで大動脈瘤の発生と進展に関わる遺伝子を同定することを目的とした。研究 (B) 培養大動脈平滑筋細胞を用い、心筋梗塞や脳梗塞など血管病の強力な危険因子とされる CRP と MMP の関連について検討した。

方法：

研究（A）遠位弓部大動脈瘤手術時に瘤の頂部（TAA）および人工血管に置換される範囲内の正常径部（NTA）よりそれぞれ標本を採取した。（N=25、50 検体）

検体よりRNAを抽出したが、動脈硬化が極度に強かったTAAの5検体ではRNAの収量が不十分で、以下のアッセイから除外した。残りの検体のうち無作為に選んだ5対の検体についてマイクロアレイアッセイを行った。さらにマイクロアレイでTAAに発現増強が見られ、大動脈瘤への関与が疑われた遺伝子について、残り15対の検体でreal-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (real-time RTPCR)を行いその発現変化を証明した。

研究（B）ヒト大動脈培養平滑筋細胞（HASMC）にCRPを作用させ、MMP群遺伝子の発現変化を観察した。また種々のプロテインキナーゼ阻害薬、転写因子阻害薬の存在下に同様の実験を行った。以上よりHASMCにおけるMMP発現誘導へのNF- κ B経路の関与が疑われたためこれを確認するためEMSAを行った。

結果：

研究（A）胸部大動脈瘤においていくつかのsubtypeのMMPの発現が増強していることが示された。さらに、これまで動脈瘤との関連が指摘されていなかったその他の細胞外マトリックス分解酵素や、炎症、アポトーシス、ストレス応答、細胞内情報伝達関連遺伝子などで大きく発現が増強しているものがあった。（Table 1）また、RT-PCRによりMMP-2、-9、ADAMTS-1、caspase 4がTAAで有意に発現増強していることが示された。

研究（B）CRPはHASMCに対し、生理的範囲の濃度で用量依存性に、（Figure 1）また観察時間内で時間依存性にMMP-1、-2、-3の発現を増強させた。（Figure 2）この反応はIkappaB kinase inhibitorであるParthenolideにより抑制された。（Figure 3）さらにCRPを作用させたHASMCより得られた核抽出物を用いてEMSAを行ったところ、NF- κ Bコンセンサス配列を含むプローブのシフトが確認された。この配列はMMP-3プロモータ領域に認められるものであることから、CRP \rightarrow NF- κ B \rightarrow MMP経路の存在が示された。

考察：

これまで大動脈瘤への関与が報告されてきたMMP群のみならず、今回の実験により細胞外基質分解酵素であるADAMTS-1、caspase 4やTNF family 遺伝子等のアポトーシス関連遺伝子、pleckstrin等の細胞内情報伝達関連遺伝子、heme oxygenase等のストレス関連遺伝子その他、これまで大動脈瘤への関与が知られていなかった多くの遺伝子の発現がTAAで増強していることが示され、大動脈瘤の発生と進展への関与が疑われた。これらの遺伝子の、動物モデル等による更なる機能解析が大動脈瘤発生の機序解明につながると考えられる。

また、心血管系の重要な危険因子と考えられているCRPは、ヒト大動脈平滑筋細胞を活性化し、NF- κ B経路でMMP発現を増強させた。この事実と、未だ同定されていないCRPレセプターの同定が動脈硬化や動脈瘤形成を抑止するための新たな方法の開発につながることが期待される。

. Table 1. The 30 most profoundly up-regulated genes in TAA/NTA comparisons

	UniGene code	Gene name	Top/Neck mean log ratio (–fold)
1	Hs.77436	pleckstrin	0.83±0.83 (6.84)
2	Hs.237856	peptide transporter 3	0.83±0.97 (6.74)
3	Hs.1584	cartilage oligomeric matrix protein	0.79±0.82 (6.20)
4	Hs.114599	collagen, type VIII, alpha 1	0.79±1.02 (6.14)
5	Hs.2359	dual specificity phosphatase 4	0.75±0.67 (5.61)
6	Hs.727	inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)	0.74±0.75 (5.47)
7	Hs.79381	grancalcin	0.70±0.65 (5.01)
8	Hs.1395	early growth response 2 (Krox-20 (Drosophila) homolog)	0.68±0.82 (4.75)
9	Hs.56937	suppression of tumorigenicity 14	0.64±0.42 (4.39)
10	Hs.77573	uridine phosphorylase	0.63±0.83 (4.30)
11	Hs.151777	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1	0.62±0.50 (4.20)
12	Hs.73919	clathrin, light polypeptide (Lcb)	0.62±0.72 (4.19)
13	Hs.25732	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3	0.61±0.70 (4.05)
14	Hs.308026	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	0.60±0.21 (4.01)
15		KIAA0822 protein	0.60±0.58 (3.95)
16	Hs.262150	CD22 antigen	0.59±0.37 (3.93)
17	Hs.119129	collagen, type IV, alpha 1	0.58±0.05 (3.84)
18	Hs.343475	cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)	0.58±0.52 (3.81)
19	Hs.519	WW domain-containing oxidoreductase	0.58±0.48 (3.80)
20	Hs.202833	heme oxygenase (decycling) 1	0.54±0.02 (3.46)
21	Hs.78344	myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle	0.51±0.12 (3.22)
22	Hs.76686	glutathione peroxidase 1	0.51±0.17 (3.20)
23	Hs.198253	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	0.49±0.09 (3.11)
24	Hs.75589	acid phosphatase 2, lysosomal	0.49±0.14 (3.11)
25	Hs.6551	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal, subunit 1	0.49±0.24 (3.10)
26	Hs.5542	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 7	0.49±0.35 (3.10)
27	Hs.75416	DAZ associated protein 2	0.48±0.60 (3.05)
28	Hs.8724	serine threonine protein kinase	0.47±0.05 (2.97)
29	Hs.9914	follistatin	0.47±0.26 (2.95)
30	Hs.134643	Thy-1 cell surface antigen	0.46±0.20 (2.92)

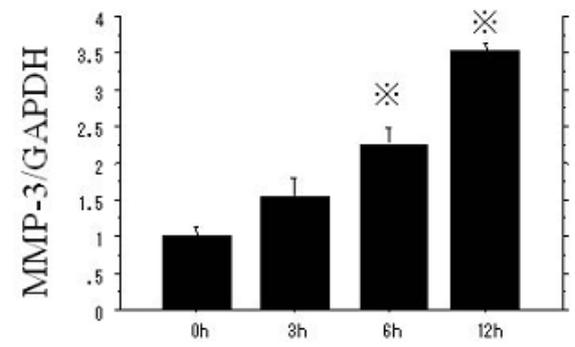
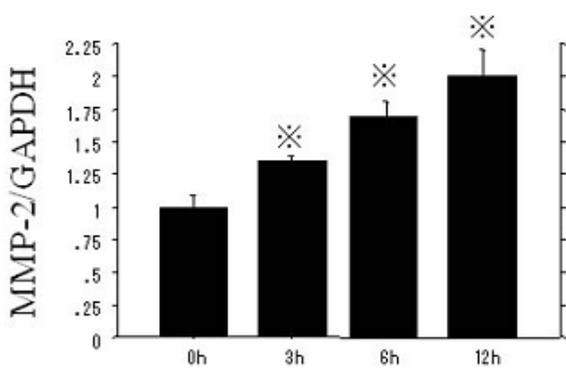
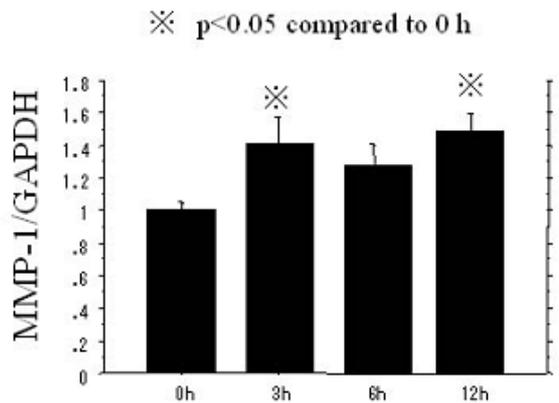


Figure 1
CRP 20 ug/mL負荷後MMP発現の経時的変化

※: P < 0.05

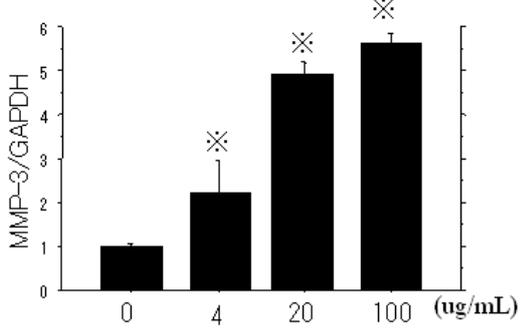


Figure 2
CRP濃度によるMMP-3発現の変化
CRPは濃度依存的に大動脈平滑筋細胞にMMP-3を誘導した。

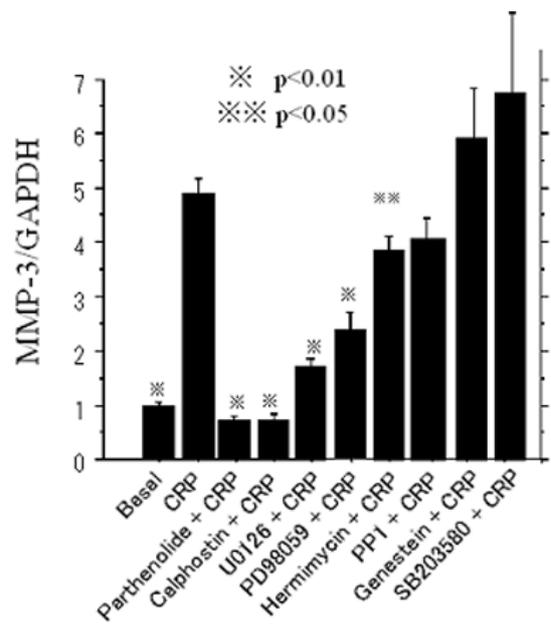


Figure 3
HASMCにおけるCRPによるMMP-3の誘導は
partenolide (NF- κ B inhibitor)
calphostin C (PKC inhibitor)
U0126 (MEK inhibitor)
PD98059 (MEK inhibitor)
herbimycin A (tyrosine kinase inhibitor)
により抑制された。