

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 飯室 聡

血管作動性のタンパクであるアドレノメデュリン(AM)は、循環の恒常性の調節や心血管病の病態生理に深く関わっているが、本研究では本物質の血管新生作用に着目し、その作用を発生および虚血・腫瘍という2つの病態において検討し、下記の結果を得ている。

1. $AM^{-/-}$ の個体は胎生14日で致死であり、その所見として、卵黄動脈の発達不全・胎児のびまん性出血・胎児浮腫を認めた。基底膜の構成要素であるコラーゲンIV型の発現は、 $AM^{-/-}$ の個体で大きく低下していることが認められた。この結果から胎児の血管発生にAMが深く関与していることが示唆された。
2. マウスの左鼠径動脈を結紮して血流を遮断し、側副血行路の発達による血流の回復をレーザードップラーで計測した。AMを外因性に投与するとpositive controlであるVEGF投与群と同程度の血流の回復および新生血管の増加を認めた。
3. AMノックアウトマウスを用いた下肢虚血モデルでも血管新生能を検討した。Heteroマウスでは野生型と比較して血流の回復が約30%低下、新生血管の形成も有意に低下していた。さらに野生型のマウスに対してAMの拮抗薬であるAM22-52を投与することで、血流回復および新生血管形成の低下を認めた。以上、2. および3. より、AMの血管新生能を確認しえた。

4. マウス下肢虚血モデルのタンパクのサンプルを用いて VEGF の発現を経時的に評価した。AM 投与マウスでは、虚血作成後 24 時間から VEGF の発現が亢進し、その後も高いレベルで発現亢進を維持していた。HUVECs を用いた *vitro* の系では、AM が用量依存的および時間依存的に VEGF の発現を亢進することが確認された。さらにリン酸化 Akt の発現を見ることで PI3K-Akt pathway の活性を評価した。AM 単独では Akt のリン酸化は活性化されないが、VEGF 存在下では Akt のリン酸化が強くなることが確認された。したがって、AM は Akt pathway を増強し、さらに VEGF の発現そのものにも関与している可能性が示唆された。
5. マウス肉腫 Sarcoma180 を用いて AM の腫瘍血管新生に対する影響を検討した。腫瘍重量は、VEGF 投与群・AM 投与群にて増加し、血管新生抑制剤であるスラミン投与群や AM22-52 投与群では減少していた。新生血管は、VEGF 投与群・AM 投与群にて増加し、スラミン投与群・AM22-52 投与群では減少していた。以上より、AM は腫瘍を増殖させ、それは AM による血管新生亢進によるものと考えられた
6. *In Vitro* の系において AM の血管透過性に対する影響を評価した。AM は血管透過性を約 40%低下させた。さらに、AM と VEGF を同時に投与すると、VEGF によって亢進した血管透過性を AM が抑制するということが確認できた。さらに四肢の edema および脳浮腫に対して、AM が浮腫を抑制することを *in vivo* の系にて評価した。

以上、本論文は AM が血管新生能を持つことを明らかにした。その機序は

VEGF そのものの発現および PI3K-Akt pathway の増強による効果とともに、血管透過性を減少させ血管の stability を増強することで発揮されることが考えられる。本研究は血管再生療法の治療戦略の解明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。