

## 論文内容の要旨

東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻

平成 16 年 4 月 博士課程入学

氏名 梶田 昌裕

指導教官 尾崎 博

論文題目 門脈圧亢進症における血管外膜常在型マクロファージの病態生理機構

### 緒言

門脈圧亢進症は、その多くが肝硬変に続発する根治しがたい重篤な疾患である。本病態は、門脈圧の上昇に伴い重篤な続発症を引き起こすもので、内臓動脈の拡張による門脈域への流入血液量の増加が病態形成に重要な役割を果たしている。この内臓動脈の拡張には、血管弛緩物質である一酸化窒素 (NO) の関与が示唆されているが、その産生部位など詳細なメカニズムについては明らかになっていない。

NO 合成酵素 (NOS) は大きく構成型 (cNOS) と誘導型 (iNOS) に分類される。iNOS はリポ多糖 (LPS) やサイトカインの刺激により、マクロファージ (M $\phi$ ) などに発現して大量の NO を生成する。この NO は、細胞障害や著しい血管弛緩反応を引き起こすため、病態生理学的観点から注目されている。これまで、血管病変における iNOS 誘導は、主に血管平滑筋細胞に起こると考えられてきた。しかし、近年、平滑筋層よりも血管外膜から、より多くの NO が産生されることが示され、その病態生理的役割が注目されている。

血管外膜は膠原線維や弾性線維に富み、線維芽細胞、栄養血管や常在型 M $\phi$  などを含んでいる。M $\phi$  は正常組織に定住する常在型 M $\phi$  と、炎症刺激によって動員される単球由来の滲出性 M $\phi$  とに大別される。また、M $\phi$  は、食作用や抗原提示能を持つ免疫細胞であると同時に、活性化にともない、炎症に関与する様々なサイトカイン類や化学物質を産生するため、各種の病態形成において重要な役割を果たすと考えられている。しかし、血管外膜に存在する常在型 M $\phi$  の血管

病態形成における役割については不明な点が多い。

本研究ではこれらを背景として、門脈圧亢進症で観察される内臓動脈の拡張に血管外膜の常在型 M $\phi$  が関与していると仮説を立て、血管外膜常在型 M $\phi$  の iNOS 発現に注目して研究をすすめた (第 1、2 章)。

HMG-CoA 還元酵素阻害薬(スタチン)は、コレステロール合成を抑える作用を持ち、高脂血症治療薬として広く使用されている。一方で、スタチンはコレステロール低下作用を介さずにさまざまな効果を発揮することが知られており、門脈圧亢進症モデル動物において、スタチンが肝臓での NO 産生を増加させ、血流抵抗を低下させることが報告されている。しかし、一方で血管壁における NO 産生に対するスタチンの作用はこれまでに検討されていない。そこで、血管壁の iNOS 発現に対するスタチンの作用を検討した (第 3 章)。

## 結果および考察

### 1. 血管外膜常在型 M $\phi$ の活性化と血管平滑筋機能

本項目では、血管壁常在型 M $\phi$  の浸潤や血液由来の生理活性物質の影響を排除し、血管外膜常在型 M $\phi$  の活性化による血管平滑筋収縮機能への影響を解析するために、器官培養法を用いて検討を行った。具体的手法としては、健常ラットより摘出し内皮を剥離した胸部大動脈、腸間膜動脈、肝外門脈を器官培養し、LPS を処置して外膜の常在型 M $\phi$  の変化を観察した。

常在型 M $\phi$  特異的表面抗原である ED2 の抗体をもちいた whole-mount 組織蛍光免疫染色でその細胞形態を観察したところ、生理的状態の腸間膜動脈では、常在型 M $\phi$  は多数の突起をのびしたラミファイド型であったが、LPS (1-10  $\mu$ g/ml) で 24 時間刺激した標本では、その多くがラウンド化しアメーバ型(一般に M $\phi$  の活性化を示唆する)に変化していた。一方、門脈外膜の常在型 M $\phi$  は生理的状態においてアメーバ型の形態であった。また、半定量的 RT-PCR 法で両血管の iNOS の mRNA 発現を定量したところ、LPS (1-10  $\mu$ g/ml) の刺激により血管壁での iNOS の mRNA 発現が増加していた。さらに、両血管を LPS (1-10  $\mu$ g/ml) で 6 時間処置した標本を ED2、および iNOS に対する抗体を用いて whole-mount 組織蛍光免疫染色で観察したところ、常在型 M $\phi$  が iNOS を発現していた。この時、培養上清中の NO 量を定量したところ、両血管において、LPS 刺激により NO 量の上昇が確認された。

iNOS は、その発現が亢進されると多量の NO を持続的に産生し、平滑筋を弛緩させることが知られている。そこで、血管外膜常在型 M $\phi$  の活性化が血管平滑筋収縮機能へおよぼす影響を検討した。LPS (1-10  $\mu$ g/ml) で 6 時間刺激した内皮剥離腸間膜動脈では、norepinephrine (NE; 10 nM-10  $\mu$ M) による発生収縮張力が減弱していた。この収縮張力の減弱は、NOS 阻害薬である L-NAME (300  $\mu$ M) の処置により回復したことから、NO 依存的なものであることが明らかとなった。一方、肝外門脈においては、LPS (1-10  $\mu$ g/ml) で 6 時間刺激しても発生収縮張力の減弱は認められなかった。

以上の結果から、器官培養法を用いたLPS処置によって外膜常在型M $\phi$ の活性化が起き、iNOSの発現が誘導されることが確認された。さらに、腸間膜動脈は発現上昇したiNOSが産生するNOによって弛緩するが、肝外門脈は外膜でのiNOSの発現が上昇しても弛緩しにくいという興味深い知見が得られた。

次に、上記の結果をふまえ、腸間膜動脈と肝外門脈の血管平滑筋組織のNOに対する感受性を比較した。高K<sup>+</sup>(65 mM)栄養液による脱分極刺激とnorepinephrine (NE; 1  $\mu$ M)によって両血管を収縮させたのち、NOドナーであるsodium nitroprusside (SNP)を100 pMから10  $\mu$ Mまで累積投与した。結果、肝外門脈は腸間膜動脈に比べ弛緩しにくく、NOに対する感受性が低いことが明らかとなった。また、NOは平滑筋細胞内で可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)を活性化し、活性化sGCはcGMPを産生する。cGMPはproteinkinase G(PKG)を活性化し、活性化PKGが細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を低下させて平滑筋細胞が弛緩する。そこで、両血管を高K<sup>+</sup>(65 mM)栄養液によって収縮させたのち、膜透過性cGMPである8-Br-cGMPを1 nMから10  $\mu$ Mまで累積投与した。結果、腸間膜動脈に比べ肝外門脈は弛緩しにくく、cGMPに対する感受性が低いことが明らかとなった。さらに、Ca<sup>2+</sup>蛍光指示薬fura-2 AMを用いて両血管の平滑筋組織細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度に対するSNPの効果を比較した。結果、腸間膜動脈においては、高K<sup>+</sup>(65 mM)栄養液とphenylephrine (10  $\mu$ M)による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を、それぞれ、SNPは濃度依存的に抑制した。しかし、肝外門脈においては、SNPは両刺激による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇をわずかしか抑制しなかった。

これらの結果から、腸間膜動脈と肝外門脈はPKG以降の経路において差があり、肝外門脈はNOによって弛緩しにくいことが明らかとなった。

## 2. 門脈圧亢進症モデル動物

本項目では、門脈圧亢進症モデル動物として胆管結紮(BDL)ラットを用い、内臓血管における血管外膜常在型M $\phi$ の活性化について検討した。

半定量的RT-PCR法により各種炎症性メディエーターの発現量を解析したところ、BDL群の腸間膜動脈および肝外門脈で、iNOSのmRNAとタンパク質の発現が、疑似手術群に比べ優位に上昇していた。

さらに、滲出型M $\phi$ 特異的評面抗原であるED1とED2、およびiNOSに対する抗体を用いて、whole-mount組織蛍光免疫染色を行った。結果、BDL群の腸間膜動脈では常在型M $\phi$ がラウンド化し、その数が有意に増加しており、また、滲出型M $\phi$ も数多く出現していた。一方、BDL群の腸間膜動脈の外膜でもラウンド化した常在型M $\phi$ が認められその数が有意に増加しており、滲出型M $\phi$ も多数出現していた。さらに、BDL群の両血管において血管壁のM $\phi$ がiNOSを多く発現していた。

以上の結果から、門脈圧亢進症モデルラットでは、腸間膜動脈と肝外門脈の血管壁で滲出型M $\phi$ と常在型M $\phi$ が増加・活性化し、これらの細胞がiNOSを発現する主要な細胞であることが明らかになった。

### 3. スタチンの血管壁 iNOS 発現への作用

本項目では、器官培養法を用いて、LPS 刺激による血管壁の iNOS 発現に対するスタチンの作用を検討した。

LPS (300 ng/ml) を 6 時間処置した腸間膜動脈では、iNOS の発現上昇が観察された。この時、fluvastatin (1  $\mu$ M) を 20 時間前処置しておくこと、iNOS mRNA と iNOS タンパク質の発現はさらに上昇し、この作用は mevalonolactone (300  $\mu$ M) を同時に処置することで抑制された。また、培養上清中の NO 量を定量したところ、LPS を単独処置した標本に比べ、fluvastatin を全処置した標本ではその産生量が増加していた。

以上の結果から、fluvastatin は HMG-CoA 還元酵素を阻害し、メバロン酸の産生を抑制することで腸間膜動脈血管壁における LPS による iNOS 誘導をさらに促進することが明らかとなった。

#### 総括

以上の結果をまとめると、門脈圧亢進症モデルラットにおいて、肝門脈と腸間膜動脈の両血管で外膜常在型 M $\phi$  が活性化し、iNOS を発現して NO を産生することが明らかとなった。また、産生された NO によって腸間膜動脈は拡張し循環亢進状態となり、門脈域への流入血液量が増加して病態を増悪させる可能性が示唆された。一方、器官培養を用いた検討から、肝門脈平滑筋は NO に対する感受性が低いため血管拡張を起こしにくく、これが門脈圧亢進状態を引き起こすもう一つの要因となる可能性が示唆された。さらに、スタチンは、器官培養モデルにおいて血管壁の iNOS 発現を促進することが明らかとなり、内臓動脈拡張を悪化させる可能性が示唆された。