

審査の結果の要旨

氏名 東邦 康智

本研究は ABC トランスポーターの一つである BCRP1/ABCG2 の心臓における発現意義を明らかにするため、マウス心筋梗塞モデルを用いて心筋梗塞後の組織修復における BCRP1/ABCG2 の役割の解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. RT-PCR の結果、心臓における BCRP1/ABCG2 の発現を確認した。免疫組織染色にて、BCRP1/ABCG2 は主に微小血管内皮細胞に発現していることが示された。
2. 野生型マウス(WT マウス)及び *Bcrp1/Abcg2* ノックアウトマウス(KO マウス)の冠動脈(前下行枝)を結紮することにより、心筋梗塞を作成し、生存率、組織学的所見、心臓超音波検査所見、カテーテル検査所見を比較した。生存率は、WT マウスと比較して KO マウスで有意に低く、また心筋梗塞後一週間以内の心破裂のイベントが有意に多かった。心筋梗塞作成前における組織学的所見、心臓超音波検査所見、カテーテル検査所見では、両者に差は認めなかったが、心筋梗塞後 28 日目において、組織学的所見及び心臓超音波検査における心筋梗塞後の左室リモデリングは WT マウスと比較して KO マウスで有意に高度であり、心臓超音波検査所見及びカテーテル検査所見上の心機能も有意に低下していた。以上より、BCRP1/ABCG2 は心筋梗塞後の生存及び左室リモデリングにおいて重要な役割を果たしていることが示された。
3. KO マウスにおいて心破裂を最も高頻度に認めた心筋梗塞後 5 日目の心臓組織においてその組織修復過程を評価するため、免疫組織染色にて心筋梗塞境界領域における血管密度、マクロファージ密度、筋線維芽細胞密度を比較したところ、WT マウスと比較して KO マウスにおいて有意に各密度は低下していた。また、心筋梗塞後 28 日目における心筋梗塞境界領域での血管密度も比較したところ、WT マウスと比較して KO マウスにおいて有意に低下していた。以上の所見は、KO マウスにおいて心筋梗塞後の組織修復が障害されていることを示唆する所見であり、BCRP1/ABCG2 が心筋梗塞後組織修復において重要な役割を果たしていることが示された。
4. 心筋梗塞作成前、心筋梗塞後 5 日目及び心筋梗塞後 28 日目において、各種サイトカインの発現を real time PCR にて比較したところ、心筋梗塞作成前においては WT マウス及び KO マウス間に差を認めなかったが、心筋梗塞後 5 日目における血管新生関連サイトカイン、炎症性サイトカイン及び線維化関連サイトカインの発現は WT マウスと比較して KO マウスにおいて不変もしくは有意に増加していた。心筋梗塞後 28 日目においては、VEGFA 及び Angiopoietin-1 の発現が、WT マウスと比較して KO マウスにおいてそれぞれ有意に低下及び増加していたが、それ以外のサイトカインの発現に関しては有

意差を認めなかった。以上の結果は、KO マウスにおける心筋梗塞後組織修復の障害が、サイトカインの発現が障害されることによって引き起こされるのではなく、BCRP1/ABCG2を発現している細胞、すなわち微小血管内皮細胞の障害によるものである可能性を示唆する結果であった。

5. RT-PCRの結果、ヒト微小血管内皮細胞にBCRP1/ABCG2が発現していることが確認された。
6. ヒト微小血管内皮細胞において、BCRP1/ABCG2の特異的な阻害薬であるfumitremorgin Cを使用してBCRP1/ABCG2の機能を阻害し、過酸化水素による酸化ストレス下及び低酸素状態での細胞の生存率をMTS assayにより測定した。負荷が無い状態では、BCRP1/ABCG2の阻害の影響はなかったが、酸化ストレス下ではBCRP1/ABCG2阻害により、細胞の生存率が有意に低下していた。低酸素状態ではBCRP1/ABCG2阻害による影響は認めなかった。以上より、BCRP1/ABCG2はヒト微小血管内皮細胞の酸化ストレス下における生存に重要な役割を果たしていることが示された。
7. ヒト微小血管内皮細胞において、BCRP1/ABCG2阻害の有無による、TNF- α 負荷後のICAM-1, VCAM-1, eNOSの発現を比較したが、有意差は認めなかった。
8. 過去の文献において、BCRP1/ABCG2の輸送する基質として、ヘムの前駆体であるprotoporphyrin IXが報告されており、BCRP1/ABCG2の阻害によりprotoporphyrin IX及びヘムの蓄積が生じ、Fenton反応により酸化ストレスを増悪させる原因となりうることが示唆されている。ヒト微小血管内皮細胞における、BCRP1/ABCG2のprotoporphyrin IXの動態に与える影響を評価するため、BCRP1/ABCG2阻害下の細胞内protoporphyrin IX濃度をFACS解析にて評価したところ、ヒト微小血管内皮細胞においても、BCRP1/ABCG2阻害によりprotoporphyrin IXが細胞内に蓄積することが明らかとなった。以上より、BCRP1/ABCG2はprotoporphyrin IXを排出することにより、酸化ストレス下での微小血管内皮細胞の生存に重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上、本論文は、ABCトランスポーターであるBCRP1/ABCG2が微小血管内皮細胞を酸化ストレスから保護することにより、心筋梗塞後の組織修復において非常に重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究はこれまで心臓における発現意義が不明であったABCトランスポーターであるBCRP1/ABCG2の役割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。