

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
有城 久美子	主査 教授 花 房 俊 昭 副査 教授 宮 崎 瑞 夫 副査 教授 北 浦 泰 副査 教授 勝 間 田 敬 弘 副査 教授 芝 山 雄 老
主論文題名 Angiotensin receptor-1 blocker inhibits atherosclerotic changes and endothelial disruption of the aortic valve in hypercholesterolemic rabbits (アンジオテンシン1型受容体拮抗薬は高コレステロール負荷ウサギの大動脈弁における硬化性変化及び内皮障害を抑制する)	
学位論文内容の要旨	
<p>&lt;目的&gt; 大動脈弁狭窄症は、社会の高齢化に伴い近年増加傾向にあり、弁置換術の適応となる疾患の中で最多となっていることから、その予防法の確立は急務である。最近、大動脈弁狭窄症の発症機序は、動脈硬化の進展機序と多くの類似点をもつことが報告されている。一方ヒトの大動脈弁病変部において、アンジオテンシン変換酵素(ACE)の高発現が示され、レニンアンジオテンシン系阻害薬が大動脈弁狭窄症を抑制する可能性が考えられるが、未だ報告はない。本研究は、高コレステロール負荷のウサギ大動脈弁硬化モデルを用いて、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬(ARB)による大動脈弁の硬化性病変の抑制効果について検討した。</p> <p>&lt;方法&gt; 36匹の日本白色家兎を3群に分け、正常食を8週間与える control 群(C 群; n=12)、1%コレステロールを8週間与え、後半の4週間でCMセルロースを経口投与する vehicle 群(V 群; n=12)、および、1%コレステロールを8週間与え、後半の4週間で ARB である olmesartan(1mg/kg/day)を経口投与する ARB 群(A 群; n=12)とした。</p> <p>8週間後、大動脈弁を取り出し、凍結切片の作成およびRNAの抽出を行った。また、耳介の中心動脈における血圧と血清コレステロール値を試験開始時と8週間後に測定した。摘出した大動脈弁組織は、HE染色、oil red O染色による組織学的検討を行い、免疫組織学的検討は、マクロファージを認識するRAM11、平滑筋細胞のマーカーである<math>\alpha</math>-SM actin、骨芽細胞のマーカーとなる osteopontin、ACE、内皮細胞を認識するCD31、およびeNOSに対するモノクローナル抗体を用いた。CD31およびeNOSによる内皮の連続性の評価は、MCID ソフトを用いて測定し、陽性部分の弁全体に対する距離の比率(%)を算出した。その他の定量には NIH image を用いて、陽性部分の弁全体に対する面積比率(%)を求めた。</p> <p>また、抽出した RNA を用いて、リアルタイム PCR 法を行い、骨芽細胞特異的転写因子である core binding factor <math>\alpha</math>-1(cbfa-1)の発現を検討した。Cbfa-1 cDNA 量は、GAPDH cDNA に対する相対量で表した。統計解析は、parametric データに対しては unpaired t-test を、nonparametric データに対しては Mann-Whitney test を用いて行った。</p> <p>&lt;結果&gt; 8週間後の血清コレステロール値は、C 群の <math>32.3 \pm 9.4</math>mg/dl に比べ、V 群: <math>1510 \pm 265</math>mg/dl、A 群: <math>2027 \pm 239</math>mg/dl と著明に増加したが、A および V 群の2群間では、有意差を認めなかった。また、8週間後の血圧(C: <math>100 \pm 7.0</math>/ <math>72.7 \pm 4.6</math>, V: <math>100 \pm 9.7</math>/ <math>75.7 \pm 6.0</math> and A: <math>94.7 \pm 11.3</math>/</p>	

72.3±5.8mmHg)には、3 群間で有意差を認めなかった。大動脈弁への脂肪の沈着およびマクロファージの集積は、コレステロール負荷により特に弁の大動脈側で増加し、olmesartan 投与で抑制された(p<0.01)。osteopontin は、C 群では殆ど認められず、V 群で発現が増加し、olmesartan 群で有意な減少が認められた(p<0.05)。ACE の発現は、コレステロール負荷で増加し、olmesartan 群では殆ど認められなかった(p<0.01 vs V 群)。次に、CD31 染色を用いた大動脈弁内皮の連続性に関する検討では、大動脈側において、コレステロール負荷により連続性が失われ、olmesartan 投与で改善が認められた(C 群: 66±6.2%, V: 30±3.7% and A: 62±4.8%, p<0.01)。一方、心室側では、コレステロール負荷にても内皮の連続性は保たれていた。更に、eNOS による大動脈弁内皮の検討でも、コレステロール負荷により破綻した内皮の連続性は、olmesartan 投与で改善が認められた(p<0.01)。また、弁の fibroblast から myofibroblast への形質転換が弁石灰化に関与する重要な変化と考えられているため、 $\alpha$ -SM actin 染色を用いて myofibroblast の発現を検討した。その結果、 $\alpha$ -SM actin の発現は V 群で増強しており、A 群で有意に抑制されていた(p<0.01)。最後に、cbfa-1 の mRNA の発現をリアルタイム PCR で検討したところ、コレステロール負荷により増強し、olmesartan にて抑制が認められた(p<0.05)。

<考察> 本研究は、ARB である olmesartan が、高コレステロール食負荷ウサギにおいて、脂質・マクロファージの集積を抑制すること、および骨芽細胞のマーカーである osteopontin の発現を抑制すること等から、大動脈弁の硬化性病変を抑制することを示した。その機序としては、ARB による大動脈弁での内皮連続性の維持や ACE 発現の抑制が関与していると考えられる。また、大動脈弁硬化の進展には、弁の fibroblast から myofibroblast、更には osteoblast への形質転換が重要な役割を担うとされているが、申請者は  $\alpha$ -SM actin や osteopontin の免疫染色、及び cbfa-1 のリアルタイム PCR の結果から、ARB がこれらの形質転換を抑制する事を示した。動物モデルにおいて、ACE 阻害薬もしくは ARB が大動脈弁病変を抑制することを証明したのは本研究が初めてであり、今後、臨床においても、これらの薬剤による大動脈弁狭窄症の発症予防効果が期待される。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	有城 久美子
論文審査担当者		主 査 教授 花 房 俊 昭 副 査 教授 宮 崎 瑞 夫 副 査 教授 北 浦 泰 副 査 教授 勝 間 田 敬 弘 副 査 教授 芝 山 雄 老	
主論文題名 Angiotensin receptor-1 blocker inhibits atherosclerotic changes and endothelial disruption of the aortic valve in hypercholesterolemic rabbits (アンジオテンシン1型受容体拮抗薬は高コレステロール負荷ウサギの大動脈弁における硬化性変化及び内皮障害を抑制する)			
論文審査結果の要旨			
<p>大動脈弁狭窄症は、近年、弁置換術の最多適応疾患となっており、その発症機序は、動脈硬化の進展機序と多くの類似点をもつことが報告されている。本研究は、様々な抗動脈硬化作用をもつアンジオテンシン II 受容体拮抗薬(ARB)である olmesartan を用いて、大動脈弁における硬化性病変の抑制効果を検討したものである。</p> <p>申請者は、高コレステロール負荷によるウサギ大動脈弁硬化モデルを作製し、これを用いて以下の結果を得ている。</p> <p>(1) ARB は、大動脈弁への脂質・マクロファージの集積を抑制し、骨芽細胞のマーカーとなる osteopontin の発現を抑制した。</p> <p>(2) コレステロール負荷により、大動脈弁の内皮の連続性の破綻、ACE の発現の増加、および myofibroblast の発現の増加を認めたが、ARB 投与により、それら全てが抑制された。</p> <p>(3) ARB は、コレステロール負荷により増強する骨芽細胞特異的転写因子である cbfa-1 mRNA の発現を抑制した。</p> <p>これらの成績は、大動脈弁硬化性病変において、ARB が内皮の連続性の維持、脂質・マクロファージの集積の抑制、fibroblast から myofibroblast への形質転換の抑制に寄与することにより、弁の石灰化を抑制する可能性を、動物実験において初めて示したものであり、臨床的意義は大きいと考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第9条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Journal of the American College of Cardiology 49: 000-000, 2007 (in press)</p>			