

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
古林 圭一	主査 教授 勝間田 敬弘 主査 教授 宮崎 瑞夫 副査 教授 北浦 泰 副査 教授 富士原 彰 副査 教授 南 敏明
主論文題名 The significance of chymase in the progression of abdominal aortic aneurysms in dogs (イヌ腹部大動脈瘤の進展におけるキマーゼの役割)	
学位論文内容の要旨	
<p>【目的】 腹部大動脈瘤(AAA)は、血管壁局所の炎症性反応による広範囲な中膜弾性線維の破壊として一般的に特徴付けられる。弾性線維の破壊は、AAAの主な発症原因のひとつと考えられている。マウスを用いた過去の研究では、MMP(matrix metalloproteinase)-9が弾性線維の破壊をもたらしてAAAの進展に関与することが報告されている。他方、イヌキマーゼが潜在型MMP-9を活性化させることが報告されている。さらにマウスでは、大動脈瘤発症にはアンジオテンシン(Ang)Ⅱが関与していると報告されている。われわれはこれまでに、ヒトAAA組織のキマーゼ活性が正常大動脈に比し有意に高いことと、ハムスターAAAモデルでキマーゼ阻害薬のAAA進展抑制効果を示している。しかし、AAAにおけるキマーゼとMMP-9の関連については未だ明らかではない。そこで、本研究では、イヌAAAモデルを作製し、キマーゼ阻害がMMP-9の活性抑制をもたらす可能性について検討を加えた。</p> <p>【方法】 本研究には、雄ビーグルイヌを使用し、無処置である正常群、キマーゼ阻害薬であるNK3201を投薬したNK3201群、プラセボを投薬したプラセボ群の3群(各群5頭)に分けた。AAAモデル作成のために麻酔下に後腹膜アプローチで腹部大動脈を腎動脈下から分岐部にかけて露出した。腹部大動脈を約5cmにわたり一時的に遮断し、腰動脈からブタエラスターゼを大動脈内に2時間持続注入した。それぞれ投薬は、エラスターゼ注入3日前から実験終了までの毎日とした。AAAの外径を腹部超音波検査装置を用いて、その最大径を手術前、手術直後、ならびに8週目まで2週間ごとに測定した。内腔面積と全体の膜面積における中膜の占める割合を調べるために、8週後に摘出した動脈組織をパラフィン包埋し、切片をヘマトキシリン-エオジン、ファン・ギーソンエラスチンで染色した。キマーゼ陽性細胞と好中球の集簇を調べるために、抗イヌキマーゼ抗体と抗好中球抗体を用いて免疫組織化学的染色を施行した。大動脈組織抽出液を用いて、キマーゼ活性、アンジオテンシン変換酵素(ACE)活性、AngⅡ産生能を、AngⅠ、合成基質 hippuryl-His-Leu、AngⅠをそれぞれ基質として測定した。MMP-2,-9活性は、gelatin zymographyを用いて測定した。</p> <p>【結果】 NK3201群とプラセボ群の間には、手術前の大動脈径に有意差はなかった。手術直後では、両群とも</p>	

同等の拡張を認め、両群間に有意差はなかった。しかし2週目以降、プラセボ群では有意な拡大が進行し、時間依存的な進展を認めたのに対して、NK3201 群では8週間にわたり大動脈が拡大進展することはなかった。8週後の組織学的に検討した内腔面積も、プラセボ群では、正常群に比して有意に拡大しており、NK3201 群ではそれが有意に抑制された。また、全体の膜面積における中膜の占める割合は、プラセボ群では、正常群に比して有意な減少を認めたが、NK3201 群にはそれが認められなかった。

キマーゼ陽性細胞数はプラセボ群で 10.0 ± 2.0 個/mm²、正常群で 0.49 ± 0.1 とプラセボ群で有意に高く、NK3201 群では 2.39 ± 0.7 とプラセボ群に比して有意に低かった。好中球数においてもプラセボ群で 7.49 ± 1.19 、正常群で 0.96 ± 0.59 、NK3201 群で 4.04 ± 1.23 と同様の結果であった。

キマーゼ活性は、プラセボ群で 3.44 ± 0.62 mU/ mg protein、正常群で 0.35 ± 0.10 とプラセボ群で有意に増加しており、NK3201 群では 2.03 ± 0.31 とプラセボ群に比して有意に低かった。ACE 活性は3群間で有意差を認めなかった。Ang II 産生能はプラセボ群が正常群に比して有意に高く、NK3201 群ではプラセボ群に比して有意に低かった。MMP-2,-9 活性はプラセボ群で正常群に比して有意に高かった。MMP-9 活性はNK3201 群でプラセボ群に比して有意に低かったが、MMP-2 活性は低い傾向を認めるのみで有意差は認めなかった。

【考察】

イヌ AAA の進展に対するキマーゼ阻害薬の抑制効果と MMP 活性への影響について評価した。今回、エラスターゼを注入した直後は、プラセボ群とNK3201 群の両群において同等の大動脈の拡大を認めたが、その後プラセボ群では時間依存的な大動脈の拡大を認めるのに対して、NK3201 群ではそれを認めなかった。このことからNK3201 は、エラスターゼの作用を直接抑制するのではなく、エラスターゼ注入後の腹部大動脈瘤の進展機序を抑制したと解される。キマーゼ活性と同様に Ang II 産生能と MMP-9 活性はプラセボ群で正常群に比して有意に高く、NK3201 群ではプラセボ群に比して有意に低かった。このことからキマーゼが Ang II だけでなく MMP-9 の増加にも関与して、AAA の進展に重要な役割を果たしていることが示唆される。また、A II 産生酵素の一つである ACE には変化がなく、その関与は否定された。

MMP-9 は、細胞外基質分解酵素の中でもヒト AAA に特に重要とみなされている。イヌとマウスキマーゼは MMP-9 を直接的に活性化させると報告されている。本研究では、MMP-9 だけでなく MMP-2 活性もプラセボ群で正常群に比して有意に増加を示していた。NK3201 群ではプラセボ群に比して、MMP-9 活性は有意な減少を認めたが、MMP-2 活性は減少傾向を認めるにとどまった。MMP-2,-9 は細胞外基質を脆弱にし、血管平滑筋細胞の遊走にも重要な役割を果たし、AAA 形成にも寄与する可能性が高い。本研究ではNK3201 によって動脈の中膜がほぼ完全に保護されたことから、NK3201 の動脈瘤予防の機序の一部には、血管平滑筋細胞の遊走防止も含まれる可能性が高い。

すでにヒト AAA の外膜側にキマーゼ活性が高いことを報告しているが、本研究のイヌモデルでも外膜に多数のキマーゼ陽性細胞を認めた。また、トルイジンブルーで染色される肥満細胞は、キマーゼ陽性細胞とほとんど一致した局在を示した。これは肥満細胞がキマーゼを貯蔵していることを示している。また、キマーゼ陽性細胞数はプラセボ群で正常群に比して有意に高く、NK3201 群ではプラセボ群に比して有意に低かった。

ヒト AAA では、好中球も検出されてはいるが、マクロファージが代表的な炎症細胞とされている。ヒト AAA の発症初期における好中球の役割については未知である。しかし、ラットエラスターゼ誘導 AAA モデルでは、好中球は最初の炎症性反応と動脈瘤の拡大において重要な役割を果たすとされる。イヌ AAA モデルではエラスターゼ注入後 8 週目の大動脈で好中球の集簇を認め、AAA の拡大も続いていた。このことから AAA に対する好中球の関与も示唆された。

本研究により、キマーゼが Ang II と MMP-9 の産生と活性化に関与し、AAA の発症進展に重要な役割を果たし、キマーゼの抑制が AAA の治療に有用であることが示唆された。AAA に対する薬物治療の可能性をはじめて示した。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	古林 圭一
論文審査担当者		主 査 教授 勝 間 田 敬 弘 主 査 教授 宮 崎 瑞 夫 副 査 教授 北 浦 泰 副 査 教授 富 士 原 彰 副 査 教授 南 敏 明	
主論文題名 The significance of chymase in the progression of abdominal aortic aneurysms in dogs (イヌ腹部大動脈瘤の進展におけるキマーゼの役割)			
論文審査結果の要旨			
<p>本研究は、イヌ腹部大動脈瘤(AAA)モデルを作製し、キマーゼが MMP(matrix metalloproteinase)-9 の活性化を介して AAA の進展に関与する可能性を、キマーゼ阻害薬を用いて検討したものである。</p> <p>申請者は、雄ビーグルイヌの腹部大動脈にエラスターゼ処置することにより AAA を作製し、正常群、キマーゼ阻害薬群、プラセボ群に分けて比較検討している。超音波検査装置を用いて手術前、手術直後、ならびに 8 週目まで 2 週間ごとに最大径を測定している。組織学的検討として、内腔面積と全体の膜面積における中膜の占める割合、キマーゼ陽性細胞と好中球の集簇を調べ、また、大動脈組織抽出液を用いて、キマーゼ活性、アンジオテンシン変換酵素(ACE)活性、アンジオテンシン(Ang)II 産生能と MMP-2,9 活性を測定している。</p> <p>その結果、キマーゼ阻害薬群とプラセボ群の間では手術前、手術直後ともに大動脈径に有意差を認めていないが、2 週目以降プラセボ群では時間依存的な拡大を認め、それに対してキマーゼ阻害薬群ではその拡大が有意に抑制されたとしている。組織学的に検討した内腔面積も、プラセボ群では正常群に比して有意に大きく、キマーゼ阻害薬群ではそれが有意に抑制されている。また、血管断面積における中膜の占める割合は、プラセボ群では正常群に比して有意に小さく、キマーゼ阻害薬群では有意に大であった。キマーゼ陽性細胞数、好中球数はプラセボ群で正常群に比して有意に多く、キマーゼ阻害薬群で有意に少なかった。キマーゼ活性、Ang II 産生能はプラセボ群で正常群に比して有意に増加し、キマーゼ阻害薬群でそれらは有意に抑制されている。ACE 活性は3群間に有意差を認めていない。MMP-2,9 活性はプラセボ群で正常群に比して有意に高く、MMP-9 活性はキマーゼ阻害薬群でそれを有意に抑制している。MMP-2 活性はキマーゼ阻害薬群で抑制傾向を認めるのみで有意差は認めていない。</p> <p>これらの結果は、キマーゼが Ang II だけでなく MMP-9 の増加にも関与して、AAA の進展に重要な役割を果たしていることを示唆するものであり、キマーゼが Ang II と MMP-9 の産生と活性化に関与し、AAA の進展に重要な役割を果たし、キマーゼの抑制が AAA の治療に有用であることを示唆するものである。また、AAA に対する薬物治療の可能性をはじめて示し、キマーゼの病態生理、AAA の治療に重要な知見を与えるものである。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第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) Hypertension Research 2007 (in press)</p>			