

氏 名	藤 阪 智 弘
(ふりがな)	(ふじさか ともひろ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成 25 年 1 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題名	Angiotensin II promotes aortic valve thickening independent of elevated blood pressure in apolipoprotein-E deficient mice (アンジオテンシン II はアポ E 欠損マウスにおいて 血圧上昇に非依存的に大動脈弁の肥厚を促進する)
論文審査委員	(主) 教授 勝 間 田 敬 弘 教授 浮 村 聡 教授 出 口 寛 文

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《研究目的》

弁の著明な石灰化と硬化を特徴とする大動脈弁狭窄症 (AS) は、高齢化社会で罹患数が増加しているが、AS の進行を抑制する有効な治療法は未だ存在しない。病変形成の初期には、大動脈弁尖の肥厚、大動脈弁内皮の障害、炎症細胞浸潤、脂質の沈着、線維芽細胞の形質変換などが認められ、病理学的には血管の動脈硬化性変化と類似した点がある。これまでの高脂血症動物モデルを用いた検討では、高脂肪食負荷で大動脈弁に AS 類似の病変を生じ、スタチン治療により抑制されることが示されてきた。一方、中等症以下の無症状 AS 患者を対象とした無作為化二重盲検試験では、スタチン治療の有効性は示されなかった。また、大動脈弁置換術の切除後ヒト大動脈弁組織ではアンジオテンシン II の発現が報告され、弁形態の破綻の進行にレニン - アンジオテンシン系の関与が示唆されている。今回、

申請者らは高脂血症マウス（アポ E 欠損マウス）を用いて、アンジオテンシン II による大動脈弁の病理組織学的変化と降圧薬の効果を検討した。

《方 法》

普通食飼育の雄性アポ E 欠損マウスを 3 つのグループに分けた。コントロール群 (n = 8) : 生理食塩水投与、低用量群 (n=11) : アンジオテンシン II 500 ng/kg/min 投与群、高用量群 (n=11) : アンジオテンシン II 1000 ng/kg/min 投与群とし、生理食塩水およびアンジオテンシン II 溶液は、皮下埋込式浸透圧ポンプを用いて 4 週また、高用量のアンジオテンシン II を 4 週間持続投与した普通食飼育の雄性アポ E 欠損マウスを 3 つのグループに分け、アンジオテンシン II 単独群 (n = 10)、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) オルメサルタン併用投与群 (オルメサルタン 5 mg/kg/day、n = 15)、血管拡張薬ヒドララジン併用投与群 (ヒドララジン 50 mg/kg/day、n = 13) とした。オルメサルタンおよびヒドララジンは、食餌に混合して投与した。

組織学的検討は HE 染色を行うとともに、免疫染色を用いて、内皮細胞 (CD31)、筋線維芽細胞 (α SMactin) を染色した。

《結 果》

アンジオテンシン II 投与 4 週間後、低用量群と高用量群の血圧は、コントロール群に対して有意な上昇を認めたが、両群では有意な差は認めなかった(コントロール群: 107.5 \pm 2.2 mmHg、低用量群: 126.4 \pm 2.2 mmHg; p<0.001、高用量群: 132.6 \pm 2.5 mmHg; p<0.001)。HE 染色ではコントロール群と比較して、低用量群では大きな変化は認めなかったが、高用量群では弁の肥厚を認めた(コントロール群:22.2 \pm 4.0 μ m、低用量群: 34.6 \pm 6.1 μ m; p=0.25、高用量群: 64.1 \pm 9.8 μ m、p<0.001)。内皮障害の指標として CD31 陽性細胞の連続性を弁周囲で検討すると、高用量群で CD31 陽性細胞の連続性の有意な減少を認めた(コントロール群: 44.5 \pm 5.1%、低用量群: 36.1 \pm 4.0%; p=0.21、高用量群: 22.6 \pm 2.3%; p=0.001)。筋線維芽細胞出現の指標となる α SMactin 陽性細胞は、高用量群で有意に増加した(コント

ロール群: $2.7 \pm 0.3\%$ 、低用量群: $3.5 \pm 0.3\%$; $p=0.23$ 、高用量群: $6.4 \pm 0.5\%$; $p<0.001$)。 (p 値はコントロール群との比較)

アンジオテンシン II の高用量投与下で、オルメサルタンおよびヒドララジンは、同程度に血圧を低下させた(高用量群: 134.7 ± 4.8 mmHg、ヒドララジン併用群: 95.8 ± 1.3 mmHg; $p=0.001$ 、オルメサルタン併用群: 97.7 ± 1.3 mmHg; $p<0.001$)。オルメサルタン併用群では、有意な弁肥厚の減少(高用量群: 66.0 ± 5.9 μm 、ヒドララジン併用群: 57.5 ± 8.4 μm ; $p=0.39$ 、オルメサルタン併用群: 32.3 ± 4.6 μm ; $p<0.001$)、CD31 陽性細胞の連続性の増加(高用量群: $26.6 \pm 1.9\%$ 、ヒドララジン併用群: $23.3 \pm 2.0\%$; $p<0.01$ 、オルメサルタン併用群: $36.7 \pm 2.2\%$; $p<0.01$)、 $\alpha\text{SMactin}$ 陽性細胞の出現抑制(高用量群: $6.1 \pm 0.9\%$ 、ヒドララジン併用群: $5.4 \pm 0.8\%$; $p<0.01$ 、オルメサルタン併用群: $2.7 \pm 0.3\%$; $p<0.001$)を認めたが、ヒドララジン併用群では、これらの変化は認められなかった。(p 値は高用量群との比較)

《考察と結論》

今回の研究では、アポ E 欠損マウスにおいて、アンジオテンシン II の投与により、大動脈弁の肥厚を認めた。CD31 染色を用いて大動脈弁内皮の連続性を検討すると、内皮の連続性の破綻が認められた。AS において大動脈弁の内皮障害は、マクロファージの浸潤、酸化 LDL コレステロールの沈着を生じるが、今回のモデルではほとんど認められず、大動脈弁のより早期の変化を観察し得た可能性がある。弁硬化の機序として、弁の線維芽細胞から筋線維芽細胞への形質転換が重要と考えられている。本研究でも $\alpha\text{SMactin}$ 染色により、筋線維芽細胞の集簇が確認された。これらの変化は、ARB で抑制されたが、同等の降圧効果を認めたヒドララジンでは抑制されなかった。以上から、アンジオテンシン II 投与による大動脈弁の肥厚や変性には、アンジオテンシン II による昇圧非依存性の作用が関与していることが示された。今後、臨床において内皮障害を惹起する高血圧や脂質異常症を有する患者には、ARB 投与により大動脈弁の変化が抑制される可能性が期待される。

論文審査結果の要旨

弁の著明な石灰化と硬化を特徴とする大動脈弁狭窄症 (AS) は、高齢化社会で罹患数が増加しているが、AS の進行を抑制する有効な治療法は未だ存在しない。病変形成の初期には、大動脈弁尖の肥厚、大動脈弁内皮の障害、炎症細胞浸潤、脂質の沈着などが認められ、病理学的には血管の動脈硬化性変化と類似した点がある。本研究は、動脈硬化促進作用をもつアンジオテンシン II を持続投与することで生じる大動脈弁の変化と、その変化に対する降圧薬の効果を検討したものである。

申請者は、アポ E 欠損マウスにおいてアンジオテンシン II 負荷による大動脈弁肥厚モデルを作成し、以下の結果を得ている。

(1) アポ E 欠損マウスにおいて、アンジオテンシン II の投与により、有意な血圧上昇、大動脈弁の肥厚、大動脈弁内皮の連続性の破綻、筋線維芽細胞の集簇が確認された。

(2) (1) で認められた変化は、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) であるオルメサルタンで抑制されたが、同等の降圧効果を認めたヒドララジンでは抑制されなかった。

これらの結果は、アポ E 欠損マウスにおいて、アンジオテンシン II により、大動脈弁狭窄症の初期と類似した大動脈弁の肥厚と内皮障害、弁組織内細胞の形質変換が誘発されたことと、その変化は血圧非依存的に ARB によって抑制されることを示した。本研究は、大動脈弁病変に対するレニン - アンジオテンシン系の関与と ARB 使用による大動脈弁病変の抑制を示唆したものである。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 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。

(主論文公表誌)

Atherosclerosis 226(1): 82-87, 2013