

| | |
|---|-------|
| 氏 名 | 田崎 貴嗣 |
| <p>論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと) Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Deficiency Attenuates Vascular Injury-Induced Neointimal Hyperplasia by Suppressing Apoptosis in Smooth Muscle Cells (<i>ASK1</i> の欠損は、平滑筋細胞のアポトーシスを抑制することによって、血管障害モデルにおける内膜肥厚を減弱させる)</p> <p>論文要旨</p> <p>【目的】 Apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1 は酸化ストレスや炎症性サイトカインの刺激を介してアポトーシスを誘導に寄与する一酵素である。動脈硬化は炎症性複合病変であり、高血圧や脂質異常だけでなく、酸化ストレスや炎症性サイトカイン、アポトーシスなど多くの因子に規定され、組織学的には大きく粥腫形成と新生内膜肥厚に分けることが出来る。我々は、<i>ASK1</i> と <i>apolipoprotein E (apoE)</i> の double knockout mice (<i>ASK1</i>^{-/-}/<i>apoE</i>^{-/-}) を用いた高コレステロール血症モデルにおいて、<i>ASK1</i>^{-/-}/<i>apoE</i>^{-/-} の粥腫内マクロファージのアポトーシスが有意に減少することで necrotic core 形成が抑制され、粥腫破綻に対して保護的に作用する可能性を見出した。今回我々は、動脈硬化のもうひとつの側面と考えられる、血管平滑筋細胞 smooth muscle cells (SMC) の増生を主とした新生内膜肥厚に対する <i>ASK1</i> の役割について、<i>ASK1</i> knockout mice (<i>ASK1</i>^{-/-}) を用いた血管障害モデルを施行して検討した。</p> <p>【方法】 (1) 総頸動脈結紮モデル: Wild type (C57BL/6, WT) および <i>ASK1</i>^{-/-} (C57BL/6 background) を用い、左総頸動脈結紮後 2 週ないし 3 週で動脈を摘出した。①組織学・免疫組織化学的観察: 結紮部より中枢側へパラフィン包埋連続切片を作製し、H&E 染色を行って肥厚内膜の面積を比較した。加えて、Masson's trichrome 染色、transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色や bromodeoxyuridine (BrdU) 染色、α-smooth muscle actin (α-SMA), CD3, CD31, ki-67 等について免疫組織化学的に検討を行った。SMC および血管内皮細胞 endothelial cells (EC) のアポトーシスに関して、TUNEL を用いた蛍光二重染色もしくは <i>En face</i> 蛍光二重染色も施行した。②mRNA の抽出: 結紮後 2 週の左総頸動脈を用いて cDNA を作成した後、real time RT-PCR を施行し、種々の炎症性サイトカインや、SMC の遊走因子のひとつである platelet-derived growth factor (PDGF)-BB などの、mRNA レベルでの発現を検討した。③血清の採取: ELISA を施行して PDGF-BB を測定した。(2) 骨髄移植モデル: 9 Gy の X 線を照射した WT に、WT および <i>ASK1</i>^{-/-} の骨髄を各々注射移植後 5 週で、同様の総頸動脈結紮モデルを作製し、組織学的観察を施行した。</p> <p>【結果】 ①結紮後 3 週の左総頸動脈において、<i>ASK1</i>^{-/-} では WT と比し、新生内膜肥厚が有意に抑制されており、肥厚内膜内の α-SMA 陽性 SMC の単位面積当たりの数の減少も見られた。②<i>ASK1</i>^{-/-} では肥厚内膜内微小血管が有意に減少しており、浸潤する CD3 陽性 T リンパ球の減少も観察された。更に、複数の炎症性サイトカインの発現も減少していた。③<i>ASK1</i>^{-/-} では、肥厚内膜内および中膜内 SMC のアポトーシスが有意に抑制されていた。加えて CD31 陽性 EC のアポトーシスも抑制されており、CD54/CD106 といった EC 由来の接着因子の発現も有意に抑制されていた。④<i>ASK1</i>^{-/-} と WT の肥厚内膜内における SMC の細胞増殖能 (ki-67 or BrdU 染色陽性率) に有意な差は見られず、<i>ASK1</i>^{-/-} において PDGF-BB の発現が有意に減少していた。⑤<i>ASK1</i>^{-/-} では、電子顕微鏡下の観察で、肥厚内膜内 SMC の分泌型への脱分化は明らかでなく、Masson's trichrome 染色において、肥厚内膜内の細胞外基質の有意な減少が観察された。⑥骨髄移植モデルにおいても、<i>ASK1</i>^{-/-} donor 群では WT donor 群に比し、新生内膜肥厚が有意に抑制されており、非骨髄移植群の結果を支持する結果であった。</p> <p>【考察および結論】 血管障害モデルでの血管再構築において、<i>ASK1</i> の knockout により新生内膜肥厚が有意に抑制されることが確認された。加えて骨髄移植モデルにおいても非骨髄移植モデルの結果を支持したことから、肥厚内膜内の α-SMA 陽性細胞は、中膜由来の SMC だけでなく、骨髄由来の SMC 前駆細胞の遊走も関与している可能性が示唆された。<i>ASK1</i> の欠損が、anti-atherogenic に作用する機序として、①肥厚内膜内および中膜内の SMC のアポトーシス抑制による、中膜由来 SMC の遊走の抑制、②EC のアポトーシス抑制、および肥厚内膜内微小血管の減少による、骨髄由来 SMC 前駆細胞の遊走の抑制や、炎症細胞の新生内膜内への浸潤および炎症性サイトカイン分泌の抑制、③SMC 数の減少だけでなく、SMC 脱分化の抑制による、肥厚内膜内の細胞外基質の減少、の経路が少なくとも考えられた。</p> <p>我々は <i>ASK1</i>^{-/-}/<i>apoE</i>^{-/-} を用いた高コレステロール血症モデルにおいて、安定プラーク形成に傾く可能性を見出しており、今回 <i>ASK1</i>^{-/-} を用いた血管障害モデルでの血管再構築において、新生内膜肥厚の減少だけでなく、肥厚内膜内の新生血管の有意な減少も認め、<i>ASK1</i> knockout が安定プラーク形成に寄与する可能性を見出した。<i>ASK1</i> signaling の抑制は、粥腫安定化や angioplasty 後の再狭窄の抑制に有効であるかもしれない。</p> | |

学位論文審査結果要旨

| | | | | | | | |
|--------|-------|--------|---------|-------|---|--|--|
| 氏 名 | 田崎 貴嗣 | | | | | | |
| 論文審査委員 | 主査 所属 | 障害機構 系 | 病態機構 部門 | 久岡 正典 | ◎ | | |
| | 副査 所属 | 生体情報 系 | 生理情報 部門 | 尾辻 豊 | ◎ | | |
| | | 生体適応 系 | 生体機構 部門 | 岩井 佳子 | ◎ | | |
| | | | 系 | 部門 | ◎ | | |
| | | | 系 | 部門 | ◎ | | |

論文題目

Apoptosis signal-regulating kinase 1 deficiency attenuates vascular injury-induced neointimal hyperplasia by suppressing apoptosis in smooth muscle cells.

(ASK1 の欠損は、平滑筋細胞のアポトーシスを抑制することによって、血管障害モデルにおける内膜肥厚を減弱させる)

学位論文審査結果要旨

日本人の代表的な死因である心疾患や脳血管障害の多くが動脈硬化を起因としており、その病態の解明と発生・進展の予防は重要な課題といえる。動脈硬化の病変形成機序において血管内皮や中膜平滑筋のアポトーシスが重要な因子の一つであることが近年指摘されていることから、申請者らは種々のストレスに応答してアポトーシスを誘導することで知られる apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1 に着目し、ASK1 欠損マウスに動脈結紮を施した血管障害モデルを作製して、動脈硬化に関連した変化について詳細に検討した。

すなわち、ASK1 ノックアウトマウス(ASK1^{-/-})および対照としての正常マウスの左総頸動脈を結紮し、2～3 週後に屠殺して同動脈の結紮近位部(500～1500 μm)を形態学および生化学的に比較解析した。その結果、ASK1^{-/-}では対照と比較して血管のサイズ(外弾性板の長さ)や中膜の組織像に差は見られなかったが、内膜の肥厚(面積とその内膜/中膜比)が有意に抑制されており、特に同部における膠原線維(マッソン 3 重染色での青色部)の量や平滑筋細胞(α 平滑筋アクチン陽性)・浸潤 T リンパ球(CD3 陽性)の数が少なく、内膜内の新生血管(CD31 陽性)も少なかった。また、ELISA や定量的 RT-PCR による検討では、ASK1^{-/-}では TNF-α や IL-1β などの炎症性サイトカインや血小板由来増殖因子(PDGF-BB)、血管内皮における接着分子(CD54, CD106)の発現も対照に比較して抑制されていた。さらに、TUNEL 法による検討では内膜および内皮細胞におけるアポトーシスの数は対照よりも ASK1^{-/-}において有意に少なかったが、BrdU や MIB-1 標識による解析では内膜における細胞増殖能に差は認められなかった。透過電子顕微鏡下では、対照における肥厚内膜では遊走能を示す合成型(synthetic type)の平滑筋細胞が観察されたのに対し、ASK1^{-/-}の内膜には収縮型(contractile type)の細胞が主体であった。次に、放射線照射後の健常マウスに健常マウスあるいは ASK1^{-/-}の骨髄を移植し、同様の血管障害モデルを作製したところ、健常マウスの骨髄を移植したマウスの頸動脈では顕著な内膜肥厚が観察されたが、ASK1^{-/-}の骨髄を移植した方では内膜の肥厚は有意に抑制されていた。

以上の結果より、マウスにおける血管障害モデルでは、ASK1 によって誘導されるアポトーシスが動脈内膜の炎症細胞浸潤および平滑筋細胞の増加、炎症性サイトカイン・接着分子の産生、血管新生の誘導などを促進することで内膜の肥厚を引き起こしている可能性が示唆され、ASK1 のシグナル伝達系を人為的に遮断することによって動脈硬化における内膜肥厚や血管形成術後の再狭窄を制御できる可能性があると考えられる。本研究は動脈硬化の成り立ちにおける ASK1 を介したアポトーシスの重要性を実験的に明らかにした点で有意義であると考えられ、本学の学位論文として適格であると判断した。

平成 26 年 11 月 28 日