

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	内田 恒
学位論文題目			
血管平滑筋細胞を主体とする動静脈シャント吻合部内膜肥厚形成と マトリクスメタロプロテアーゼ2発現の関与に関する研究			
北海道医学雑誌 87巻2・3号 平成24年4月 掲載予定			
研究目的			
<p>糖尿病性腎症による慢性透析患者は年々増加し、閉塞・狭窄によるシャント不全の予防は重要な研究課題となっている。シャント狭窄は病理学的には血管平滑筋細胞の遊走と増殖による内膜肥厚が主因とされる。細胞の増殖、遊走には細胞接着分子と接着を解離する分解酵素の相互調節が必要であり、細胞外マトリクスの分解過程は関連細胞から分泌されるマトリクスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase; MMP)の関与が知られている。さらに血管平滑筋細胞の増殖、遊走には、血管基底膜を構成するコラーゲンを分解可能なゼラチナーゼである MMP2, MMP9 が関与することが示唆されている。一方、動脈における内皮障害の際に発生する内膜肥厚形成には骨髄由来細胞の関与が証明されているが、このメカニズムがシャント狭窄にも影響を与えているか否かは不明である。</p>			
<p>以上の背景を踏まえ本研究の目的は、MMP2 ノックアウトマウスを用いてシャント吻合部の内膜肥厚に対する MMP2 および骨髄由来細胞の関与の有無を明らかにするものである。</p>			
材料・方法			
<p>1. マウスシャントモデル</p>			
<p>C57Bl/6 の Wild type (MMP2^{wild}) と MMP2 ノックアウト (MMP2^{-/-}) で左頸動脈と頸静脈を 11-0 ナイロンで端側吻合しシャントモデルを作製した。術後 3 週目で犠牲死させ手術部位の血管を摘出した。</p>			
<p>2. 病理組織学的解析</p>			
<p>頰動静脈吻合部全体の標本をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色, Verhoeff-van Gieson elastic (VvG) 染色と α-actin, Mac-3 染色を行った。内膜肥厚病変定量は VvG 染色標本を用いて血管外周, 内膜肥厚部, 血管内腔, 血管狭窄度を算出した。</p>			

3. ゼラチンザイモグラム

吻合部組織片よりタンパクを抽出し SDS-PAGE で電気泳動した。ゲルを Coomassie blue で染色し、定量的に解析した。

4. 骨髄移植マウスシャントモデル

C57Bl/6 の Green Fluorescence Protein (GFP) トランスジェニックマウスと Wild type マウスに放射線照射し、ドナーとなる GFP マウスの大腿骨髄細胞 (5×10^6 個/0.3-0.5ml) を照射6時間後に経眼窩周囲腔に注入した。GFP マウスから GFP マウスに骨髄移植した群 (BMT^{GFP→GFP}) と GFP マウスから Wild type マウスに骨髄移植した群 (BMT^{GFP→wild}) を骨髄移植後6週目に前述のように動静脈シャントを作製した。

5. 統計解析

数値は平均±標準誤差で示した。統計解析は多群間比較を ANOVA followed by Tukey' s test で、2群間比較を Student' s t test で行った。P<0.05 を統計学的有意とした。

成 績

1. Wild type マウスにおけるシャント内膜肥厚の形態的評価

シャント作製3週目に吻合部静脈の側壁を中心に著明な内膜肥厚を認めた。病理組織標本の定量的評価では、血管面積 $0.478 \pm 0.0555 \text{ mm}^2$ に対し内膜肥厚部面積 $0.259 \pm 0.0289 \text{ mm}^2$ 、面積狭窄率 $56.1 \pm 3.21 \%$ であった。吻合部を含む組織切片の免疫染色では、 α -actin 陽性細胞を内膜肥厚組織内に多数認めたが、Mac-3 陽性細胞はほとんど認めなかった。

2. Wild type マウスにおける MMP の発現

ゼラチンザイモグラムにより吻合部組織中の潜在型 MMP2 と活性型 MMP2 の発現を経時的に検討し、術後4日目、7日目、21日目に活性型 MMP2 の有意な上昇を認めた。MMP9 は MMP2 の発現に先行して術後2日目に一過性の上昇を認めたが、術後4日目以降には発現していなかった。

3. MMP2^{-/-}マウスでの MMP 発現と内膜肥厚形成

MMP2 は MMP2^{wild} で術後7日目、21日目に発現増加を認めるが MMP2^{-/-}マウスでは全く発現はなかった。また MMP9 の発現は MMP2^{wild} マウス、MMP2^{-/-}マウスとも術後2日目に一過性に発現し、MMP2^{wild} および MMP2^{-/-}マウス間でほとんど変化を認めなかった。

病理組織上 MMP2^{-/-}マウスでは MMP2^{wild} マウスと比較して著明に内膜肥厚形成が少なく、面積狭窄率も統計学的に有意に MMP2^{-/-}マウスが低値であった ($p < 0.00001$)。MMP2^{-/-}マウスにおいても MMP2^{wild} マウスの所見とほぼ同様に α -actin 陽性細胞を内膜肥厚組織内に多数認め、Mac-3 陽性細胞はほとんど認めなかった。

4. シャント内膜肥厚への骨髄由来細胞の関与

骨髄移植マウスにシャントを作製し術後3週目に吻合部を検討した。BMT^{GFP→GFP}、BMT^{GFP→Wild}ともに非骨髄移植マウスと同様の内膜肥厚を形成していた。さらに同部を蛍光顕微鏡で観察したところ、BMT^{GFP→GFP}マウスでは内膜肥厚内に強く蛍光細胞を認めたが、BMT^{GFP→Wild}マウスではほとんど蛍光細胞を認めなかった。

考 案

本研究で、シャント作製後早期に発生する内膜肥厚の一因が血管平滑筋細胞の集積にあり、この血管平滑筋細胞の集積がMMP2ノックアウトマウスでは有意に抑制されることから、シャント吻合部組織でのMMP2発現上昇が内膜肥厚形成に関与することを確認した。また、動脈硬化性狭窄病変に対してバルーン血管拡張術やステント治療後の再狭窄では内皮障害を起点とする炎症性変化が生じ、血液中の骨髄由来細胞、特にマクロファージが深く関与することが明らかとなっているが、シャント内膜肥厚形成過程においてはマクロファージなどの骨髄由来細胞の関与は少ないことが明らかとなった。炎症性変化を伴う血管に形成される内膜肥厚は血管成分による要因に加えマクロファージの誘導などの全身性の要因が関与し誘導型MMPであるMMP9が関与することが推測される。しかし、正常な血管を用いて作製されたシャントにおいては、血行動態の変化、すなわち静脈の動脈化に伴う圧負荷、ずり応力、酸素化、pHなど局所環境変化が、血管構成成分である線維芽細胞から分泌される恒常型MMP2の活性化により内膜肥厚形成に影響を与えると推察され、今後さらなるMMP2発現の分子メカニズムの解明により、新たな視点に立った内膜肥厚の治療が可能となり、シャント不全の治療成績向上へと結びつくものと考えている。

結 論

マウス頸動静脈を吻合したシャントモデルでは吻合部静脈に内膜肥厚による狭窄を認め、この病変は主に血管平滑筋細胞により構成され、同部ではMMP2の発現が上昇していた。さらにMMP2^{-/-}マウスでは内膜肥厚形成が少なく、MMP2の発現が内膜肥厚形成に重要な関わりを持つことが示唆された。さらに骨髄移植マウスを利用したモデルの検討から、シャントモデルでの内膜肥厚形成には局所の血管平滑筋細胞の集積が重要で、骨髄由来細胞の関与は少ないことが明らかとなった。今後MMP2の発現調節に関する研究がシャント閉塞、狭窄の治療法開発に結びつくものとする。

引用文献

1. Deficiency of Gelatinase A Suppresses Smooth Muscle Cell Invasion and Development of Experimental Intimal Hyperplasia.
Masafumi Kuzuyaほか7名, *Circulation*. 2003;108:1375-1381.
2. Diverse Contribution of Bone Marrow Cells to Neointimal Hyperplasia After Mechanical Vascular Injuries. Kimie Tanakaほか3名. *Circ Res*. 2003;93:783-790.
3. Presence of bone-marrow- and neural-crest-derived cells in intimal hyperplasia at the time of clinical in-stent restenosis.
Dirk Skowaschほか5名. *Cardiovascular Research*. 2003;60:684-691

参考論文

参考論文 1

1. 題目

Matrix Metalloproteinase-9 Modulation by Resident Arterial Cells Is Responsible for Injury-Induced Accelerated Atherosclerotic Plaque Development in Apolipoprotein E-Deficient Miceに関する研究

Eric T. Choiほか8名と共著

2. 印刷公表の方法

及び時期

Arterioscl Throm Vas Biol. 25巻1020-1025P 2005年

参考論文 2

1. 題目

Integrin alpha(v)beta(3) as a target in the prevention of neointimal hyperplasia. に関する研究

Kokubo T ほか1名と共著

2. 印刷公表の方法

及び時期

J Vasc Surg. 45巻133-8P. Review. 2008年

参考論文 3

1. 題目

CKD accelerates development of neointimal hyperplasia in arteriovenous fistulas. に関する研究



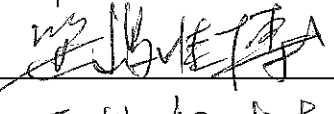



Kokubo T ほか7名と共著

2. 印刷公表の方法

及び時期

J Am Soc Nephrol. 20(6)巻1236-45P. 2009年

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	内田 恒
<p>審査委員長  </p> <p>審査委員  </p> <p>審査委員  </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>血管平滑筋細胞を主体とする動静脈シャント吻合部内膜肥厚形成と マトリクスメタロプロテアーゼ2発現の関与に関する研究</p>			

本研究では、マウスの動静脈シャントモデルを用い、シャント狭窄の主因である血管内膜肥厚形成におけるマトリクスメタロプロテアーゼ-2 (MMP-2) と骨髄由来細胞の役割を解析した。その結果、MMP-2 ノックアウトマウスでは、野生型マウスに比し、シャント部内膜肥厚の有意な減弱が認められ、MMP-2 の内膜肥厚形成における重要な役割が明らかとなった。また、GFP 陽性骨髄細胞移植実験により、骨髄細胞の内膜肥厚形成への関与は少ないことを明らかにした。

近年、糖尿病性腎症などによる慢性透析患者が急増しており、閉塞・狭窄によるシャント不全の予防法の確立が急務となっている。本研究は、MMP-2 がシャント部内膜肥厚形成において重要な役割を果たすことを示した。この結果は、今後 MMP-2 の発現や活性化機構の解明を基に、血管内膜肥厚に起因するシャント不全の新たな治療法の確立につながる可能性を示唆するものであり、その臨床的意義は大きいと考えられる。

なお、論文提出者に対し各審査委員より、本論文とその関連領域に関して試問が行われ、適切な回答が得られた。

以上より、本論文は博士の学位論文として適切であると判定した。