

論文内容要旨

【目 的】

我が国では、人口の高齢化や生活習慣の欧米化に伴い、従来の薬物療法では治療不十分な重症動脈硬化性疾患が増加してきている。これら重症例では、クオリティオブライフが損なわれるのみならず生命予後も不良であるため、新たな治療開発が望まれているが、近年試みられている細胞治療や遺伝子治療の治療効果は、まだ限定的である。最近、エリスロポエチン (Epo) が動脈硬化性疾患に有効であると報告され、また我々は、マウスの低酸素肺高血圧モデルにおいて、エリスロポエチン受容体 (EpoR) が血管内皮前駆細胞 (EPC) 動員を制御し、肺動脈内皮機能を改善することを報告した (Circulation 2006)。そこで本研究では、血球系細胞以外の EpoR を選択的に欠損させたマウス (EpoRKO) に下肢虚血を作成し、血管新生に対する Epo/EpoR 系の役割を検証した。

【方法・結果】

まず野生型マウス (WT) および EpoRKO に下肢結紮虚血を作成し、虚血後の血管新生を検討した。WT に比し EpoRKO では、結紮 2 週後の患肢/健肢のドップラー血流比は有意に低下し (0.75 ± 0.11 vs. 0.29 ± 0.08 ; $P < 0.01$)、末梢血中の EPC 数も有意に減少していた (0.30 ± 0.21 vs. 0.04 ± 0.02 ; $P < 0.01$)。次いで EPC を含む骨髄由来細胞の役割を検討する目的で WT および EpoRKO を WT もしくは EpoRKO の骨髄で置換 (4 群作成: WT-WT BM, WT-EpoRKO BM, EpoRKO-WT BM, EpoRKO-EpoRKO BM) すると、EpoRKO-WT BM では EPC 数が正常化し、EpoRKO-EpoRKO BM に比しドップラー血流比も有意に改善したが (EpoRKO-WT BM vs. EpoRKO-EpoRKO BM; 0.55 ± 0.11 vs. 0.31 ± 0.11 ; $P < 0.01$)、WT-WT BM のドップラー血流比の半分までの改善に留まった。虚血組織への骨髄由来細胞の遊走を検討するため、WT, EpoR の骨髄を GFP 陽性マウスの骨髄で置換すると、WT に比し EpoRKO の虚血下肢では、骨髄由来細胞の遊走が抑制されていた (%GFP⁺ cells; 3.3 ± 2.3 vs. 0.82 ± 1.2 ; $P < 0.05$)。さらに EpoRKO の虚血下肢では血管内皮増殖因子 (VEGF) の分泌、血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2) の発現も有意に低下しており、EpoRKO では血管新生に重要な役割を果たす骨髄由来細胞の遊走および成長因子の分泌が抑制されていることが明らかとなった。最後に VEGF 分泌量を補正する目的で WT および EpoRKO の皮下に VEGF を同量含有した Matrigel を植え込むと、WT に比し EpoRKO ではゲル中への血管新生が有意に抑制されており、骨髄由来細胞の関与、成長因子などの影響を除外した Aortic ring assay においても、EpoR-KO では血管新生が有意に低下していた。

【結 論】

Epo/EpoR 系は、間接的に骨髄由来細胞や成長因子を介し、また直接的にも血管新生に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

審査結果の要旨

我が国では、人口の高齢化や生活習慣の欧米化に伴い、従来の薬物療法では治療不十分な重症動脈硬化性疾患が増加してきている。これら重症例では、クオリティオブライフが損なわれるのみならず生命予後も不良であるため、新たな治療開発が望まれているが、近年試みられている細胞治療や遺伝子治療の治療効果は、まだ限定的である。最近、エリスロポエチン (Epo) が動脈硬化性疾患に有効であると報告され、また東北大循環器病態学分野から、マウスの低酸素肺高血圧モデルにおいて、エリスロポエチン受容体 (EpoR) が血管内皮前駆細胞 (EPC) 動員を制御し、肺動脈内皮機能を改善することが報告されている。このように Epo/EpoR 系の病態生理における役割の解明が進む中、虚血後血管新生における同システムの役割は未だ未解明である。

本研究では、血球系細胞以外の EpoR を選択的に欠損させたマウス (EpoRKO) に下肢虚血を作成し、血管新生に対する Epo/EPoR 系の役割を検証している。まず野生型マウス (WT) および EpoRKO に下肢結紮虚血を作成し、虚血後の血管新生を検討したところ、WT に比し EpoRKO では、結紮 2 週後の患肢/健肢のドップラー血流比は有意に低下し、末梢血中の EPC 数も有意に減少していた。次いで EPC を含む骨髄由来細胞の役割を検討する目的で WT および EpoRKO を WT もしくは EpoRKO の骨髄で置換 (4 群作成: WT-WT BM, WT-EpoRKO BM, EpoRKO-WT BM, EpoRKO-EPoRKO BM) すると、EpoRKO-WT BM では EPC 数が正常化し、EpoRKO-EpoRKO BM に比しドップラー血流比も有意に改善したが、WT-WT BM のドップラー血流比の半分までの改善に留まった。虚血組織への骨髄由来細胞の遊走を検討するため、WT, EpoR の骨髄を GFP 陽性マウスの骨髄で置換すると、WT に比し EpoRKO の虚血下肢では、骨髄由来細胞の遊走が抑制されていた。さらに EpoRKO の虚血下肢では血管内皮増殖因子 (VEGF) の分泌、血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2) の発現も有意に低下しており、EpoRKO では血管新生に重要な役割を果たす骨髄由来細胞の遊走および成長因子の分泌が抑制されていることが明らかとなった。最後に VEGF 分泌量を補正する目的で WT および EpoRKO の皮下に VEGF を同量含有した Matrigel を植え込むと、WT に比し EpoRKO ではゲル中への血管新生が有意に抑制されており、骨髄由来細胞の関与、成長因子などの影響を除外した Aortic ring assay においても、EpoR-KO では血管新生が有意に低下していた。

以上の実験結果より、Epo/EpoR 系は、間接的に骨髄由来細胞や成長因子を介し、また直接的にも血管新生に重要な役割を果たしていることが明らかとなった、と結論している。

本研究の結果から、虚血臓器における Epo/EpoR 系の役割、特に骨髄由来細胞、サイトカインに対する役割が明らかとなった。昨今の血管新生療法はともすると Exogeneous に投与する細胞やサイトカインのみに注目されがちであるが、本研究の結果から、受容体の modulation によっても治療効果を期待出来得ることが示唆され、臨床的にも興味のある結果であると言える。

よって、本論文は博士 (医学) の学位論文として合格と認める。