

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	羨 鮮
論文審査担当者	主 査 菅野 祐幸 副 査 多田 剛 ・ 田淵 克彦
論文題目	Vasoprotective activities of the adrenomedullin-RAMP2 system in endothelial cells (血管内皮細胞のアドレノメデュリン-RAMP2 系による血管保護作用)
(論文の内容の要旨)	<p>〔背景と目的〕 アドレノメデュリン(AM)は多彩な生理活性を有するペプチドである。AM およびそのファミリー因子はカルシトニン受容体様受容体 (CLR) を介して作用する。CLR のリガンドに対する特異性は、三つの受容体活性調節タンパク質によって決定される。RAMP2 ホモノックアウトマウスは、AM^{-/-}マウスと同様に血管の発達不全によって胎生中期に致死となることから、我々は、RAMP2 が、AM の血管新生作用の重要な規定因子であることを明らかとしてきた。一方で、AM-RAMP2 系の抗動脈硬化作用への関与は明らかではない。</p> <p>〔材料及び方法〕本研究では、初めに RAMP2 ヘテロノックアウトマウス (RAMP2^{+/-}) を用いた。野生型マウスおよび RAMP2^{+/-} の大腿動脈に対してワイヤーを挿入することで血管内膜傷害モデルを作成し、RAMP2 の発現低下による新生内膜形成におよぼす影響を検討した。次に誘導型血管内皮細胞特異的 RAMP2^{-/-}マウス (DI-E-RAMP2^{-/-}) を用いて、血管内皮細胞の AM-RAMP2 系の役割を検討した。さらに骨髄由来細胞の関与を検討するため、骨髄移植 (BMT) を行なった後ワイヤー傷害モデルを作成し、新生内膜形成に与える影響を検討した。最後に我々は、内皮前駆細胞 (EPC) の増殖および遊走に対する AM-RAMP2 系の意義を検討した。</p> <p>〔結果〕ワイヤー傷害後の新生内膜形成は、野生型マウスに比較して、RAMP2^{+/-}において有意に亢進していた。血管内膜と中膜の面積比も RAMP2^{+/-}において有意に高値であった。CD31 と α-SMA の二重免疫染色の結果では、RAMP2^{+/-}では傷害後の血管の平滑筋細胞増殖が亢進していたが、再内皮化は抑制されることが確認された。RAMP2^{+/-}では傷害部位の外膜および新生内膜におけるマクロファージ浸潤が亢進しており、炎症性サイトカインの発現亢進、NADPH oxidase の発現亢進と酸化ストレスレベルの増強を認めた。</p> <p>次に DI-E-RAMP2^{-/-}を用いて、ワイヤー傷害を加え、新生内膜形成を検討した。DI-E-RAMP2^{-/-}の血管では、sham 群、ワイヤー傷害群共に AM が代償性に発現亢進していた。DI-E-RAMP2^{-/-}では、新生内膜形成が亢進しており、平滑筋細胞増殖が亢進していたが、再内皮化は抑制されていた。病変部の炎症および酸化ストレスレベルも同様に亢進していた。</p> <p>次に、RAMP2^{+/-}と野生型マウス、または DI-E-RAMP2^{-/-}とコントロールマウスから採取した骨髄細胞を、放射線照射したレシピエントマウスに移植し、血管傷害を加えて新生内膜形成を検討した。その結果 RAMP2^{+/-}あるいは DI-E-RAMP2^{-/-}の骨髄を移植したレシピエントマウスでは、新生内膜の形成が各々のコントロールと比較して亢進しており、平滑筋細胞の増殖亢進と、再内皮化の抑制が認められた。以上の結果から、骨髄由来細胞における RAMP2 発現低下が、RAMP2^{+/-}および DI-E-RAMP2^{-/-}における新生内膜形成亢進に重要な役割を持つことが示された。</p> <p>最後に <i>in vitro</i> の系において、内皮前駆細胞 (EPC) における AM-RAMP2 系の役割を検討した。まず DI-E-RAMP2^{-/-}およびコントロールマウスの骨髄から EPC を初代培養した。EPC 初代培養 28 日後、DI-E-RAMP2^{-/-}ではコントロールに比較して、Dil-Ac-LDL および BS-1 lectin の 2 重陽性を示す EPC の数が低下していた。次に末梢血由来のヒト EPC (hEPC) では、AM、RAMP2 および CLR の発現が確認された。WST 細胞増殖アッセイにおいて、AM は濃度依存性に hEPC 増殖を亢進した。さらに AM 投与によって、hEPC によるマトリゲル内での管腔形成は有意に亢進した。これらの結果から、EPC の増殖および遊走が、AM-RAMP2 系によって制御されていることが示された。</p> <p>〔結論〕以上の結果から、AM-RAMP2 系は血管の恒常性を制御し、血管傷害時の新生内膜形成を抑制して動脈硬化の進展を抑制していることが明らかとなった。AM-RAMP2 系は動脈硬化や再狭窄に対する新たな治療標的として期待される。</p>