

氏名（本（国）籍）	岡 本 典 子（兵庫県）
主 指 導 教 員 名	東京農工大学 教授 松 田 浩 珍
学 位 の 種 類	博士（獣医）
学 位 記 番 号	獣医博甲第362号
学 位 授 与 年 月 日	平成24年3月13日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第3条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学 位 論 文 題 目	虚血性病変部における血管再生制御メカニズムに関する研究
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 深 田 恒 夫 副査 帯広畜産大学 教 授 猪 熊 壽 副査 岩 手 大 学 教 授 佐 藤 れえ子 副査 東京農工大学 教 授 松 田 浩 珍 副査 岐 阜 大 学 教 授 志 水 泰 武

論 文 の 内 容 の 要 旨

虚血性病態は、血栓などが局所循環を遮断することによって引き起こされ、脳梗塞や心筋梗塞、塞栓症による歩行困難など重篤な症状を呈する。特に、下肢の血管が塞栓された場合には、閉塞性動脈硬化症と呼ばれ、食生活の欧米化や高齢化社会の到来により、この疾患の患者は年々増加傾向にある。その他、閉塞性血栓性血管炎のバージャー病も含め、四肢末梢血管が閉塞される疾患をまとめて下肢循環不全症と呼ぶが、いずれも薬物療法だけで完治することは少なく、適切な治療を行わなければ下肢や足趾の切断に至る可能性がある。下肢循環不全症患者の多くが高齢者であり、下肢切断後の義足歩行が困難であることから、疾患の重症化を防ぎ、生活の質を安定させるためには早期の治療が必要となる。しかし、既存の治療法は十分な効果をあげられないものや、患者への侵襲が大きいものばかりであり、いまだに有用な血管形成療法は確立されておらず、その開発は現代社会において急務となっている。本研究では、新規血管形成療法の開発を目的として、ヒトの病態を的確に再現することのできる下肢循環不全症モデル動物を確立し、そのモデルを用いて下肢虚血病態と様々な血管形成因子との関連性を解析している。さらに、血管形成関連因子 *int6* を制御することによって、モデル動物の虚血病変部における血流と症状を改善できるかどうかを検証している。

第Ⅰ章では、これまで血流量や血管造影などで形態的にしか評価されてこなかった下肢循環不全症モデルに対して、新たに運動機能面の評価も行うことで、病態を的確に再現できているモデルを選別している。運動機能は、患者が快適な日常生活を送るうえで最も重要な因子であるため、モデル評価に必須の項目であると考えられる。マウスでこれまでに用いられることの多かった総腸骨動

脈結紮モデルと大腿動脈剥離モデルに、血流解析、組織学的解析、歩様機能評価を行った結果、総腸骨動脈結紮マウスは大腿動脈剥離マウスよりも長期間虚血状態を維持することができ、かつ下肢循環不全症患者でみられる間歇性跛行症状も再現できる適切な疾患モデルであることが示された。さらに、マウスモデルで得られた知見を元に、ラットについても下肢循環不全症モデルの作製と検証を実施し、マウスと同様に、総腸骨動脈結紮術が下肢循環不全症の病態を反映できるモデル作製に適した手段であることが示唆された。

第II章では、前章で作出した下肢循環不全症モデルの組織サンプルを回収することにより、血管形成における様々なシグナル調節遺伝子が網羅的に探索されている。また、虚血処置後にすみやかに上昇する血管形成関連因子が実際の病態に与える影響が、遺伝子欠損マウスで検されている。Real-time PCR アレイにより、外科的処置3時間後の虚血肢ではマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (*matrix metalloprotease-9*, *MMP-9*) を含む5つの血管形成促進遺伝子と2つの血管形成抑制遺伝子の発現量が上昇していることが明らかとなった。しかし、コントロール肢よりも発現が減少している遺伝子は認められなかった。さらに、虚血肢で発現上昇のみられた *MMP-9* 遺伝子の欠損マウスを用いて、総腸骨動脈結紮後の後肢の血流や歩様機能の評価を経時的に行い、自然回復を検証したところ、術後3, 7日目はコントロールマウスよりも血流量が減少しているにもかかわらず、歩様異常は全く発現していないことが明らかになった。以上の結果は *MMP-9* が虚血肢の痛みや組織損傷に関与する可能性を示唆している。本実験により、下肢循環不全症の虚血肢で発現変化し、血管形成に関与すると考えられる因子が明らかになった。また、虚血病変部で変動の認められた血管形成促進因子 *MMP-9* の新たな役割が示唆された。

第III章では、血管形成促進因子の転写活性作用をもつ *HIF-2 α* を分解することで新血管の増生を抑制するとされている *int6* 遺伝子のサイレンシングによって、下肢虚血に有効な治療効果が得られるかどうか検証している。第I章で作製した下肢循環不全症モデルラットの虚血肢の *int6* を siRNA で阻害すると、血流量と歩様機能の回復、新血管の構築が認められた。さらに、*int6* siRNA 注射ラットの虚血肢においては、*HIF-2 α* に加えて血管形成促進因子である肝細胞成長因子、線維芽細胞成長因子が発現増強していること、*HIF-2 α* が転写活性を発揮するために核内へ移行していることが明らかとなった。したがって、内在性 *int6* のサイレンシングは *HIF-2 α* の安定化と発現誘導を促し、血管新生に寄与すること、さらに歩様機能まで回復させることが示された。

本研究で得られた新知見により、病態を再現することのできる下肢循環不全症動物モデルが確立され、血管形成とともに臨床的に最も重要な運動機能の評価が可能となった。また、この評価システムを用いて、下肢虚血の血管形成に関与すると考えられる7つの遺伝子と、その中の1つである *MMP-9* 遺伝子が実際の病態に及ぼす影響も解明した。さらに、虚血部位の細胞に複数の血管形成因子を放出させることのできる *int6* siRNA は、末梢循環不全に対する新規血管形成治療法となりうることを示された。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、ヒトの下肢循環不全症の病態モデル作製と、それを利用した病態解析・新規治療法に関する研究の成果を取りまとめたものである。

まず、マウスで頻用される総腸骨動脈結紮モデルと大腿動脈剥離モデルを器質面、機能面の両方から検証したところ、前者は後者よりも長期間虚血状態を維持することができ、下肢循環不全症患者でみられる間歇性跛行症状も再現できる適切な疾患モデルであることが示された。さらに、ラットモデルでも、総腸骨動脈結紮術が下肢循環不全症のモデル作製に適した手段であることが示唆された。

次に、前章で作出したモデルの組織サンプルを回収し、様々なシグナル調節遺伝子を網羅的に探索したところ、術後の虚血肢では7つの血管形成関連遺伝子の発現が増加していることが明らかとなった。さらに、虚血肢で発現上昇した *MMP-9* 遺伝子の欠損マウスで虚血病変の自然回復を検証すると、術後3, 7日目は *MMP-9*^{-/-}マウスよりも血流量が減少しているにもかかわらず、歩様異常は認められなかった。以上のことから、*MMP-9* が虚血肢の痛みや組織損傷に関与する可能性が示唆された。

さらに、血管形成抑制作用をもつとされている *int6* 遺伝子のサイレンシングが、下肢虚血にもたらす治療効果を検証した。下肢循環不全症ラットの虚血肢の *int6* を siRNA で阻害すると、血流量と歩様機能の回復、新血管の構築が認められた。さらに、血管形成促進因子である HIF-2 α と肝細胞成長因子、線維芽細胞成長因子の発現増強と、HIF-2 α の核内移行が明らかとなった。したがって、*int6* サイレncing は HIF-2 α の安定化と発現誘導を促進し、血管新生に寄与すること、さらに歩様機能まで回復させることが示された。

本研究で得られた新知見により、病態を再現できる下肢循環不全症モデルが確立され、血管形成とともに臨床的に最も重要な運動機能の評価が可能となった。また、下肢虚血の血管形成に関与すると考えられる7つの遺伝子と、その中の1つである *MMP-9* 遺伝子が実際の病態に及ぼす影響も明らかとなった。さらに、虚血部位の細胞に複数の血管形成因子を放出させることのできる *int6* siRNA は、末梢循環不全の新規血管形成治療法となりうることを示された。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Silencing of *int6* gene restores function of the ischaemic hindlimb in a rat model of peripheral arterial disease
著 者 名 : Okamoto, N., Tanaka, A., Jung, K., Karasawa, K., Orito, K., Matsuda, A., Amagai, Y., Oida, K., Ohmori, K., and Matsuda, H.
学術雑誌名 : Cardiovascular Research
巻・号・頁・発行年 : 92 (2) : 209-217, 2011

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Oral supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 prevents development of atopic dermatitis in NC/NgaTnd mice possibly by modulating local production of IFN- γ
著 者 名 : Tanaka, A., Jung, K., Benyacoub, J., Prioult, G., Okamoto, N., Ohmori, K., Blum, S., Mercenier, A., and Matsuda, H.
学術雑誌名 : Experimental Dermatology
巻・号・頁・発行年 : 18 (12) : 1022-1027, 2009
- 2) 題 目 : A novel NF- κ B inhibitor improves glucocorticoid sensitivity of canine neoplastic lymphoid cells by up-regulating expression of glucocorticoid receptors
著 者 名 : Matsuda, A., Tanaka, A., Muto, S., Ohmori, K., Furusaka, T., Jung, K., Karasawa, K., Okamoto, N., Oida, K., Itai, A., and Matsuda, H.
学術雑誌名 : Research in Veterinary Science
巻・号・頁・発行年 : 89 (3) : 378-382, 2010
- 3) 題 目 : Peroxisome proliferators-activated receptor γ -mediated suppression of dendritic cell function prevents the onset of atopic dermatitis in NC/Tnd mice

- 著者名 : Jung, K., Tanaka, A., Fujita, H., Matsuda, A., Oida, K., Karasawa, K., Okamoto, N., Ohmori, K., Jee, Y., Shin, T., and Matsuda, H.
学術雑誌名 : The Journal of Allergy and Clinical Immunology
巻・号・頁・発行年 : 127 (2) : 420-429, 2011
- 4) 題 目 : Retinal degeneration and *rd1* mutation in NC/Tnd mice—a human atopic dermatitis model
著者名 : Karasawa, K., Tanaka, A., Jung, K., Matsuda, A., Okamoto, N., Oida, K., Ebihara, N., Ohmori, K., and Matsuda, H.
学術雑誌名 : Current Eye Research
巻・号・頁・発行年 : 36 (4) : 350-357, 2011
- 5) 題 目 : Patterns of aquaporin expression in the canine eye
著者名 : Karasawa, K., Tanaka, A., Jung, K., Matsuda, A., Okamoto, N., Oida, K., Ohmori, K., and Matsuda, H.
学術雑誌名 : The Veterinary Journal
巻・号・頁・発行年 : 190 (2) : 72-77, 2011
- 6) 題 目 : Glucocorticoid sensitivity depends on expression levels of glucocorticoid receptors in canine neoplastic mast cells
著者名 : Matsuda, A., Tanaka, A., Amagai, Y., Ohmori, K., Nishikawa, S., Xia, Y., Karasawa, K., Okamoto, N., Oida, K., Jang, H., and Matsuda, H.
学術雑誌名 : Veterinary Immunology and Immunopathology
巻・号・頁・発行年 : 144 (3-4) : 321-328, 2011