

氏名	やま はら けん いち 山 原 研 一
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2713 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration (ナトリウム利尿ペプチド/cGMP/cGMP依存性プロテインキナーゼ系の血管再生における意義とその治療応用の可能性)
論文調査委員	(主査) 教授 米田正始 教授 北 徹 教授 中尾一和

### 論 文 内 容 の 要 旨

ナトリウム利尿ペプチド (NP: ANP, BNP, CNP) は, cGMP/cGMP 依存性プロテインキナーゼ (cGK) 系を介して生物作用を発揮する。申請者らはこれまで ANP および BNP が主として心房あるいは心室から分泌される心臓ホルモンであるのに対し, CNP は血管内皮細胞から分泌され, 血管トーンスの制御のみならず, 血管リモデリングにも関与する血管ホルモンであり, 最近では軟骨伸長作用を有することも明らかにしてきた。更に, 申請者らはウサギ大腿動脈バルーン障害および頸動脈静脈グラフト置換モデルにおいて, 障害動脈にアデノウイルスを用いて CNP を遺伝子導入し, 新生内膜形成の抑制とともに, 内皮再生の促進を認めることを報告した。これらの結果を踏まえ, 本研究では NP/cGMP/cGK 系の血管再生作用を検討した。

BNP を肝臓にて過剰発現するトランスジェニックマウス (BNP-Tg), cGK のアイソザイムの一つである cGK type I (cGKI) ノックアウトマウス, および CAG プロモーターを用いた cGKI トランスジェニックマウス (cGK-Tg) を用い, 大腿動脈を結紮切除した下肢虚血モデルを作成し, 血管再生への影響を検討した。レーザードップラー法の解析では, 術後 12 日間虚血部における血流の回復は BNP-Tg において有意に促進した (12 日目の虚血下肢と非虚血下肢の血流比: BNP-Tg  $0.6 \pm 0.07$  vs. non-Tg  $0.45 \pm 0.04$ ;  $p < 0.05$ )。術後 10 日目における虚血筋の血管内皮および平滑筋マーカーである PECAM1/ $\alpha$ SMA による免疫染色では, BNP-Tg において有意に再生血管の増加を認めた。また, 虚血筋の白血球マーカーである CD45 による免疫染色から, 術後 3, 5, 7, 10 日目いずれにおいても, BNP-Tg における浸潤白血球は non-Tg と比較し同等あるいはむしろ減少していた。NO の合成酵素阻害剤 L-NAME 投与における同様の解析では, non-Tg において有意に血管再生が抑制されたが, BNP-Tg では非投与群とほぼ同様の血流の回復が認められた。cGKI ノックアウトマウスにおける検討では, 術後 28 日間にわたり虚血部における血管再生は有意に抑制された (28 日目の血流比: cGKI<sup>-/-</sup>  $0.20 \pm 0.03$ , cGKI<sup>+/-</sup>  $0.32 \pm 0.05$ , cGKI<sup>+/+</sup>  $0.44 \pm 0.06$ ;  $p < 0.05$ )。一方, cGKI-Tg を用いた検討では, 術後 28 日間にわたり虚血部における血管再生が有意に促進した (28 日目の血流比: cGKI-Tg  $0.84 \pm 0.06$  vs. non-Tg  $0.61 \pm 0.06$ ;  $p < 0.05$ )。また, ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を用いたマトリゲル法による検討では ANP・BNP・CNP ( $10^{-10} \sim 10^{-8}$  M) によりネットワーク形成の促進が認められ, その作用は cGK 阻害剤により抑制された。これらの結果を踏まえ, 下肢虚血モデルにおいて CNP の遺伝子導入を行った。Rat CNP cDNA を組み込んだ CMV プロモーターを持つプラスミドを虚血筋に導入したところ, 術後 20 日目において虚血部における血管再生が有意に促進した (20 日目の血流比: CNP plasmid 群  $0.75 \pm 0.07$  vs. control 群  $0.58 \pm 0.05$ ;  $p < 0.05$ )。

以上より, NP/cGMP/cGK 系を介した血管再生作用が初めて明らかとなった。本研究の結果から, NP の血管再生療法への応用の可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

ナトリウム利尿ペプチド (NP: ANP, BNP, CNP) は、cGMP/cGMP 依存性プロテインキナーゼ (cGK) 系を介して生物作用を発揮する。申請者らは ANP および BNP が心臓ホルモンであるのに対し、CNP は血管トーンスの制御のみならず、血管リモデリングにも関与する血管ホルモンであることを明らかにしてきた。また、申請者らは最近、ウサギ血管障害モデルにおいて CNP を障害血管に遺伝子導入し、新生内膜形成の抑制とともに、内皮再生の促進を認めることを報告した。これらの結果を踏まえ、本研究は NP/cGMP/cGK 系の血管再生作用を検討したものである。

各種遺伝子改変マウスを用い、大腿動脈を結紮切除した下肢虚血モデルを作成し、血管再生への影響を検討した。肝臓で BNP を過剰発現する BNP トランスジェニックマウス (BNP-Tg) での、レーザードップラー法および虚血筋における再生血管数の検討から、虚血部での血管再生の促進を証明した。また、cGK type I (cGKI) ノックアウト、および CAG プロモーターを用いた cGKI トランスジェニックマウスにおける解析から、cGKI の活性化により虚血部での血管再生の促進を認めた。更に、培養血管内皮細胞を用いたマトリゲル法による検討では、NP/cGMP/cGK 系の活性化によりネットワーク形成の促進が認められた。これらの結果を踏まえ、マウス下肢虚血モデルにおいて CNP プラスミドを用いた遺伝子導入を行ったところ、虚血部における血管再生の促進を証明した。

以上より、NP/cGMP/cGK 系を介した血管再生作用が明らかとなり、本研究の結果から、NP の血管再生療法への臨床応用の可能性が示唆された。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成16年1月27日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。