

氏 名	おお はし なお ひろ 大 橋 直 弘
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2365 号
学位授与の日付	平 成 13 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 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Neointimal Hyperplasia After Vascular Injury (ラット頸動脈バルーン傷害モデルにおける p38 MAP キナーゼの新生内膜形成に果たす役割についての研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 北 徹 教 授 米 田 正 始 教 授 藤 田 潤

論 文 内 容 の 要 旨

p38 MAP キナーゼは MAP キナーゼスーパーファミリーのひとつで、熱、高浸透圧、紫外線、リポ多糖 (LPS) などの物理化学的ストレスならびに TNF- α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインにより活性化される細胞内シグナル伝達の重要な分子である。p38 MAP キナーゼの活性化は細胞分化、細胞周期、アポトーシスおよび様々なサイトカインの産生に関係する事が知られ、生体内においても炎症をはじめとする種々の病態に深く関与しているものと考えられる。近年、炎症性疾患と捉えられるようになった動脈硬化および冠動脈形成術後の再狭窄については、p38 MAP キナーゼがその病態生理に果たす役割は現在のところ十分わかっていない。われわれは、ラット頸動脈バルーン傷害モデルを用いて傷害血管の新生内膜形成における p38 MAP キナーゼの役割について検討した。

方法と結果

In vivo の実験には、バルーンカテーテルを用いて SD ラットの左頸動脈の内膜剝離を行うモデルを用いた。抗リン酸化 p38 MAP キナーゼ抗体を用いた免疫組織学的染色により、傷害を受けたラット頸動脈では主に中膜において p38 MAP キナーゼが傷害直後 (10分) から活性化されることが明らかになった。また、p38 MAP キナーゼの特異的阻害薬である FR167653 (10mg/kg/day) をバルーン傷害 3 日前から経口投与すると、バルーン傷害 14 日後における新生内膜/中膜比が非投与群に比し 29.4% 抑制された ($p < 0.05$)。さらに同容量の FR167653 投与群では、バルーン傷害 48 時間後において中膜における PCNA 陽性細胞が非投与群に比し有意に少なく ($19.0 \pm 0.9\%$ vs $25.4 \pm 1.2\%$; $p < 0.05$)、新生内膜形成の抑制は傷害直後の中膜における細胞増殖の抑制が関係していることが考えられた。定量的競合的 RT-PCR 法を用いて傷害頸動脈組織での IL-1 β mRNA 発現を検討した結果、同 mRNA 発現は傷害 1 時間後より誘導され、8 時間後に最大値を示し、以後 120 時間後においても亢進していることが明らかになった。さらに傷害 8 時間後において、FR167653 投与群 (10mg/kg/day) では、非投与群に比し IL-1 β mRNA 発現が 18.1% に抑制された ($p < 0.05$)。Explant 法にて分離した培養ラット大動脈平滑筋細胞を用いた実験において、TF-2 を基質とする *in vitro* kinase assay から、LPS (1 μ g/mL) で刺激した培養平滑筋細胞では p38 MAP キナーゼは刺激 5 分後より活性化され、15 分後に最大となり、120 分後に刺激前値に戻ることがわかった。LPS 刺激 15 分後において、FR167653 で前処置を施した培養平滑筋細胞の p38 MAP キナーゼ活性は同薬剤の濃度依存的 ($1 \times 10^{-3} \sim 1 \mu$ M) に抑制された。さらに ELISA 法にて、LPS (1 μ g/mL) で刺激した培養平滑筋細胞では IL-1 β 産生が誘導され、FR167653 にて濃度依存的 ($1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-1} \mu$ M) に抑制されることもわかった。

考察

本研究により p38 MAP キナーゼはバルーン傷害を受けた動脈壁で活性化され、組織内での IL-1 β 遺伝子発現の誘導および新生内膜形成を促すことがわかった。さらに p38 MAP キナーゼの選択的な抑制は冠動脈形成術後の再狭窄予防に有効であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

p38 MAP キナーゼ (MAPK) は MAPK スーパーファミリーのひとつで、生体内において様々な病態に関与しているものと考えられる。本研究では傷害血管の新生内膜形成における p38 MAPK の役割について検討した。【方法と結果】ラット大動脈平滑筋細胞は、*in vitro* kinase assay 法、ELISA 法によりリポ多糖で刺激すると、IL-1 β 産生の誘導および p38 MAPK の活性がみられ、それらは FR167653 にて抑制された。ラット頸動脈バルーン傷害モデルにおいて抗リン酸化 p38 MAPK 抗体を用いた免疫組織染色から、傷害血管において p38 MAPK が活性化されることがわかった。定量的競合的 RT-PCR 法により、傷害血管では IL-1 β mRNA の発現が誘導され、その発現は p38 MAPK 阻害薬である FR167653 の投与にて有意に抑制されることがわかった。内膜新生および傷害直後の中膜内の細胞増殖も FR167653 の投与により有意に抑制された。【考察】p38 MAPK は傷害血管において活性化され、IL-1 β 遺伝子発現の誘導および新生内膜形成を促すことがわかった。p38 MAPK の選択的抑制は冠動脈形成術後の再狭窄予防に有効であることが示唆された。

以上の研究は、傷害血管の新生内膜形成における p38 MAPK の役割の解明に貢献し、新たな治療法開発に寄与するところが多い。

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13年2月20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。