

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                       |     |         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 博士（医 学）                                                                                                                                                               | 氏 名 | 大 仲 玄 明 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Effect of microRNA-145 to prevent vein graft disease in rabbits by regulation of smooth muscle cell phenotype<br>(マイクロRNA-145 の血管平滑筋細胞フェノタイプ制御によるウサギ静脈グラフトの内膜肥厚の抑制効果) |     |         |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                       |     |         |
| <p>【背景および目的】自家静脈グラフトは冠動脈バイパス手術に広く用いられているが、進行性の粥状硬化のため動脈グラフトと比較すると遠隔期の開存率は低い。静脈グラフト病変の病態は内膜肥厚とそれに続く血栓閉塞であり、その過程で血管平滑筋細胞の増殖と遊走が主要な役割を果たしている。</p> <p>MicroRNA-145（以下 miR-145）は血管平滑筋細胞の増殖、分化、表現型を特異的に制御することが最近明らかにされた。今回、ウサギの静脈グラフトモデルにおいて miR-145 遺伝子を静脈グラフトに導入し、静脈グラフト病変に及ぼす効果を検討した。</p> <p>【方法】遺伝子導入：miR-145 を過剰発現するプラスミドを作成し、エレクトロポレーション法にて ex vivo に静脈グラフトへ遺伝子導入した。</p> <p>静脈グラフトモデル：日本白ウサギ（雄）の右内頸静脈を採取し、内腔を擦過して内皮細胞を剥奪した後、同側頸動脈に移植した。移植前に miR-145 の遺伝子導入を行った群(M 群)と行わなかった群(C 群)で以下の項目を比較した。術後 4 週目に静脈グラフトを摘出し、病理組織標本にてグラフト内膜厚および内膜/中膜面積比を計測した。さらに免疫組織染色によって平滑筋ミオシン重鎖-1 (SM-1) および 2(SM-2)、細胞増殖の指標である Ki-67 の発現を検討した。また術後 3 日目の摘出標本から mRNA を抽出し、Serum response factor(SRF)およびミオカルディンの発現を定量的 RT-PCR 法を用いて測定した。</p> <p>【結果】術後 4 週目の摘出標本において、M 群は C 群と比較して内膜厚が有意に薄く（M 群 <math>42.4 \pm 4.8 \mu\text{m}</math>, C 群 <math>136.5 \pm 38.3 \mu\text{m}</math>, <math>p&lt;0.05</math>, <math>n=8</math>）、内膜/中膜面積比が有意に小さかった（M 群 <math>0.22 \pm 0.04</math>, C 群 <math>1.13 \pm 0.23</math>, <math>p&lt;0.01</math>, <math>n=8</math>）。免疫組織染色では SM-1 陽性細胞は両群で差が無かったが、SM-2 陽性細胞は M 群で C 群より多く観察された。Ki-67 陽性細胞は M 群において C 群より少なかった。定量的 RT-PCR 法では、SRF mRNA の発現は両群で差が無かったが、ミオカルディン mRNA の発現は C 群に比し M 群で有意に高かった（対 GAPDH 比 M 群 <math>2.03 \pm 0.99</math>, C 群 <math>0.90 \pm 0.46</math>, <math>p&lt;0.001</math>, <math>n=5</math>）。</p> <p>【考察】miR-145 遺伝子導入を行った群ではコントロールと比べ、動脈化された静脈グラフトの内膜肥厚が有意に抑制された。組織学的検討では、miR-145 遺伝子を導入したグラフトでより多くの分化型平滑筋細胞が観察され、導入された miR-145 により平滑筋細胞の分化が促進されたと考えられた。また、術後早期のグラフトにおける mRNA 解析結果より、miR-145 による平滑筋細胞増殖抑制はミオカルディン発現上昇を介することが示唆された。遺伝子導入によって静脈グラフト病変を抑制する方法はこれまでに動物実験では数多く発表されているが、ウイルスベクターの使用が臨床応用の障壁となってきた。今回、エレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入により、静脈グラフト病変の抑制効果が確認されたことは、今後の臨床応用に期待ができる。</p> <p>【結論】血管平滑筋の表現型を特異的に制御する miR-145 の遺伝子を、ウイルスベクターを用いずに自家静脈グラフトに導入することにより、グラフト内膜増殖の抑制が得られた。本法は外科的血行再建術後の静脈グラフト病変を予防する新しい方法になりうる。</p> |                                                                                                                                                                       |     |         |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>（論文審査の結果の要旨）</p> <p>自家静脈グラフトは冠動脈バイパス手術に広く用いられているが、進行性の粥状硬化のため動脈グラフトと比較すると遠隔期の開存率は低い。その原因として血管平滑筋細胞の増殖と遊走が主要な役割を果たしている。MicroRNA-145（miR-145）は血管平滑筋細胞の増殖、分化、表現型を特異的に制御する。本研究では、miR-145 遺伝子を静脈グラフトに導入し、静脈グラフト病変に及ぼす効果を検討した。</p> <p>miR-145 を過剰発現するプラスミドをエレクトロポレーション法にて静脈グラフトへ遺伝子導入した群と、導入を行わなかった群を作成し、これを日本白ウサギ（雄）の静脈グラフトモデルに応用し両群を比較、検討した。</p> <p>本研究で得られた知見は、1) miR-145 を静脈グラフトへ導入することで内膜肥厚が抑制された、2) miR-145 は血管平滑筋細胞の分化を促進あるいは脱分化を抑制することが示唆された、3) miR-145 による平滑筋細胞の増殖抑制にはミオカルディン発現の上昇が関与することが示唆された、である。</p> <p>遺伝子導入によって静脈グラフト病変を抑制する方法はウイルスベクターの使用が臨床応用の障壁であった。本研究では、血管平滑筋の表現型を特異的に制御する miR-145 遺伝子を、ウイルスベクターを用いずにエレクトロポレーション法にて自家静脈グラフトに導入することでグラフト内膜肥厚を抑制することができた。</p> <p>以上の研究は外科的血行再建術後の静脈グラフト病変の解明に貢献し、その予防に寄与するところが多い。</p> <p>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。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成26年 8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。</p> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

