

氏 名	みや した かず とし 宮 下 和 季
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2985 号
学位授与の日付	平 成 18 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	The neuro - protective and vasculo - neuro - regenerative roles of adrenomedullin in ischemic brain and its therapeutic potential. (アドレノメデュリンの虚血脳における神経保護作用ならびに血管 - 神経再 生作用とその治療応用に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 伊 藤 壽 一 教 授 橋 本 信 夫 教 授 河 野 憲 二

論 文 内 容 の 要 旨

申請者らはこれまで一貫して血管作動性ペプチドの血管リモデリングと血管再生における意義に注目して研究を続け、cGMP/cGMP 依存性プロテインキナーゼ系を介して血管拡張作用を発揮するナトリウム利尿ペプチド (NP: ANP, BNP, CNP) が、血管トーンを制御するのみならず、血管再生をも促進することを明らかにした。その研究成果を踏まえ本研究では、CNP 同様血管壁より分泌され cAMP/cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) 系を介して血管拡張作用を発揮するペプチド、アドレノメデュリン (AM) の血管再生作用を解析し、虚血脳再生治療への応用の可能性を検討した。

培養血管内皮細胞にセルスクレイパーで損傷を加え、その再生過程を検討する Wound healing アッセイと、マウス腹部皮下へゲルプラグを移植し、プラグ内の新生血管を定量するゲルプラグアッセイにより、AM の血管再生作用を検討した。その結果、 $10^{-7} \sim 10^{-9} \text{mol/l}$ の AM は培養血管内皮細胞の増殖と遊走を促進するとともに、PKA とホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) を介して血管再生に重要な意義を有するシグナル分子 Akt を活性化し、in vitro, in vivo 双方において血管保護再生作用を発揮することを明らかにした。

さらに申請者は AM の虚血脳再生治療への応用を検討する目的で、SAP プロモータにより肝臓において AM を過剰発現するトランスジェニック (AM-Tg) マウスを作製し、中大脳動脈20分閉塞脳梗塞モデル (20m-MCAO) を AM-Tg マウスに施行して、虚血基底核の組織学的解析を行った。AM-Tg マウスの血中 AM 濃度は $585.5 \pm 117.7 \text{fmol/ml}$ と、生理的濃度の数十倍に達していた。20m-MCAO を施行した後に、白血球マーカー CD45 とアポトーシスマーカー single strand DNA (ssDNA) を免疫組織化学的に定量すると、AM-Tg マウスでは亜急性期 (第3～7病日) から虚血域への白血球浸潤とアポトーシスが有意に抑制され (第7病日 CD45 陽性細胞 (/mm²): 野生型 197.5 ± 16.6 , AM-Tg 140.7 ± 14.6 ; $P < 0.05$ 。第7病日 ssDNA 陽性細胞 (/mm²): 野生型 214.8 ± 19.6 , AM-Tg 123.3 ± 11.1 ; $P < 0.01$)、第7病日以降にはニューロンマーカー NeuN とグリアマーカー GFAP で評価した梗塞域とグリオシスが縮小した (第56病日梗塞域 (mm²): 野生型 0.88 ± 0.08 , AM-Tg 0.64 ± 0.08 ; $P < 0.05$ 。第56病日グリオシス (mm²): 野生型 0.76 ± 0.08 , AM-Tg 0.56 ± 0.07 ; $P < 0.05$)。また、急性期には青色色素 Evans Blue の漏出で評価した虚血域脳浮腫の軽減を認めた。さらに AM-Tg マウスにおいては、血管内皮細胞に分化して血管再生を促進する効果が知られている末梢血中 CD34 陽性内皮前駆細胞が第3病日以降に増加し、第7病日以降にはレーザー Doppler 法と内皮マーカー PECAM-1 の免疫染色で解析した虚血域の血管再生が亢進していた (第7病日 PECAM-1 陽性細胞 (/mm²): 野生型 468.8 ± 21.8 , AM-Tg 536.6 ± 13.6 ; $P < 0.05$)。それに伴い第28病日以降には BrdU-NeuN 二重陽性細胞として定義される再生ニューロンの増加が明らかとなり (第56病日再生ニューロン (/mm²): 野生型 20.4 ± 3.9 , AM-Tg 33.9 ± 4.7 ; $P < 0.05$)、ロータロッドで評価した運動機能の改善を認めた (第49病日運動時間 (秒): 野生型 21.5 ± 1.5 , AM-Tg 27.1 ± 2.0 ; $P < 0.01$)。また in vitro の検討で AM を培養液に添加すると、AM は正常ヒト神経前駆細胞 (NHNP) に対してアポトーシス抑制作用を、ラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞株に対して神経分化促進作用を直接的に発揮した。浸透圧ポンプを用いた外因性 AM 投与も梗塞域を縮小し、血

管再生を促進した。

これらの結果より AM の神経保護作用ならびに血管 - 神経再生作用が初めて明らかとなり、AM の虚血脳再生治療への応用の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究で申請者はアドレノメデュリン (AM) の虚血脳再生治療への応用を目指し、肝臓において AM を過剰発現するトランスジェニック (AM-Tg) マウスを開発して、中大脳動脈20分閉塞脳梗塞モデル (MCAO) を施行して、AM の虚血脳における作用を検討した。

AM-Tg マウスの虚血基底核を免疫組織化学的手法により解析すると、第3病日から虚血域への白血球浸潤とアポトーシスが野生型マウスと比較して有意に減少し、第7病日以降には梗塞域とグリオーシスが約30%縮小した。さらに虚血域の血管再生が第7病日以降に亢進し、それに伴い第28病日以降には再生ニューロンの増加と、運動機能の改善が明らかとなった。また *in vitro* の検討において AM は正常ヒト神経前駆細胞に対してアポトーシス抑制作用を、ラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞に対して神経分化促進作用を発揮した。これらの結果を踏まえ、浸透圧ポンプを用いた AM 投与を行ったところ、AM は MCAO による梗塞域を縮小し、血管再生を促進することが証明された。

以上の研究は AM の虚血脳における神経保護作用と血管 - 神経再生作用の解明に貢献し、AM の虚血脳再生治療への臨床応用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18年2月21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。