

京都大学	博士（医学）	氏 名	松前 宏信
論文題目	CCN1 Knockdown Suppresses Neointimal Hyperplasia In A Rat Artery Balloon Injury Model (CCN1 の発現抑制はラットバルーン障害モデルにおいて新生内膜増殖を抑制する)		
(論文内容の要旨)			
冠動脈疾患の治療に対し、経皮的冠動脈インターベンション(PCI)は広く普及している治療法である。薬剤溶出型ステント(DES)の登場により治療後再狭窄はかなり抑制されたが、未だ完全な解決には至っていない。ステント内再狭窄は主に血管平滑筋細胞(VSMC)の増殖によるとされ、その増殖を導入・促進する生理学的メカニズムを解明することは重要である。 本研究において VSMC の接着・遊走に関わるとされる因子であるヘパリン結合性細胞外マトリックスタンパクである CCN1 に着目し、病態形成における役割について検討した。 CCN1 は胎生期においても VSMC に発現するが、遺伝子制御により発現抑制すると胎盤の血管新生が抑制されることから、発生期の血管新生に重要な役割を果たすとの報告がある。一方、CCN1 は$\alpha 6 \beta 1$ インテグリンを介して VSMC の接着・遊走に関わっていることが知られ、これらは CCN1 が VSMC との相互作用により新生内膜増殖や動脈硬化病変進展への関与が示唆される。実際に CCN1 はラット頸動脈バルーン障害モデルや、Apo-E 欠損マウスあるいはヒト頸動脈の動脈硬化病変に強く発現しているため病態との関連が考えられる。 そこで CCN1 発現の抑制により、VSMC の増殖ひいては新生内膜増殖を抑制できると仮定し実験を行い以下の結果を得た。 ① バキュロウィルスにより昆虫細胞 Sf9 の培養上清中に CCN1 タンパクを分泌させ、リコンビナント CCN1 タンパクを精製した。このリコンビナント CCN1 による固相化結合実験では CCN1 はラット VSMC と容量依存的に結合し$\alpha 6 \beta 1$ インテグリンの中和抗体によりこの結合は抑制された。 ② リコンビナント CCN1 を用いた VSMC の遊走実験では CCN1 は容量依存的に VSMC の遊走を促進し$\alpha 6 \beta 1$ インテグリン中和抗体により抑制された。 ③ CCN1 の VSMC の増殖に対する作用を評価した。$\alpha 6 \beta 1$ インテグリン中和抗体により VSMC の BrdU 取り込みは有意に抑制されレンチウィルスによる RNAi で CCN1 をノックダウンすると VSMC の細胞数及び BrdU の取り込みは有意に抑制された。さらにリコンビナント CCN1 添加により容量依存的に VSMC の細胞数及び BrdU の取り込みは有意に回復した。これらより CCN1 は$\alpha 6 \beta 1$ インテグリンを介して VSMC の接着・遊走・増殖への関与が示唆された。 ④ ラット頸動脈バルーン障害モデルを作成し、障害後 14 日において CCN1 発現の亢進を組織免疫染色並びに頸動脈から採取したタンパクを用いたウェスタンブロット法により確認した。また組織蛍光二重染色により CCN1 を発現している殆どの細胞が VSMC であることも確認した。 ⑤ バルーン障害時に濃縮した(p24 抗原換算で 50pg)レンチウィルスによる RNAi を感染させ内因性 CCN1 をノックダウンしたところ、新生内膜の VSMC 数及び新生内膜面積は有意に抑制され、ウェスタンブロット法によりタンパクレベルでの CCN1 の発現が抑制されていることを確認した。また、CCN1 を過剰発現するレンチウィルスの共感染により新生内膜面積及び新生内膜中の VSMC 数は対照群と同等レベルまで回復した。さらにバルーン障害/RNAi 感染後 3 日及び 28 日における評価では組織免疫染色及びウェスタンブロット法において 3 日後において既に CCN1 発現が抑制され、28 日後までその効果は持続することも確認した。 本研究により、CCN1 の発現抑制が血管内インターベンション後再狭窄予防の新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。			

（論文審査の結果の要旨）			
冠動脈疾患の治療法として経皮的冠動脈インターベンションは広く用いられている。しかしステント内再狭窄などの問題は未解決である。従って、ステント内再狭窄の原因である血管平滑筋細胞(VSMC)の増殖メカニズムを解明することは重要である。 本研究ではVSMCの接着・遊走に関わるとされる因子であるヘパリン結合性細胞外マトリックスタンパク質であるCCN1に着目した。CCN1はラットバルーン障害モデルやApo-Eノックアウトマウス及びヒト動脈硬化巣などに強発現しているという報告もあり、その病態形成における役割について検討した。その結果、CCN1は$\alpha 6 \beta 1$インテグリンを介してVSMCの接着・遊走のみならず増殖にも関与していることが示唆された。またラット頸動脈バルーン障害モデルにおいて、RNAi発現レンチウイルスによりCCN1の発現を抑制すると、障害後14日において新生内膜増殖が有意に抑制され、CCN1を発現するレンチウイルスを共感染させると新生内膜増殖が対照群と同等レベルまで起こることを確認した。さらに、障害後3日および28日の評価において、RNAiによるCCN1の発現抑制効果は障害後3日ですでに始まっており、少なくとも28日目まで持続していることも確認された。以上のことはCCN1が冠動脈疾患治療の新たなターゲットとなる可能性を示唆するものである。 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 20 年 6 月 9 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。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			