

| | |
|-------------|--|
| 氏 名 | 佐藤 哲也 |
| 学 位 の 種 類 | 博士 (医学) |
| 学 位 記 番 号 | 乙第 811 号 |
| 学位授与年月日 | 令和 3 年 8 月 12 日 |
| 学位授与の要件 | 自治医科大学学位規定第 4 条第 3 項該当 |
| 学 位 論 文 名 | マルファン症候群モデルマウスにおける胸部大動脈瘤拡大のスタチンによる抑制機序に関する研究 |
| 論 文 審 査 委 員 | (委員長) 教授 石 橋 俊 (委 員) 教授 武 田 憲 彦 教授 今 井 靖 |

論文内容の要旨

1 研究目的

マルファン症候群の病態を理解するために、マルファン症候群モデルマウスを用いた解析が広く行われている。以前の報告よりマルファン症候群モデルマウスにおいてスタチン投与の有効性が示されたが、その機序は未だ明らかになっていない。スタチンは血中のコレステロールを低下させるだけでなく、Ras を含む膜結合型 G タンパク質シグナル伝達に関与するファルネシル化とゲラニルゲラニル化をブロックすることが報告されており、そこで本研究ではスタチンによる大動脈径拡大の抑制効果におけるこれらのプレニル化経路の役割について検討した。

2 研究方法

Ras の活性化と大動脈瘤の発症効果を明らかにするため、スタチンの投与に加え、選択的プレニル化阻害薬として、ファルネシル化阻害薬であるマヌマイシン A (以下、MA) とゲラニルゲラニル化阻害薬であるペリリルアルコール (以下、PA) を使用した。*in vivo* 実験として、マルファン症候群のマウスモデルである Fbn1C1039G/+マウスを対象として、4~8 週齢の期間、(1) プラバスタチン (HMG-CoA [3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A]還元酵素阻害剤)、(2) MA、(3) PA、(4) 溶媒を投与し、上行大動脈径を経時的に測定し、12 週で安楽死させ、上行大動脈の組織学的解析及びタンパク質分析を施行した。また、*in vitro* 実験として、Fbn1C1039G/+マウスの上行大動脈由来の血管平滑筋細胞 (SMC) に対し、(1) MA、(2) PA、(3) 溶媒を投与後に TGF- β を投与し、細胞内のリン酸化 cRaf およびリン酸化 ERK1/2 の測定を行い、さらに培養上清の MMP-2 活性を測定した。

3 研究成果

in vivo 実験では、プラバスタチン群および MA 群は、溶媒対照群と比較してマルファン症候群のマウスモデルの上行動脈径の拡大を有意に減少させた (Fbn1 群; $1.77 \pm 0.05\text{mm}$ 、MA 群; $1.55 \pm 0.06\text{mm}$ 、 $P=0.011$ 、各 $n=8$) が、PA 群は大動脈径の拡大は減少しなかった ($1.81 \pm$

0.06 mm、 $P = 0.46$ 、 $n=8$)。組織学的所見として、溶媒対照群と比較して、プラバスタチン群と MA 群のマウスは有意にエラスチン断裂の減少を示した (グループあたり $n = 5$)。また、大動脈標本におけるリン酸化 c-Raf とリン酸化 ERK1 / 2 の両因子が、溶媒対照群と比較して MA 群で有意に減少した ($n = 4-5$)。また、タンパク質分析では、MMP (マトリックスメタロプロテイナーゼ) -2 活性はスタチン群で有意に減少した。*in vitro* 実験では Fbn1C1039G / + の平滑筋細胞では Ras 依存性 ERK シグナル伝達および上清中の MMP-2 活性は、MA 投与群で減少を認めた (各 $n = 5$)。

4 考察

本研究では、マルファン症候群モデルマウスにおけるスタチンの大動脈拡大抑制の機序を、*in vivo* および *in vitro* 実験により分子細胞レベル明らかにすることを目的とした。スタチンは血中コレステロール濃度への影響とは別に、炎症やマトリックスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinase :MMP) 活性の低下など、多面的な生物学的特性を有する。Ras のプレニル化経路を体系的に分析するために、マルファン症候群マウスモデルの動脈瘤予防に対するスタチンと、MA や PA による選択的イソプレノイド遮断の有効性を比較した。スタチンおよび MA で、動脈瘤形成抑制効果を認め、対照的に主にゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ 1 を阻害する PA は、GTPase Rap および Rab、および一部の Ras (K-Ras) に作用するが、動脈瘤形成抑制にはあまり効果的ではなく、Ras のファルネシル化が動脈瘤形成に関与している可能性が示唆された。またスタチン治療群のマルファンマウスの上行大動脈標本を解析するとエラスターゼ活性を有する MMP-2 の活性の低下を認めており、病理標本でのエラスチンの断裂の減少と一致した。マルファン症候群マウスの上行大動脈瘤に炎症細胞がほとんどいないことは多数報告され、スタチンが MMP もしくは SMC から直接生成される他のまだ測定されていないエラスターゼの減少を介して、代替メカニズムによって動脈瘤形成を減少させることを示唆している。タンパク質解析を行うことで ERK を介した動脈瘤形成の経路をさらに詳しく説明し、Ras 依存性の ERK 活性化が MMP の活性化を増加させることが示唆された。さらにプレニル化経路を分析し、最も効果的なファルネシルトランスフェラーゼ遮断薬と言われる MA は、マルファン症候群マウスの上行動脈瘤形成を抑制した。Ras シグナル伝達の遮断にはその物理的構造、複数のフィードバックループ、シグナル伝達の冗長性などの課題があり、ほとんどの正常細胞にとって重要な経路である。前に述べたようにスタチンには多面的な生物学的特性を有しており、lipid raft など、その他の機序が動脈瘤抑制と関与していることは否定できないが、Ras 依存性の ERK シグナルの抑制が MMP-2 を減少させ、動脈瘤形成を抑制したと考えられた。スタチンは有害な全身的影響 (免疫および細胞増殖) なしに、マルファン患者の TGF- β を介した Ras / ERK 活性化を低下させる無害な戦略である可能性があり、さらなる病態解明と臨床試験が必要と考える。

5 結論

プラバスタチンおよび MA 投与後の Fbn1C1039G / + マウスの大動脈瘤形成の抑制は、Ras 依存性 ERK シグナル伝達の減少と関連していた。結果、エラスターゼ活性のある MMP-2 の分泌を低下させ、動脈壁内のエラスチンの断裂を抑制し、動脈瘤形成を抑制する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

マルファン症候群はフィブリリン 1(FBN1)の変異に起因する遺伝性疾患であり、上行大動脈の大動脈瘤解離が予後規定因子となる。一定以上に悪化した大動脈瘤に対して手術治療が選択されるが、 β 遮断薬やアンギオテンシン受容体遮断薬が大動脈瘤拡大の予防薬として利用されている。コレステロール合成を抑制する HMG-CoA 還元酵素阻害薬（スタチン）にも大動脈瘤拡大予防効果が近年報告された。そこで、申請者はマルファン症候群モデルマウス（Fbn1C1039G/+）を用いてスタチンの効果およびその作用点の特定を試みた。

HMG-CoA 還元酵素の下流のフェルネシル化とグラニルグラニル化の抑制が動脈瘤拡大予防効果を担う可能性を想定し、それぞれの阻害薬であるマヌマイシン A(MA)とペリリルアルコール(PA)を用いて実験を行った。Fbn1C1039G/+に 4~8 週齢で上記薬剤を投与し、12 週齢で上行大動脈径計測・組織学的解析を施行した。プラバスタチンと MA は上行大動脈径拡大とエラスチン断裂を抑制したが、PA にその効果は確認されなかった。上行大動脈のリン酸化 c-Raf、リン酸化 ERK1/2 および MMP2 は MA で抑制された。Fbn1C1039G/+から調整した培養血管平滑筋細胞に TGF- β 添加後の c-Raf リン酸化、ERK1/2 リン酸化および MMP2 分泌も、MA によって抑制された。

以上の結果から、スタチンは主に血管平滑筋細胞の Ras フェルネシル化抑制を介した MMP2 分泌抑制によって、マルファン症候群の動脈瘤拡大を阻止すると申請者は結論した。

スタチンによるマルファン症候群の動脈瘤拡大阻止効果の作用点が Ras フェルネシル化抑制による MMP2 分泌抑制にあることを、阻害剤を用いた実験により解明した本研究は、新規性・独自性に優れる。

委員から以下の指摘があった：1) 血管平滑筋細胞の調整方法、2) in vitro 実験で野生型血管平滑筋細胞を用いなかった理由、3) MA や PA の用量設定の根拠、4) c-Raf と ERK1/2 は総タンパク量に比較したリン酸化量として解析したか、5) in vivo 実験では血清脂質や血圧も測定すべき、6) 動脈瘤における炎症細胞浸潤も評価すべき、7) スタチンには血管平滑筋細胞増殖抑制効果も報告されているため、作用点を MMP2 に限定してもよいか、8) lipid raft などステロール経路が関与した可能性、9) その他表現上の問題。

以上の指摘に対し適正に改訂がなされたため、博士論文として合格であると評価した。

試問の結果の要旨

・「論文審査の結果」に記したように、発表において、研究の背景・目的・方法・結果・考察についての必要十分な説明が申請者からあった。

・「論文審査の結果」に記したような質疑がなされた。

・審査員からの質疑についてその内容を正しく理解し、適切に応答できた。

・研究に関連する周辺領域の知識は十分である。

・審査員からの指摘に従って、論文も適正に改訂された。

・以上から、申請者の研究能力及び科学的素養・態度は学位に値するものと全員一致で評価した。