

Hypercholesterolemia induces regression in neointimal thickening due to apoptosis of vascular smooth muscle cells in the hamster endothelial injury model

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松田, 明久 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1643

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 366号	学位授与年月日	平成14年 9月20日
氏名	松田明久		
論文題目	<p>Hypercholesterolemia induces regression in neointimal thickening due to apoptosis of vascular smooth muscle cells in the hamster endothelial injury model (ハムスター血管内皮傷害モデルにおいて、高コレステロール血症は血管平滑筋細胞のアポトーシスにより、内膜肥厚の退縮をひき起こす)</p>		

博士(医学) 松田 明久

論文題目

Hypercholesterolemia induces regression in neointimal thickening due to apoptosis of vascular smooth muscle cells in the hamster endothelial injury model

(ハムスター血管内皮傷害モデルにおいて、高コレステロール血症は血管平滑筋細胞のアポトーシスにより、内膜肥厚の退縮をひき起こす)

論文の内容の要旨

[はじめに]

コレステロールおよびその酸化物は、血管平滑筋細胞に対しアポトーシスを誘導することが報告されている。動脈硬化病変でのプラークの不安定化の要因の一つとして、アポトーシスによる血管平滑筋細胞の退縮が示唆されている。そこで我々は、高コレステロール血症ハムスター(HCH)を用いて、血管内皮傷害後に起こる内膜肥厚において、高コレステロール血症が血管平滑筋細胞のアポトーシスを誘導し、内膜肥厚を退縮させるか検討した。

[材料ならびに方法]

1) 高コレステロール血症ハムスター血管内皮傷害モデルの作成

高コレステロール負荷食(10%コナツツオイル、0.4%コレステロール)を4週間前負荷した雄性シリアンハムスター(8週齢)の左大腿動脈に、静脈内投与したローズベンガルと緑色光(540nm)の照射による光増感反応を利用して血管内皮傷害を作成した。対照群は、コレステロール無負荷食を与えた正常コレステロールハムスター(NCH)を用いた。

2) 内膜肥厚の組織学的検討

血管内皮傷害後3日、1、2、3、4週に左大腿動脈を分取し、ホルマリン固定した。パラフィン連続切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色および抗体染色を用い、内膜肥厚の形成および血管内皮細胞の修復を経時的に検討した。また、凍結クリオスタット連続切片を作成し、オイルレッドO染色を用い、脂肪の沈着を検討した。

3) 細胞増殖活性の検討

血管内皮傷害後3日、1、2週にBrdUを腹腔内投与の後、左大腿動脈を分取し、カルノア固定を行った。パラフィン連続切片を作成し、細胞増殖キット(アマシャム社製)を用い、血管内膜および中膜の平滑筋細胞での細胞増殖活性を検討した。

4) アポトーシスの誘導の検討

血管内皮傷害後1-4週にホルマリン固定した左大腿動脈のパラフィン切片を作成し、TUNEL法およびPI染色により、血管内膜および中膜の平滑筋細胞におけるアポトーシスの誘導を検討した。

[結果]

1) 血漿コレステロール値

高コレステロール食を負荷することにより、高コレステロールハムスターの血漿中コレステロールは正常コレステロールハムスターの約3倍に増加した。

2) 内膜肥厚への影響

NCHの内膜肥厚は血管内皮傷害後3週まで徐々に増大した。一方、HCHの内膜肥厚は、2週まで

は増大し NCH との差は見られなかったが、3 週から徐々に退縮し、4 週には、NCH の 32% まで薄くなった。

HCH では内膜肥厚の退縮に伴い内膜における平滑筋細胞数の減少が認められたが、細胞密度に変化はなかった。また、HCH の内皮傷害部位では脂質の沈着を認めたが、非傷害部位および NCH における傷害部位では認められなかった。内皮傷害部位の内皮細胞の修復は、HCH と NCH の間ではほぼ同等であった。

3) 細胞増殖活性とアポトーシスの誘導

HCH と NCH の中膜および内膜での平滑筋細胞の細胞増殖活性は、いずれも血管内皮傷害後 1 週に最大となった。血管内皮傷害後 2 週までは、HCH と NCH の間で差は認められなかった。

NCH では、血管内皮傷害後 2 週に内膜および中膜の平滑筋細胞で、アポトーシスの誘導が認められた。一方、HCH では、アポトーシスの誘導がさらに強く認められた。また、TUNEL 陽性血管平滑筋細胞の割合は、NCH と比較して HCH では有意に増加していた。

[考察]

高コレステロール血症による内膜肥厚の退縮は、内皮傷害部位に沈着した脂質が血管平滑筋細胞にアポトーシスを誘導し、平滑筋細胞数が減少したためと思われる。高コレステロール血症下では、血管内皮傷害により平滑筋細胞のアポトーシスが誘導され、プラークの不安定化をひき起こす可能性が示唆された。

[結論]

今回用いたモデルでは、高コレステロール血症が平滑筋細胞のアポトーシス誘導を増強し、内膜肥厚を退縮させた。

論文審査の結果の要旨

[研究の背景]

動脈硬化の特徴的病変である粥状動脈硬化病変(プラーク)には安定なものとは不安定なものがある。不安定なプラークは、プラークの脂質コアを包む被膜が薄くなり脆弱になっているため、破裂して血栓を生じやすく、急性冠症候群などの原因と考えられている。プラークの被膜が薄くなる機序として、マクロファージの産生するマトロプロテアーゼにより被膜のコラーゲン線維が分解することや、マクロファージにより平滑筋細胞が障害される、あるいはアポトーシスを起こすなどにより、平滑筋細胞のコラーゲン産生が低下する、などが考えられている。しかし近年、コレステロールの酸化物が血管平滑筋細胞のアポトーシスを起こすことが証明され、プラークの被膜の脆弱化にも関与することが考えられるようになった。そこでこのことを証明するために、内膜肥厚モデルの 1 つである balloon injury による血管の内膜肥厚に対する高脂血症の影響が調べられた。しかし、このモデルにおいては、高脂血症は平滑筋細胞の増殖とアポトーシスを亢進することが証明されたが、肥厚した内膜の退縮は認められなかった。そこで申請者は、高コレステロール血症ハムスターを用いて、血管内皮細胞を傷害した後に起こる内膜肥厚に対して、高コレステロール血症が血管平滑筋細胞のアポトーシスを誘導し、内膜肥厚を退縮させることがあるかどうか検討した。

〔研究内容と評価〕

血管内皮傷害は色素ローズベンガルを静脈内投与後左大腿動脈の局所に緑色光を照射して作成した。血管内皮傷害後3日、1、2、3、4週に左大腿動脈を分取し、ヘマトキシリン・エオジン染色および抗体染色を用い、内膜肥厚の形成および血管内皮細胞の修復を検討した。また、オイルレッドO染色を用い、脂肪の沈着を調べた。bromodeoxyuridineを用いて、血管内膜および中膜での平滑筋細胞の細胞増殖活性を検討した。血管内膜および中膜の平滑筋細胞におけるアポトーシスの誘導はTUNEL法およびpropidium iodide染色により検討した。

正常ハムスターの内膜肥厚は血管内皮傷害後3週まで徐々に増大した。一方、高コレステロール血症ハムスター(HCH)の内膜肥厚は、2週までは増大し、正常ハムスターとの差は見られなかったが、3週から徐々に退縮し、4週には、正常ハムスターの32%まで薄くなった。HCHでは内膜肥厚の退縮に伴い内膜における平滑筋細胞数の減少が認められた。HCHの内皮傷害部位では、脂質の沈着を認めた。HCHと正常ハムスターの中膜および内膜での平滑筋細胞の細胞増殖活性は、HCHと正常ハムスターの間で差は認められなかった。正常ハムスターでは、血管内皮傷害後2週に内膜および中膜の平滑筋細胞で、アポトーシスの誘導が認められたが、HCHではアポトーシスの誘導がさらに強く認められた。

以上の結果は、高コレステロール血症が肥厚内膜の退縮を起こすこと、この現象には内皮傷害部位に沈着した脂質による血管平滑筋細胞のアポトーシスが関与することを示している。

審査委員会は、本研究が高コレステロール血症による肥厚内膜の退縮を *in situ* で初めて証明したこと、高脂血症治療薬の有する冠動脈疾患予防効果の作用機序を一部解明したこと、の2点に関して高く評価出来ると判断した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 血中 LDL-コレステロールの濃度はどの程度か
- 2) マクロファージの浸潤が見られないのは何故か
- 3) この内膜肥厚モデルはヒトのどのような内膜肥厚に対応するのか
- 4) アポトーシスが遅れて現れるのは何故か
- 5) このモデルで酸化 LDL は証明されているのか
- 6) 血管壁に沈着した LDL-コレステロールが血管平滑筋細胞の遊走・増殖を起こす要因にはならないか
- 7) 高コレステロール血症はどのような機序で平滑筋のアポトーシスを起こすのか
- 8) 内皮傷害4週間以後は内膜肥厚の状態はどのようになるか
- 9) 高コレステロール血症は血管内皮細胞には影響しないか
- 10) ヒトの粥状動脈硬化病変と本研究のモデルの肥厚との組織学的比較
- 11) 高コレステロール血症時の血小板凝集能の変化について
- 12) 中膜でのアポトーシスと肥厚について
- 13) 中膜での脂肪沈着について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 橋本久邦
副査 浦野哲盟 副査 渡邊裕司