

	みしま たけひと
氏 名	三島 健人
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博(医)第259号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名	プロスタグランディン E1 製剤による血管平滑筋細胞培養系における VEGF-A splice variant の発現パターン変化— Real-timePCR を用いたラット VEGF-A splice variant の定量化—
論文審査委員	主査 教授 林 純 一 副査 教授 木 南 凌 副査 教授 相 澤 義 房

博士論文の要旨

【緒言】閉塞性動脈硬化症は四肢の動脈が動脈硬化により狭窄あるいは閉塞し、虚血状態に至る疾患である。薬物療法として本邦では、プロスタグランディン E1(PGE1)製剤が頻用されるが、動脈硬化性病変の主役を演じる血管平滑筋細胞に対する影響は十分に知られていない。また、PGE1の肺での不活性化を抑える目的で lipid microsphere を用いたりポ化プロスタグランディン E1(lipoPGE1)が開発され閉塞性動脈硬化症の治療に使用されている。

血管内皮細胞増殖因子(VEGF-A)は血管の再生において重要な役割をするが、mRNA 翻訳時の splicing により Exon の結合に変化が起こることによっていくつかの variant が存在する。また、antagonist として働く抑制性 variant の存在も最近示されている。しかし、これらを分離して検出する抗体が存在しないことから、今回 real-time PCR を用い、VEGF-A mRNA splice variant (VEGF-A120, VEGF-A164, VEGF-A188)の定量法および抑制性 splice variant である VEGF-A164b の定量法を開発し、ラット血管平滑筋細胞の培養系に対する PGE1、lipoPGE1 およびその drug delivery system である lipid microsphere の作用について検討を行った。

【材料と方法】ラット胸部大動脈を採取し、血管平滑筋細胞を分離、培養した。48時間の serum starvation の後、血清刺激並びに血清に加え PGE1、lipoPGE1、あるいは lipid microsphere を添加した。添加後 2 時間後に細胞を採取し、洗浄後 TRizol を用い mRNA を抽出。RivaTraAce を用いて cDNA を合成。sense あるいは antisense primer の 3'末端 3~5 塩基が Exon の接合部をターゲットにするよう primer を設計。SYBR® Premix Ex Taq™、Light cycler を用い real-time PCR を行い、VEGF-A、VEGF-A120、VEGF-A164、VEGF-A188、及び VEGF-A164b の測定を行った。ラット肝臓、大動脈からの cDNA を鋳型にしてポジティブコントロールを作成し、スペクトロフォトメーターで PCR 産物の copy 数を定量、希釈列を作成し、real-time PCR のスタンダードとした。内部標準には β-actin を用いた。

【結果】VEGF-A の発現は、無血清の培養系に比べて血清刺激で優位に増加した。PGE1、lipoPGE1 および lipid microsphere 添加による差は認められなかった。VEGF-A164 の VEGF-A の中での割合は、約 30 から 50%であり、血清刺激や薬剤添加による差は認められなかった。VEGF-A164 は、血清刺激単独では無血清の場合に比し優位な増加を認めないが、PGE1 や lipoPGE1 を加えることで有意に増加した。VEGF-A164b に関しては、lipoPGE1 を添加した場合のみ増加が有意ではなかった。VEGF-A120 は lipoPGE1 添加時のみ有意に増加したが、VEGF-A188 はいずれの刺激でも変化が認められなかった。

【考察】 VEGF-A の総量が血管内皮細胞の増殖に影響を及ぼすのは当然だが、従来の VEGF-A mRNA 総量を定量する方法では、抑制性 variant を含んだ分画を定量していることになるので、機能的 VEGF-A splice variant の薬理作用を反映したものでない可能性がある。抑制性 variant(VEGF-A 164b) が、機能的 variant (VEGF-A 164) の 3 分の 1 程度に認められたが、このようなメカニズムが動脈硬化病巣の血管内皮細胞の増殖を抑え、内膜病変部の修復を抑制する作用があるのかもしれない。splice variant の発現に PGE1 と lipoPGE1 との間で違いがあることから、この 2 剤の血管平滑筋細胞に対する効果に違いがあることが示唆された。VEGF-A 164/164b 比に有意差を認めなかったが、この比を増加させることができれば、血管内皮の増殖を促進し、血管新生の一助となる可能性がある。また、これらの variant が生体内細胞内あるいは局所でどのように分布するのか、単なる濃度と比率というものがどういう意味をなすのかを今後 in-vivo の実験を含めた検討をしてゆきたい。今回の解析システムを発展させ、すべての splice variant に着目して検討し、VEGF-A splice variant の動態について詳細に検討されれば、血管再生や動脈硬化における VEGF-A の役割を更に詳細に検討することができると考えられる。

(論文審査の要旨)

閉塞性動脈硬化症の薬物治療に、プロスタグランジン E 1 (PGE1) 製剤の有効性が知られているが、血管平滑筋に対する作用は不明である。申請者らは、real-time PCR を用いて、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF-A) mRNA splice variant(120,164,188,164b)の定量法を開発し、ラット血管平滑筋細胞の培養系に対する PGE1, lipoPGE1, 及びその drug delivery system である lipid microsphere の作用について検討した。その結果、VEGF-A の発現は血清刺激により増加したが添加物の違いによる差異は認めなかった。このうち血管新生作用の強い VEGF-A164 は PGE1 や lipoPGE1 添加時に有意に増加した。VEGF-A 中の VEGF-A164 の割合は 30 から 50 %であった。また抑制性 variant である VEGF-A164b は、lipoPGE1 添加時のみ有意な増加を示さなかったことから、PGE1 と lipoPGE1 とで血管平滑筋に対する効果が異なると推測された。以上、ラット血管平滑筋培養系で、VEGF-A164/164b 比を増加させることが血管新生促進の一助となりうることを明らかにした点で、学位論文としての価値を認める。