

(第 12 号様式)

学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏 名 高橋 佳世

学位論文名

レクチン様酸化 LDL 受容体 (LOX-1) 遺伝子欠損は大動脈外膜における線維芽細胞及びコラーゲンの増殖を抑制し腹部大動脈瘤破裂を促進する

学位論文の要約

腹部大動脈瘤は、不可逆性に大動脈壁の局所的拡張を来す疾患であり、高齢者に多く発症する。瘤の破裂は高い致死率に關与することが知られているが、多くの場合無症候性に進行し、早期発見及び早期治療が重要だが、未だ瘤の拡大を抑制する有効な治療法は確立されていない。過去の報告から、腹部大動脈瘤の病態には、炎症が關与していることが知られており、病変部では、多くの場合動脈硬化が存在している。また、年齢、男性、喫煙、高血圧など、腹部大動脈瘤と動脈硬化の危険因子には、共通する因子が多く存在することが分かっており、腹部大動脈瘤の病態において動脈硬化が重要な因子である可能性が示唆されている。

近年、レクチン様酸化 LDL 受容体 (LOX-1) は、炎症や動脈硬化における重要な因子とされ、酸化 LDL と結合し、炎症細胞浸潤、様々なサイトカインの放出、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) の放出などを促進することが分かっている。これらの作用は、腹部大動脈瘤の病態とも類似しているが、腹部大動脈瘤発生における LOX-1 の役割についての報告はない。そこで、LOX-1 遺伝子欠損は炎症や動脈硬化を抑制することによって腹部大動脈瘤の発症率を低下させるとの仮説を立て、動脈硬化の実験モデルマウスであるアポリポタンパク E 欠損 (*Apoe*^{-/-}) マウスを使用したアンジオテンシン II (Ang II) 誘導性腹部大動脈瘤モデルを作成し検討を行った。この動物実験は、愛媛大学医学部の倫理委員会によって承認されている (承認番号 : 05-TA-49-16)。

8 週齢、雄性の *Apoe*^{-/-}; *Olr1*^{+/+} マウス、*Apoe*^{-/-} マウスに *Olr1* (LOX-1 をコードする遺伝子) をヘテロ欠損またはホモ欠損させたマウス (*Apoe*^{-/-}; *Olr1*^{+/-} マウス、*Apoe*^{-/-}; *Olr1*^{-/-} マウス) に Ang II 1.44 mg/kg/day を浸透圧ミニポンプで 4 週間持続投与する腹部大動脈瘤病態モデルを作成し、腹部大動脈瘤の発症率を比較した。*Apoe*^{-/-}; *Olr1*^{+/+} マウスでは、51.3% で腹部大動脈瘤が発生したが、*Apoe*^{-/-}; *Olr1*^{+/-} マウス、*Apoe*^{-/-}; *Olr1*^{-/-} マウスではそれぞれ 56.7%、55.6% の発症率であり、LOX-1 欠損により腹部大動脈瘤の発症は抑制されなかった ($p=0.89$)。しかし、腹部大動脈瘤の重症度を分類すると、*Apoe*^{-/-}; *Olr1*^{+/+} マウスで

は、軽症例（腎動脈上部のみが拡張）が約半分を占めていたのに対し、*Apoe*^{-/-};*Olr1*^{-/-} マウスでは、腎動脈上部が著明にリモデリング、あるいは瘤が複数存在する重症例及び大動脈瘤破裂による死亡例を多く認めた（*Apoe*^{-/-};*Olr1*^{+/+} マウス死亡率 2.6%, *Apoe*^{-/-};*Olr1*^{-/-} マウス死亡率 16.7%, $p=0.04$ ）。腹部大動脈瘤における動脈硬化の関与について検討するため、採取した大動脈を長軸方向に切開し、脂質性プラークを Oil Red O で赤色に染色した。大動脈全体における染色領域の割合は、*Apoe*^{-/-};*Olr1*^{+/+} マウス、*Apoe*^{-/-};*Olr1*^{-/-} マウスいずれの群においても、約 25% であり、両群間で有意差を認めなかった。一方、腹部大動脈瘤病変部位では、両群とも全体の 80% 以上の領域に染色を認めた。次に腹部大動脈瘤の発症・進展に関与していると報告されている MMP-2 及び MMP-9 活性を、ゼラチンザイモグラフィを用いて評価した。*Apoe*^{-/-};*Olr1*^{+/+} マウス、*Apoe*^{-/-};*Olr1*^{-/-} マウスそれぞれ 3 匹ずつ、生理食塩水投与したマウスあるいは Ang II を 4 週間持続投与し腹部大動脈瘤を発症したマウスから腹部大動脈を採取し、比較検討を行った。Pro MMP-2 及び MMP-2 活性は、2 群間で差を認めなかったが、*Apoe*^{-/-};*Olr1*^{-/-} マウスの瘤サンプルの pro MMP-9 活性は、*Apoe*^{-/-};*Olr1*^{+/+} マウスと比較し有意な低下を認めた。さらに、組織学的検討では、*Apoe*^{-/-};*Olr1*^{-/-} マウスの腹部大動脈瘤病変部位において、外膜のコラーゲン増生が *Apoe*^{-/-};*Olr1*^{+/+} マウスと比較し低下し、外膜の厚さが有意に低下していた（*Apoe*^{-/-};*Olr1*^{+/+} マウス $144.4 \pm 57.1 \mu\text{m}$, *Apoe*^{-/-};*Olr1*^{-/-} マウス $90.6 \pm 27.6 \mu\text{m}$, $p=0.02$ ）。腹部大動脈病変部位における免疫染色では、線維芽細胞を標識する S100A4 陽性領域は、*Apoe*^{-/-};*Olr1*^{+/+} マウスと比較し、*Apoe*^{-/-};*Olr1*^{-/-} マウスで有意に低下していた（*Apoe*^{-/-};*Olr1*^{+/+} マウス $22.9 \pm 4.2\%$, *Apoe*^{-/-};*Olr1*^{-/-} マウス $17.9 \pm 3.4\%$, $p=0.04$ ）。さらに、血管のリモデリングや線維化に関与するとされる筋線維芽細胞を α 平滑筋アクチン抗体で標識し評価したところ、*Apoe*^{-/-};*Olr1*^{-/-} マウス（ $15.2 \pm 7.5\%$ ）で有意な発現低下を認めた（*Apoe*^{-/-};*Olr1*^{+/+} マウス $43.3 \pm 13.2\%$, $p=0.0008$ ）。*Apoe*^{-/-};*Olr1*^{-/-} マウスの腹部大動脈瘤の重症化に大動脈外膜の線維芽細胞が関与している可能性が示唆されたため、*Apoe*^{-/-};*Olr1*^{+/+} マウス及び *Apoe*^{-/-};*Olr1*^{-/-} マウスの腹部大動脈から線維芽細胞を採取培養し、その増殖率を *in vitro* 実験系で比較した。いずれの線維芽細胞も時間経過と共に持続的増殖が認められたが、培養線維芽細胞に Ang II 刺激（0、10、100、1000 nM）を行うと、*Apoe*^{-/-};*Olr1*^{+/+} マウス由来線維芽細胞では濃度依存的に増殖を認めたのに対し、*Apoe*^{-/-};*Olr1*^{-/-} マウス由来線維芽細胞では増殖能の低下を認めた。

以上の結果より、LOX-1 遺伝子欠損は、大動脈外膜での線維芽細胞の増殖及びコラーゲン増生を抑制することにより、腹部大動脈瘤を重症化させることが示唆された。今後、腹部大動脈瘤の病態メカニズムの解明及び新しい治療の発展に寄与することが期待される。なお、この学位論文の内容は、以下の原著論文にすでに公表済みである。

主論文 : Takahashi K, Aono J, et al. LOX-1 deficiency increases ruptured abdominal aortic aneurysm via thinning of adventitial collagen. Hypertension Research (2022). DOI: 10.1038 / s41440-022-01093-x.