

論文要旨

Deficiency of Clusterin Inhibits Neointimal Hyperplasia After Vascular Injury

〔 clusterin 欠損は血管傷害後の新生内膜肥厚を抑制する
— *in vivo* および *in vitro* における検討 — 〕

白 澤 尚 宏

【序論および目的】

clusterin は、様々な組織に発現し、血漿、尿、乳汁、精液、脳脊髄液などのほとんどの体液に認められ、腫瘍細胞の増殖、アポトーシス、細胞周期制御、DNA 修復、組織のリモデリング、脂質輸送、膜再生、補体系などにも関与している。また、心臓、脳、肝臓、腎臓、乳腺、網膜などの様々な組織において多種のストレスにより、clusterin の mRNA や蛋白発現が増加することが報告されている。以前、我々はバルーン傷害後の血管の中膜や新生内膜に clusterin が発現するということを報告した。本研究の目的は、血管傷害後の新生内膜における clusterin の作用を検討することである。

【材料および方法】

野生型マウス (wild-type) と clusterin 欠損マウス (clusterin-KO) の大腿動脈にポリエチレンカフを留置し、4 週間後に血管を採取し、新生内膜面積/中膜面積比 (I/M ratio) を比較し、p53、ならびにアポトーシスの下流にある activated caspase-3 と細胞周期停止の指標となる p21 の免疫染色を行い、新生内膜肥厚抑制の機序を検討した。さらに、それぞれの大動脈中膜から血管平滑筋細胞 (VSMC) を分離、培養を行い、それぞれの VSMC に伸展刺激を加え、VSMC の増殖能、ウエスタンブロット法で p53 と p21 の発現の比較、およびフローサイトメトリー法を用いて細胞周期解析を行った。また、clusterin に対する short-interfering RNA (clusterin-siRNA) あるいは control (control-siRNA) をラット VSMC に transfect した後、伸展刺激を加え、平滑筋細胞の増殖能や p53、p21 の発現を比較検討した。

【結 果】

ポリエチレンカフ留置 4 週後の I/M ratio は clusterin-KO では wild-type に比較し、有意に低値を示した (clusterin-KO vs. wild-type: $25 \pm 10\%$ vs. $15 \pm 9\%$, $P < 0.01$)。免疫染色では、wild-type に比較し clusterin-KO において p53 と p21 の核への集積を多く認め、clusterin-KO では G1 期停止により新生内膜肥厚が抑制されることが示された。

次に、それぞれの大動脈中膜から抽出、培養を行った VSMC に伸展刺激を加え、増殖

能を比較したところ、clusterin-KO の VSMC は、wild-type の VSMC に比較し、増殖が抑制された。ウエスタンブロット法による蛋白発現を比較したところ、clusterin-KO の VSMC は、wild-type の VSMC に比較し p53 と p21 の発現が亢進しており、また、フローサイトメトリー法による細胞周期解析において、clusterin-KO の VSMC は G1 期停止をきたしていることが示された。

さらに、ラット VSMC に clusterin-siRNA を transfect した後、伸展刺激を加え、増殖能を比較したところ、clusterin-siRNA を transfect した細胞において、増殖能は抑制された。また、clusterin-siRNA を transfect した細胞では、ウエスタンブロット法において p53 と p21 の発現が亢進していることが示され、G1 期停止をきたしていることが示された。

【考察】

今回の研究において我々はマウスの大腿動脈にポリエチレンカフを留置し、clusterin-KO と wild-type で比較したところ、clusterin-KO において新生内膜肥厚が抑制され、新生内膜には p53 の発現を多く認めた。また、VSMC に伸展刺激を加え、比較したところ、clusterin-KO VSMC や clusterin-siRNA を transfect したラット VSMC に p53 の発現を多く認めた。p53 は clusterin の転写を抑制するとの報告があるが、今回の我々の研究においては、clusterin 発現を抑制したところ p53 の発現が亢進していた。このことから p53 も clusterin も組織の傷害により発現が増加するが、clusterin の発現が抑制された状態では、組織傷害を受けると代償性に p53 の発現が亢進すると考えられた。

p53 は腫瘍増殖抑制因子であり、細胞へのストレス等にて DNA に損傷が加わると発現し、G1 期停止やアポトーシスを誘導する。p53 の作用として、G1 期停止が誘導されるか、あるいはアポトーシスが誘導されるかは、その損傷の大きさや程度により変わる。今回の *in vivo* におけるカフ傷害や *in vitro* における VSMC の伸展刺激は、通常であれば clusterin が発現し VSMC が増殖する刺激であるが、clusterin 発現が抑制された今回の実験状況では、細胞へのストレスで p53 が発現し、傷害の程度が弱かったためにアポトーシスの誘導よりも p21 の発現が誘導され、G1 期停止になったと考えられる。

【結論】

カフ留置傷害血管や伸展刺激において clusterin 発現の抑制は、血管平滑筋細胞の増殖を抑え、p53 と p21 の発現を介して G1 期停止をきたしたと考えられた。したがって、臨床においては、clusterin が血管形成術後の再狭窄抑制の分子ターゲットとなることが示唆された。

論文審査の要旨

報告番号	医研第	690	号	氏名	白澤 尚宏
審査委員	主査	松山 隆美			
	副査	小澤 政之		谷本 昭英	

Deficiency of Clusterin Inhibits Neointimal Hyperplasia After Vascular Injury

clusterin 欠損は血管傷害後の新生内膜肥厚を抑制する
— *in vivo* および *in vitro* における検討 —

clusterin は、様々な組織に発現し、血漿、尿、乳汁、精液、脳脊髄液などほとんどの体液に認められ、腫瘍細胞の増殖、アポトーシス、細胞周期制御、DNA 修復、組織のリモデリング、脂質輸送、膜再生、補体系などに関与している蛋白である。心臓、脳、肝臓、腎臓、乳腺、網膜などの様々な組織において多種のストレスにより、clusterin の mRNA や蛋白発現が増加することや、バルーン傷害後の血管の中膜や新生内膜に clusterin が発現するという報告がある。本研究では、血管傷害後の新生内膜における clusterin の作用をノックアウトマウスや培養細胞を用い検討している。

まず、野生型マウス (wild-type) と clusterin 欠損マウス (clusterin-KO) の大腿動脈にポリエチレンカフを留置し、4 週間後に血管を採取し、新生内膜面積/中膜面積比(I/M ratio)を比較し、p53 ならびにアポトーシスの下流にある activated caspase-3 と細胞周期停止の指標となる p21 の免疫染色を行い、新生内膜肥厚抑制の機序を検討している。

次に、wild-type と clusterin-KO それぞれの大動脈中膜から血管平滑筋細胞(VSMC)を分離、培養を行い、それぞれの VSMC に伸展刺激を加え、VSMC の増殖能やウエスタンブロット法で p53 と p21 の発現の比較、およびフローサイトメトリー法を用いた細胞周期解析を行い、比較検討している。

さらに、clusterin に対する short-interfering RNA (clusterin-siRNA) あるいは control-siRNA をラット VSMC に transfect し、伸展刺激を加え、増殖能や p53、p21 の発現を比較検討している。

本研究で得られた新知見は以下の 3 点である。

1. ポリエチレンカフ留置 4 週後の I/M ratio は clusterin-KO では wild-type に比較し、有意に低値を示し、免疫染色では wild-type に比較し clusterin-KO において p53 と p21 の核への集積を多く認め、clusterin-KO では G1 期停止により新生内膜肥厚が抑制されることが示された。
2. clusterin-KO の VSMC は、wild-type の VSMC に比較し、伸展刺激による増殖が抑制された。また、ウエスタンブロット法による蛋白発現の比較で、clusterin-KO の VSMC は、wild-type の VSMC に比較し p53 と p21 の発現が亢進していた。さらに、フローサイトメトリー法により細胞周期解析を行い、clusterin-KO の VSMC では G1 期停止をきたすことが示された。
3. clusterin-siRNA を入れた細胞において、伸展刺激による VSMC の増殖能は抑制され、ウエスタンブロット法による蛋白発現の比較で clusterin-siRNA を transfect した細胞では、p53 と p21 の発現が亢進していることが示され、G1 期停止をきたしていることが示された。

以上により、カフ留置傷害血管や伸展刺激において clusterin 発現の抑制は、血管平滑筋細胞の増殖を抑えることが証明され、その機序として、p53 と p21 の発現を介して G1 期停止をきたすことが示唆された。

よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 690 号		氏名	白澤 尚宏
審査委員	主査	松山 隆美		
	副査	小澤 政之		谷本 昭英
<p>主査および副査の3名は、平成23年2月18日、学位請求者 白澤 尚宏君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) カフ留置時に外膜は剥離したか？ (回答) 動脈と静脈を丁寧に剥離し、動脈のみにカフを留置しただけであり、外膜は剥離してはいません。</p> <p>質問2) 血管障害モデルとしてカフ傷害を選んだ理由は？ (回答) 今回の実験ではマウスを使用しており、個体が小さいこともあり、バルーン傷害は行えませんでした。血管結紮法は、血栓が多いことやどの部位で傷害を評価するかという問題もあり採用しませんでした。カフ傷害であれば、カフを留置した部分で評価すればよいことから、本研究ではカフ傷害を用いました。</p> <p>質問3) カフ傷害を評価する時に、カフ留置血管の近位側、中央、遠位側の3ヶ所だけでいいのか？ (回答) カフ傷害を評価する方法は、他の論文を見ても連続5切片であったりとか、一致していません。我々はカフを留置し、傷害を受けた血管を全体として捉えるために、一番狭窄の強い部分だけでなく、両端と中央の3ヶ所で評価を行いました。</p> <p>質問4) 培養系の実験は大動脈中膜由来の血管平滑筋細胞を使用しているが、内膜の血管平滑筋細胞と一緒に考えてよいのか？ (回答) 今回、新生内膜由来の血管平滑筋を培養系には使用はしていません。しかし、中膜の血管平滑筋細胞は、もともと収縮型ですが、培養系へ持ってきた段階で、合成型へ形質変換しており、内膜の血管平滑筋細胞と一緒に考えてよいと思います。</p> <p>質問5) 今後 apoE ノックアウトマウス等の高脂血症モデルマウスとのダブルノックアウトマウスを作って、粥腫モデルでは、どうなるか検討する予定はないのか？ (回答) apoE ノックアウトマウスと clusterin ノックアウトマウスのダブルノックアウトマウスを作製し、動脈硬化を上行大動脈基部レベルで定量評価し、ダブルノックアウトマウスで動脈硬化巣が縮小するという報告を昨年、我々のグループが論文発表しました。</p> <p>質問6) 内膜を構成する平滑筋が中膜からの遊走や、骨髄幹細胞が関与するということだが、骨髄移植をしたモデルでは検討していないのか？ (回答) 今回は行っておりません。今後検討したいと思います。</p> <p>質問7) clusterin はどのように作用していると考えているか？細胞外に分泌して作用しているのか？ (回答) clusterin には分泌型と核型の2種類あります。今回の実験では傷害を加えた局所での反応を見ており、血液中に分泌された clusterin を見ている訳ではないので、核型 clusterin の作用と考えられます。</p> <p>質問8) 培地へ clusterin は分泌されていなかったか？ (回答) 今回、培養液中の clusterin の濃度測定は行なっていません。</p> <p>質問9) 外から clusterin を加えたらどうなるか？clusterin に対する中和抗体を使えば、siRNA を使わずにできたのでは？</p>				

(回答) 外から clusterin を投与することは、分泌型の clusterin の作用を検討することとなり、我々が検討している核型とは異なり、違う結果が出る可能性もあります。従って抗体を使って clusterin を抑制する実験ではなく、細胞内の clusterin の発現を抑制する siRNA を用いました。

質問 10) clusterin は HDL の構成蛋白であるが、clusterin 欠損マウスの血中 HDL は、野生型と差がない理由は？

(回答) HDL の構成成分である clusterin と血管傷害で発現する clusterin は、違うタイプの clusterin と考えています。血管傷害で発現する clusterin は核型の clusterin であり、分泌型の HDL へは影響を与えなかったと考えています。

質問 11) 実験で使用した siRNA は分泌型と核型いずれも抑制する siRNA なのか？

(回答) siRNA は核型の clusterin を抑制していると考えられ、分泌型には影響していない可能性があります。

質問 12) clusterin 欠損マウスは、野生型に比較し、癌が起こりにくいということはないのか？

(回答) 発癌に関しましては、はっきりとはわかりませんが、野生型と比較して、clusterin 欠損マウスのフェノタイプに大きな異常は見られませんでした。

質問 13) clusterin 欠損では代償的に p53 発現が増えるということだが、p53 の mutation を起こしたような場合には clusterin が増えるというようなことがあるのか？

(回答) 乳癌や前立腺癌の cell line で p53 の mutation があるものは、clusterin 発現が増加しているという報告もあります。

質問 14) clusterin は平滑筋では新生内膜に発現しているとのことだが、他の細胞、例えば fibroblast などでは clusterin は、どのように作用するのか。

(回答) fibroblast での増殖に関する報告はありませんが、内皮細胞では増殖促進あるいは抑制するという相反する結果の報告があります。

質問 15) P777, 右段 1 行目の“there was a significant progression to S and G2/M phases in clusterin-KO VSMCs compared with wild-type VSMCs 24h after stretching,” の表現は、正しいか？

(回答) ご指摘の通り、“to S and G2/M phases”ではなく“to G1 phase”の間違いでした。

質問 16) 伸展刺激は実験でよく用いられる実験なのか？

(回答) 伸展刺激は、血圧に対する血管平滑筋細胞の反応や心拍動に対する培養心筋細胞の反応を見るために、よく使われますが、再狭窄モデルとして使われているものは少ないです。

質問 17) PCI 後の再狭窄モデルと考えるのであれば、培養系では伸展刺激よりも炎症性サイトカインなどで刺激した方がよかったのでは？

(回答) 今回論文には提示しておりませんが、siRNA を細胞内導入後、TNF α やアンジオテンシン II で刺激して Western blot 法で検討しましたが、伸展刺激と同様の結果が得られました。

質問 18) shear stress による clusterin の発現は検討していないのか？

(回答) 今回の実験では検討しておりません。今後検討したいと思います。

質問 19) siRNA などを治療に実際に使った例はあるのか？

(回答) siRNA による治療は、まだ報告がありませんが、癌に対し clusterin に対する antisense を使った治療の臨床試験が行われています。しかし antisense の具体的な投与法に関しましては詳細は分かりません。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた