

論 文 要 旨

Waon Therapy Upregulates Hsp90 and Leads to Angiogenesis Through the Akt-eNOS Pathway in Mouse Hindlimb Ischemia

和温療法は、Heat Shock Protein 90 発現を増強し、Akt/eNOS 系を活性化させることで血管新生を促す

— 下肢虚血モデルマウスを用いた検討 —

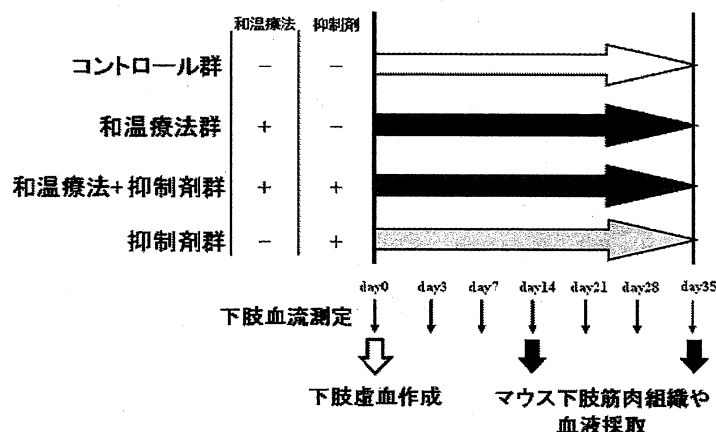
宮 内 孝 浩

【序論および目的】

我々は和温療法が閉塞性動脈硬化症(ASO)患者の症状や血流を改善し(Tei C, et al. *J Am Coll Cardiol* 2007)、また下肢虚血マウスを用いた検討で eNOS(endothelial nitric oxide)の発現増強を介して血管新生を促すことを報告した(Akasaki Y, et al. *Circ J* 2006)。近年、熱刺激で誘導される分子シャペロン Heat Shock Protein (Hsp)の一つである Hsp90 が、Akt のリン酸化を介して eNOS を活性化させることが報告されている。本研究の目的は、和温療法の血管新生作用における Hsp90/Akt/eNOS シグナル伝達の関与について検討することである。

【材料および方法】

易動脈硬化形成モデル動物であるアポ蛋白 E 欠損マウスの左大腿動脈を結紮除去し下肢虚血モデルを作成した。モデルマウスをコントロール群、和温療法群、Hsp90 抑制剤(Geldanamycin) 投与群、抑制剤投与+和温療法群の4群に分けた。



和温療法施行群に対して1日1回連日5週間、動物実験用乾式遠赤外線サウナ装置を用いて和温療法を施行した。全群の下肢の血流をレーザードプラを用いて測定した。ま

た、実験開始2週間及び5週間後において、全群における下肢筋肉組織を採取し、免疫組織化学染色法を用いて Hsp90 の発現とその局在を検討し、さらに血管密度を比較検討した。CD31 及び Tie2, NG2, α -SMA の免疫蛍光二重染色を用いて、新生血管の成熟度を評価した。更に Western blot 法にて下肢筋肉の HSP90、Akt、リン酸化 Akt (p-Akt)、eNOS、リン酸化 eNOS(p-eNOS) の発現を検討した。

【結果】

開始14日、35日ともにコントロール群に比較して和温療法群では、筋肉組織内に存在する動脈の血管内皮において、Hsp90 蛋白発現が増加していた。尚、その他の Hsp 蛋白 (Hsp70, Hsp60, Hsp32, Hsp27) の増加は認められなかった。コントロール群と比較し、和温療法群で p-Akt, eNOS, p-eNOS 蛋白の発現が血管内皮において増強しており、さらに血中 Nitric Oxide (NO) の産生の増加が認められた。このことから、和温療法が、Hsp90 発現増強を介して、その下流にあたる Akt 及び eNOS を活性化させたことが示唆された。

Hsp90/Akt/eNOS シグナル系の関与をさらに検討することを目的として、HSP90 が Akt を活性化する系を阻害する Geldanamycin の投与による阻害実験を行った。和温療法による p-Akt, eNOS, p-eNOS 発現増強効果は、Geldanamycin 投与により消失した。レーザードプラ計による測定では、コントロール群と比較し和温療法群で、虚血肢/非虚血肢血流比が有意に改善していた。この血流の改善効果も Geldanamycin の投与により消失した。組織の血管密度もレーザードプラの結果と同様に、和温療法群ではコントロール群に比較して増加していたが、Geldanamycin の投与によりその効果が消失した。

血管内皮を覆う壁細胞や平滑筋細胞のマーカーである Tie2, NG2, α -SMA と血管内皮のマーカーである CD31 の蛍光二重染色による検討では、これらが近接して認められたことから、和温療法により促進された新生血管は成熟した血管であることが確認された。

【考察】

本研究に於いて、和温療法により Hsp90 蛋白発現が増加し、その下流における Akt/eNOS シグナルが活性化し NO の産生が増加した。NO は endothelial progenitor cell (EPC) を骨髄から誘導することが報告されており、我々は既に和温療法が ASO 患者において EPC を誘導することを臨床的に確認していることから (Shinsato T, et al. *J Cardiol* 2010)、和温療法は Hsp90/Akt/eNOS シグナル活性化を介した NO 産生増加により EPC を誘導し、結果血管新生を促すことが示唆された。

近年 ASO 患者に対して VEGF 導入を用いた遺伝子治療や骨髄細胞の筋組織内注射を用いた細胞治療などの有効性が報告されているが、新生された血管の成熟度がしばしば問題となっている。今回の検討では和温療法により新生される血管が成熟していることも確認された。

【結論】

和温療法は、HSP90/Akt/eNOS シグナル伝達を介して血管新生効果を発現し、成熟した血管を増加させることが示唆された。

(Circulation Journal 2012年 掲載予定)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 189 号		学位申請者	宮内孝浩
審査委員	主査	川平 和美	学位	博士 (医学)
	副査	松山 隆美	副査	西尾 善彦
	副査	小賤 健一郎	副査	竹中 俊宏

Waon Therapy Upregulates Hsp90 and Leads to Angiogenesis Through the Akt-eNOS Pathway in Mouse Hindlimb Ischemia

和温療法は、下肢虚血モデルマウスにおいて Heat Shock Protein 90 発現を増強し、Akt/eNOS 系を活性化させることで血管新生を促す

和温療法が末梢動脈疾患患者において、下肢の疼痛や歩行距離、下肢の血流を改善させる事、虚血性皮膚潰瘍を治癒させる事が報告され、基礎実験においても下肢虚血モデルマウスで和温療法が内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の発現を亢進させ、一酸化窒素 (NO) を増加させ血管新生を惹起することが報告されている。また、熱刺激で誘導される Heat Shock Protein (Hsp) の一つである Hsp90 が、Akt のリン酸化を介して eNOS を活性化させることが報告されている。そこで学位申請者は和温療法の血管新生作用における Hsp90/Akt/eNOS シグナル伝達の関与について検討した。アポリポプロテイン E (apo E) 欠損マウスは高脂血症を呈し、血管新生が起りにくい。本研究では、このマウスに下肢虚血モデルを作成し、マウスをコントロール群、和温療法群、和温療法+Hsp90 阻害剤投与群と Hsp90 阻害剤投与群に分けた。和温療法群は、遠赤外線乾式サウナ装置で 41°C・15 分間加温後、34°C・20 分間の保温を追加し、これらを 1 日 1 回、5 週間施行した。また Hsp90 阻害剤群ではゲルダナマイシンを腹腔内投与した。虚血作成後 35 日まで経時的にレーザードプラ計を用い下肢血流を測定し、ウェスタンブロット法で下肢における Hsp90, Akt, リン酸化 Akt (p-Akt), eNOS, リン酸化 eNOS (p-eNOS) の発現を検討し、その局在を免疫組織学染色で確認した。虚血下肢における新生血管を評価するために、血管内皮を CD31 で免疫組織化学染色し血管密度を求めた。さらに、血管内皮を覆う壁細胞や平滑筋細胞のマーカーである Tie2, NG2, α -SMA と血管内皮のマーカーである CD31 の蛍光二重染色による検討をおこなった。

その結果、以下の知見が明らかになった。

1. 和温療法により Hsp90 蛋白発現が増加し、その下流における Akt/eNOS シグナルが活性化し NO の産生が増加した。
2. 和温療法による蛋白発現や NO の産生は Hsp90 の阻害剤を投与することにより、発現が抑制された。
3. 和温療法により虚血下肢の血流改善や血管密度の増加がみられたが、これも Hsp90 阻害剤の投与により抑制された。
4. 和温療法による新生血管は成熟した血管であることが示唆された。

以上の結果から、和温療法は HSP90/Akt/eNOS シグナル伝達を介して血管新生効果を発現し、成熟した血管を増加させることが示唆された。

本研究は、和温療法による血管新生の eNOS シグナルカスケードを介した分子機序を解明し、新たな知見を提供した。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	総研第 189 号	学位申請者	宮内 孝浩
審査委員	主査	川平 和美	学位 博士 (医学)
	副査	松山 隆美	副査 西尾 善彦
	副査	小賤 健一郎	副査 竹中 俊宏
<p>主査および副査の5名は、平成24年4月5日、学位申請者 宮内孝浩 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、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) 以前の報告で eNOS が増えることをみた実験で用いたマウスの種類は何か？ (回答) 今回と同様のアポリポプロテイン E 欠損(ApoE KO)マウスである。</p> <p>質問2) ApoE KO マウスの雄を用いているが、雌のマウスではだめか？ (回答) 雌で実験を行ってもよいと考えるが、Hsp90 がステロイドレセプターに関与することなども報告されているので、実験は雄雌のいずれかに統一して行う必要がある。</p> <p>質問3) なぜ ApoE KO マウスを用いて実験をしたのか、ApoE KO での実験が結果がしやすいのか？ (回答) 野生型マウスを用いると血流の改善までの期間が短く、レーザードプラによる虚血改善効果の評価が困難なために血流改善が遅延する ApoE KO マウスを用いた。</p> <p>質問4) 組織のサンプリングは、血管だけ採取するのか、あるいは組織を一塊として採取したか？ (回答) 組織を一塊として採取した。</p> <p>質問5) Hsp90 阻害剤のマウスへ投与はどのタイミングで行ったのか？ (回答) 虚血作成直後は、マウスが弱っているため、虚血作成の翌日から連日投与した。</p> <p>質問6) Hsp90 の阻害剤の半減期はどれくらいか、また連日投与したのか？ (回答) 半減期は約 24 時間で、連日腹腔内注射した。</p> <p>質問7) 免疫化学染色において CD31 抗体を monoclonal と polyclonal に分けた理由は？ (回答) 2 次抗体との組み合わせでこのように変えた。</p> <p>質問8) 内皮細胞のマーカーとして Tie2 を染色しているようだが、Tie2 は pericyte にも存在するのではないか。 (回答) 御指摘のとおり Tie2 は pericyte にも存在する。</p> <p>質問9) Fig2 についてだが、虚血のない部位では Hsp90 は増えていないのか？ (回答) 非虚血肢について Hsp90 はコントロール群より和温療法群が、有意差をもって増えていた。しかし、非虚血肢と虚血肢を合わせて 4 群間で比較すると非虚血肢での増加の効果は有意には至らなかった。</p> <p>質問10) Fig2 の day35 のデータに於いて虚血の有無でどうしてこれほど Hsp90 発現に差がでるのか？逆に和温療法に虚血が存在することでさらに Hsp90 が増えると考えられるのか？ (回答) day35 の非虚血のグラフのみで評価すれば、Hsp90 の発現は day14 と同等に有意差をもってコントロール群より和温療法群が増強している。day14 の虚血肢の Hsp90 発現グラフの結果を差し引いて考えると、虚血肢における day35 の増加した分は和温療法による効果であると考えられる。</p> <p>質問11) Fig3 で Hsp90 以外の Hsp が増えない理由は何か？ (回答) われわれのこれまでの研究の結果からは、病態や組織が違っていると増加する Hsp も異なっている、また今回は day35 のみの評価だが day14 で評価すればその他の Hsp も増加していた可能性はある。</p>			

最終試験の結果の要旨

質問 12) Fig4 についてだが、p-Akt や p-eNOS が非虚血群でも増加しているが、非虚血における Hsp90 の阻害剤の効果はどうだったのか？

(回答) 非虚血肢における阻害剤の効果は今回検討していない、今後検討したいと考えている。

質問 13) カスケードにおいて、Hsp90 の効果で eNOS 自体も増えるのか？ Fig4 の day14 では eNOS がかなり増えているように見える。

(回答) アクチン補正にて eNOS を評価したところ和温療法により eNOS 自体も増えていた。今回の研究では、Hsp90 によって eNOS がリン酸化活性化をすることを中心に評価し、p-eNOS/eNOS の増加を認めた。

質問 14) Fig4.B の day35 で、非虚血肢と虚血肢における p-Akt は、虚血肢の和温療法群が、非虚血肢の和温療法群より下がっているのはなぜか。

(回答) 虚血肢に於いては、筋肉と血管を一塊にして採取しており虚血による筋肉の p-Akt の低下が関与している可能性はあると考える。

質問 15) Fig5 で染色性についてコントロール群と和温療法群には差はないのか？

(回答) 条件を同じにして同時に染色を行っているが、発現の定量評価は行っていない。

質問 16) 実験は 35 日間施行していますが、人間ではどれくらいで改善するか？

(回答) 10 週くらいで改善する。

質問 17) Hsp90 には kinase activity があるのか？、直接リン酸化しているのか？

(回答) Hsp90 に kinase activity はなく、Akt を直接リン酸化していない。Hsp90 がシャペロンとして働くことで、PDK1 を介しての Akt のリン酸化を起こす。Hsp90 を阻害すると、シャペロン機能が阻害され、PP2A 系が働き、Akt のリン酸化が阻害される。

質問 18) Akt の活性化に insulin も関与するが Hsp90 阻害剤は insulin signal を抑制するか？

(回答) ゲルダナマイシンは Hsp90 の特異的阻害剤で、Hsp90 を抑制し血管新生を阻害する抗ガン剤として開発されており、insulin signal の抑制はないと考える。

質問 19) 和温療法で全身の血管新生が起こるわけではないのか？

(回答) 組織が虚血に陥っている部位に、和温療法による血管新生が起こると考えている。

質問 20) 今回の研究結果は VEGF は介していないとのことだったが、別の増殖因子でこの系が動くのか？

(回答) 先の報告ではコントロール群と和温療法群に VEGF の発現で有意差はなかったが、虚血による VEGF の存在がスイッチとなり、和温療法による血管新生のカスケードにつながるものと考えられる。

質問 21) 運動療法で Hsp が増えると言われているが、和温療法でも同じか？

(回答) 論文では運動などによる Hsp の増加の報告もある。和温療法でも Hsp の上昇を認め同等の効果があると考えられる。和温療法は運動ができない患者でも施行が可能なので運動療法の出来ない患者への option の一つとしては良いのではないかと考える。運動療法や薬物治療、和温療法など組み合わせて行うことにより治療効果が上がるものと考えられる。

質問 22) 血管内皮細胞の in vitro の系でメカニズムの解明などやっていないか？

(回答) マイルド加温である和温療法の状況を in vitro で再現することは困難であり、in vitro の検討は出来ていない。条件付けを確立しなければならない。今後検討してみたいと考える。

質問 23) 蛍光染色による細胞レベルでの分子の局在を共焦点顕微鏡などを用いて検討を行った方がいいのではないか？

(回答) 確かに細胞レベルでの分子の局在を、共焦点顕微鏡で解析した方がいいので、今後検討したい。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。