

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	田代 直彦
<p>学位論文題目</p> <p>Thermal Treatment Attenuates Neointimal Formation beyond Blood Pressure Lowering Effect in Spontaneously Hypertensive Rats</p> <p>(自然発症高血圧ラットの血管傷害モデルにおいて温浴は降圧以上の新生内膜抑制作用を有する)</p> <p>共著者名；岡田基、川辺淳一、長谷部直幸</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>動脈硬化症は心筋梗塞をはじめとして様々な臓器に虚血性変化を引き起こす病態であり、高血圧症は動脈硬化症の病因として最も重要な要因のひとつである。高血圧による動脈硬化進展のメカニズムとして血管壁へのメカニカルストレスや酸化ストレスなどの亢進が、血管壁への炎症細胞浸潤を誘起する過程の重要性が示唆されている。</p> <p>最近、我々は温浴によりラット大腿動脈カフ傷害による血管リモデリング（新生内膜肥厚）が抑制されることを報告した。温浴により、血管壁内において組織保護蛋白である熱ショック蛋白(HSP)発現が誘導され、結果として血管壁内の酸化ストレスを減少させることを明らかにし、血管壁における抗酸化作用や抗炎症作用を介して心血管病を抑制する可能性を提案した。しかしながら、動脈硬化の最大の危険因子である高血圧存在下での血管リモデリングに対して、温浴がどのような効果をもたらすかは十分に明らかにされていない。</p> <p>本研究では、自然発症高血圧ラット(SHR)のカフ血管傷害による新生内膜肥厚モデルを用いて、高血圧存在下での血管リモデリング病態におよぼす温浴の効果とその機序について、降圧効果と比較しながら検討した。</p>			

材料・方法

1．新生内膜肥厚モデル作成と、温浴および薬物処置

8週齢の雄自然発症高血圧ラット(spontaneously hypertensive rats : SHR)を一週間安静飼育した後、実験に用いた。ペントバルビタール(50 mg/kg)を腹腔投与し、麻酔下に右大腿動脈周囲に内径 0.76mm、長さ 5mm のポリエチレンチューブを被せカフ血管傷害を作成した。ラットは、コントロール群(C)、温浴群(T)、ヒドララジン群(H)の 3 群に分け、T 群は手術前日および手術 2 日後より 4 週間、連日 15 分間の温浴を行った。H 群はヒドララジン 5 mg/kg を連日経口投与した。また tail-cuff 法により定期的に非麻酔下に血圧を測定した。実験期間中は通常食餌・自由飲水で飼育した。

2．組織学的検討

カフ血管傷害後 2 週間後と 4 週間後に大腿動脈の灌流固定標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を用いて内膜および中膜面積を測定した。また、抗 HSP72 抗体、抗 ED-1 抗体、抗 p22-phox 抗体、抗 gp91-phox 抗体を用いて免疫組織染色を行い、血管壁における熱ショック蛋白の発現、炎症細胞浸潤、酸化ストレスの程度を評価した。HSP72 の発現量は HSP72 陽性部分の面積を中膜面積で除し面積陽性率を計算した。また、炎症浸潤細胞を定量するため ED-1 陽性細胞数と外膜総細胞数を計測し、ED-1 細胞数を外膜総細胞数で除したものを炎症細胞陽性細胞率とした。

3．統計解析

すべてのデータは平均 ± 標準誤差で示した。解析は *t* 検定または二元配置分散分析で行い、 $P < 0.05$ をもって統計学的に有意と判定した。

成績

1．温浴およびヒドララジン処置による血圧と脈拍数の変化

T 群の血圧は、1 回温浴後 6 時間で最大 178 ± 5 から 151 ± 10 mmHg まで低下した後、24 時間後には温浴前と同程度の血圧に復した。一方、H 群の血圧は 1 回のヒドララジン投与後 3 時間で最大 171 ± 4 から 143 ± 8 mmHg に低下し、24 時間後も降圧は持続した。

降圧効果は、T 群に比べ H 群のほうが程度・持続効果とも有意に大きかった($p < 0.0005$, $n=5$)。脈拍数は C 群、T 群に明らかな変化を認めなかったが、H 群では 358 ± 16 から 406 ± 30 /分に増加した。4 週間で C 群の血圧は次第に上昇した(収縮期血圧 170 ± 5 から 192 ± 2 mmHg、拡張期血圧 130 ± 5 から 148 ± 3 mmHg)。T 群でも同様に血圧は上昇したが、連日温浴 4 週で C 群に比して約 40 %降圧した($p < 0.05$, $n=6$)。H 群は経過中に有意な血圧上昇は認められなかった。

2 . 新生内膜肥厚

カフ傷害 4 週間後、全群で新生内膜肥厚を認めた。内膜中膜比(I/M 比)は C 群の $86 \pm 9\%$ の肥厚に対し H 群($58 \pm 12\%$)で軽度に抑制され($p=0.052$)、T 群($27 \pm 2\%$)では有意に抑制された($p < 0.005$, $n=5$)。なお T 群、H 群はいずれも中膜には有意な変化を及ぼさなかった。

3 . カフ傷害血管における HSP72 の発現

組織保護蛋白である HSP72 は中膜に発現したが、カフ傷害 2 週間後の HSP72 面積陽性率は C 群; $7 \pm 6\%$ 、T 群; $32 \pm 5\%$ 、H 群; $10 \pm 7\%$ 、4 週間後では C 群; $4 \pm 3\%$ 、T 群; $38 \pm 2\%$ 、H 群; $23 \pm 1\%$ であった。いずれの時期においても面積陽性率は T 群で有意に高く($p < 0.05$, $n=5$)、HSP72 の発現範囲は経時的に増加した。

4 . 炎症細胞浸潤

カフ傷害血管の外膜には著しい細胞浸潤を認めた。単球・マクロファージのマーカーである抗 ED-1 抗体で免疫染色したところ、カフ傷害 2 週間後での ED-1 陽性細胞率は、C 群; $51 \pm 6\%$ 、T 群; $33 \pm 5\%$ 、H 群; $50 \pm 3\%$ 、4 週間後では C 群; $41 \pm 7\%$ 、T 群; $21 \pm 4\%$ 、H 群; $34 \pm 4\%$ であった。いずれの群でも経時的に陽性率は減少したが、T 群の減少は他群に比し有意であった($p < 0.05$, $n=7$)。

5 . 酸化ストレスの抑制

酸化ストレスの指標として NADPH oxidase の主要なサブユニットである p22-phox と gp91-phox の発現を観察したところ、いずれもカフ傷害血管の外膜に認められた。T 群では、いずれの発現も C 群、H 群に比べ有意な抑制を認めた($p < 0.05$, $n=3$)。

考案

本研究では、高血圧を呈する SHR のカフ傷害血管による新生内膜肥厚が温浴で抑制されること、温浴による新生内膜肥厚抑制効果は、降圧作用を超えるものであること、その機序に、温浴による HSP72 の発現亢進と炎症反応および酸化ストレスの抑制が重要な役割を果たすことを明らかにした。

先に我々は正常血圧ラットを用いて、カフ傷害による動脈硬化初期病変が温浴により抑制されることを報告した。しかし、正常血圧状態では血圧自体におよぼす温浴の効果は検出されなかった。すなわち、このモデルの血管リモデリング過程において、動脈硬化促進の最大危険因子である高血圧の影響と温浴効果の関係は未解明であった。今回の検討により、高血圧状態で血管リモデリングは促進されることが確認でき、温浴処置はこれを明らかに抑制することが確認された。温浴は SHR において軽度ながら有意な降圧をもたらしたため、得られた効果が降圧自体によるものか否かが問題であった。ヒドララジン処置を加える事により SHR の経時的な昇圧をほぼ完全に抑制することができたが、カフ傷害による新生内膜肥厚は軽度に抑制されるのみであった。このことより、温浴には降圧効果を超える血管リモデリング抑制効果があることが明らかとなった。

その機序として、我々は温浴により血管壁に発現する組織保護蛋白である HSP72 の役割に注目している。今回の検討でも、温浴療法は特に血管中膜に HSP72 を発現誘導することが確認されたが、これは血圧変動とは独立するものであった。カフ血管傷害部位において著明な炎症細胞の浸潤、酸化ストレスの上昇が認められており、温浴により HSP72 の発現亢進と共に血管壁における炎症、酸化ストレス変化は著明に抑制されることが確認された。しかし、ヒドララジンによる降圧ではその変化が軽度にとどまったことから、高血圧条件下での温浴による新生内膜肥厚抑制効果は、降圧作用に依存しない強力な HSP72 の発現誘導と血管外膜の炎症、酸化ストレス抑制を介してもたらされているものと考えられた。

結論

SHR を用いたカフ血管傷害モデルにおいて、温浴は暖徐な降圧効果と共に、血管新生内膜肥厚抑制効果があることを明らかにした。降圧作用は、血管新生内膜肥厚に対して抑制的に作用するが、温浴の効果はこれを超えるものであり、血管壁における HSP72 発現誘導、炎症細胞浸潤、酸化ストレス軽減の機序を介して強力な新生内膜肥厚抑制効果を発揮すると考えられた。温熱療法あるいはそれに関連する抗炎症、抗酸化ストレス療法の開発は、今後の効果的な動脈硬化予防に関して重要な戦略になるものと思われる。

引用文献

Okada M, Hasebe N, Aizawa Y, Izawa K, Kawabe J, Kikuchi K: Thermal treatment attenuates neointimal thickening with enhanced expression of heat-shock protein 72 and suppression of oxidative stress. *Circulation*. 2004;109:1763-1768.

Baljinnyam E, Hasebe N, Morihira M, Sumitomo K, Matsusaka T, Fujino T, Fukuzawa J, Ushikubi F, Kikuchi K: Oral pretreatment with ebselen enhances heat shock protein 72 expression and reduces myocardial infarct size. *Hypertens Res*. 2006;29:905-13.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	田代 直彦
<p>審査委員長 牛首文隆 ㊞</p> <p>審査委員 笹嶋唯博 ㊞</p> <p>審査委員 長谷部直幸 ㊞</p>			
<p>学位論文題目</p> <p>Thermal treatment attenuates neointimal formation beyond blood pressure lowering effect in spontaneously hypertensive rats</p> <p>(自然発症高血圧ラットの血管傷害モデルにおいて温浴は降圧以上の新生内膜抑制作用を有する)</p>			

温浴は、動脈効果に対し抑制作用を示すことが報告されています。しかし、温浴と動脈効果の促進要因である高血圧症との関連には不明な点が残されていました。

本研究は、自然発症高血圧ラット（SHR）を用い、温浴の動脈硬化抑制作用と血圧との関連を解析しました。その結果、温浴はカフ傷害モデルにおける新生内膜形成に対して、ヒドララジンによる降圧作用と比較し、有意にその抑制作用が強いことが示されました。また、その機序として HSP72 の発現誘導、酸化ストレスの軽減や炎症性細胞浸潤の抑制が重要な役割を果たしていることが示されました。

本研究の結果、温浴が降圧効果とは独立した動脈硬化病変抑制作用を持つことが解明されました。この結果は、温浴の作用機序を明らかにした点に意義があるとともに、その臨床的な価値も高く評価されます。

なお、論文提出者に対し各審査委員より、本論文とその関連領域に関して試問が行われ、適切な回答が得られました。

以上より、本論文は博士の学位論文として適切であると判定しました。