

主論文の要約

**Possible Involvement of Notch Signaling
For the Pathogenesis of Buerger's Disease**

[Buerger病発生とNotchシグナルの関与について]

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病態外科学講座 血管外科学分野

(指導：古森 公浩 教授)

玉井 宏明

【背景】

Buerger 病は、動脈硬化とは異なる難治性炎症性閉塞性血管疾患である。我々は、罹患動脈の内膜の T 細胞、B 細胞の集積像をもとに、Buerger 病は動脈内膜炎であると定義したが、病態生理は依然不明である。

多彩な生理作用を有する Notch シグナルは血管新生、動脈硬化においても重要である。我々は Notch1 遺伝子改変マウスを用いた検討で、Notch シグナルが虚血部位の血管新生に関与すること、gamma-secretase 阻害薬投与による Notch シグナル抑制作用で ApoE 欠損マウス（動脈硬化モデル）の血管炎症、動脈硬化を抑制することを示してきた。

これらの知見から Notch シグナルは Buerger 病の主な病態である動脈内膜炎の炎症機構についても関連があると推定した。本研究において、免疫組織学的方法を用いて、Buerger 病及び閉塞性動脈硬化症罹患動脈における Notch1、Notch 受容体のリガンドである Jagged-1、そしてその下流の転写因子である Hes-1 の発現につき解析した。

【対象】

1980 年から 2009 年までに当科にて診断・治療を行い、採取した 12 名の鼠径部以下の Buerger 病罹患動脈 22 検体を対象とし、同期間に得た 9 名の鼠径部以下の閉塞性動脈硬化症罹患動脈 13 検体と組織学的に比較した。Buerger 病には塩野谷の基準に基づいて診断を行った (Table I)。これらの検体は名古屋大学病院の手術病理標本から抽出した。Buerger 病群では 10 名が男性、2 名が女性、閉塞性動脈硬化症群では 7 名が男性、2 名が女性であった。平均年齢はそれぞれ 42.5 歳、64.8 歳であった。患者背景や罹患動脈については Table II に示した。

【方法】

すべての検体はホルマリン固定された後、パラフィン包埋を行い、5 μ m の切片を作成し、これらに対して H-E 染色及び免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色には自動免疫組織化学染色装置 (Ventana XT system Discovery®) (Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA) を使用した。マイクロウェーブ法にて抗原賦活化を行い、アビジン-ビオチン法を用いて免疫染色、標識酵素としてペルオキシダーゼを用いてジアミノベンジンと反応させ発色を行った。

1 次抗体及び 2 次抗体にはウサギ抗 Notch1 抗体・抗 Jagged-1 抗体 (1:100 dilution, ab27526・7771, Abcam, Cambridge, MA, U.S.A.)、ウサギ抗 Hes-1 抗体 (1:100 dilution, AB5702, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)、ウサギポリクローナル抗体 (1:100 dilution, ab27526, , U.S.A.) を使用した。

各検体を光学顕微鏡にて 200 倍で無作為に 20 視野を観察し、視野中の抗体陽性細胞率を計測し解析した。

データの解析には Mann-Whitney の U 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

【結果】

H-E 染色においては、両疾患群とも虚血に対する反応である新生血管を認めた。Buerger 病罹患動脈では、内弾性板内側に沿って炎症細胞浸潤を認めたが、動脈硬化性プラークは認めなかった。閉塞性動脈硬化症罹患動脈では、内弾性板の構造の乱れや平滑筋細胞の遊走、炎症性細胞に乏しいプラークの形成を認めた(Fig. 1)(Table III)。

免疫組織化学染色により Notch1 及び Jagged-1 陽性細胞の分布を検討した。両疾患群において、新生血管の内皮と中膜平滑筋に Notch1 及び Jagged-1 陽性細胞を認めた。Hes-1 では、新生血管の内皮においては同様に陽性を示す細胞を認めた。閉塞性動脈硬化症罹患動脈のプラークにおいては Notch 関連タンパク質の炎症細胞における発現が乏しかった。Buerger 病罹患動脈では、内膜中の炎症細胞の多くに Notch1 及び Jagged-1 陽性細胞を認めた (Notch1 (%): 8.4 ± 0.76 versus 1.3 ± 0.43 , $P < .001$; Jagged-1 (%): 9.3 ± 1.1 versus 5.2 ± 1.1 , $P = .03$)(Fig. 2-3)(Table IV)。Buerger 病罹患動脈においては Notch1 陽性単球を血栓内にも認めた。Hes-1 の発現は Notch1 のそれと同様であった。閉塞性動脈硬化症罹患動脈においては発現に乏しく、Buerger 病罹患動脈では内膜中における新生血管及び炎症性浸潤細胞で強い発現を認めた(Fig. 4)。

【考察】

これまでに Buerger 病罹患動脈の内膜と血栓に CD3 陽性 T 細胞の強い発現を認め、T 細胞と B 細胞間のクロストークが Buerger 病の発症や進行に関与している可能性を報告してきた。Notch シグナルは T 細胞の増殖や活性に関与しているので、Buerger 病罹患動脈の内膜内において Notch シグナルの活性化が認められるのは妥当であると考えられる。また、Buerger 病の血栓内の単球にも Notch1 の陽性を認めた。Buerger 病の血栓では、そのほとんどが多核白血球や単球からなる非特異的炎症性浸潤細胞を呈している。炎症のある組織の T 細胞において、NFkB 経路とのクロストークを介し、Notch1 の発現や Notch シグナルの活性化をすると報告されている。したがって、Notch シグナルの活性化は血栓内の CD3 陽性 T 細胞に関与すると推定している。Notch シグナル阻害薬が免疫反応を抑制することで、動脈硬化性プラークの抑制やネズミの全身性エリテマトーデスモデルにおける免疫反応を抑制することが報告されている。したがって、Notch シグナルは Buerger 病の治療の標的になるかもしれない。

これまでに、ネズミの虚血モデルにおいて、新生血管の内皮細胞と新生内膜内の遊走平滑筋細胞において Notch1 受容体が過剰発現していることを確認し、Notch1 受容体が内皮細胞と平滑筋細胞の増殖・活性に重要な役割を担っていることを報告してきた。今回、新生血管における内皮細胞や中膜の平滑筋細胞においても同様に Notch1 受容体の発現を確認しており、動物モデルの結果と同様に、ヒトの疾患において Notch シグナルの活性化が重要な役割を担っていることが示唆された。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、これまでの研究結果をもとに、細胞を形態学的に分類している点である。即ち、Buerger 病罹患動脈の外膜の新生血管に見られる炎症性細胞を CD3 陽性 T 細胞と定義していることが挙げられる。第二に、T

細胞の活性化に関与すると知られている Notch1 以外の Notch 受容体について観察していないことが挙げられる。第三には、Buerger 病罹患動脈において、Notch 関連タンパク質の過剰発現を確認し、これは Notch シグナルの活性化を示唆するものであると考えられるが、Buerger 病に対する適切な動物モデルが存在しないことから、Buerger 病の病因を決定することはできないことである。

【結語】

Buerger 病罹患動脈において Notch シグナルの活性化が閉塞性動脈硬化症罹患動脈よりも強く認められた。Notch シグナルの活性化が Buerger 病の炎症の病態生理に関与している可能性が示唆された。