

主論文の要旨

Cathepsin K Activity Controls Injury-Related Vascular Repair in Mice

〔 血管障害による新生内膜形成における
カテプシンKの役割およびその機序に関して 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻
発育・加齢医学講座 老年科学分野

(指導：葛谷 雅文 教授)

胡 丽娜

【緒言】

薬剤溶出性ステントの出現によりステント再狭窄率は低下したものの、冠動脈複雑病変、及び糖尿病や慢性腎疾患合併例における再狭窄率は依然として高く、ステント再狭窄発症機序の解明及び克服が極めて重要である。新生内膜形成のメカニズムとして、バルーン拡張とステント留置の機械的障害が血管マトリックス蛋白のリモデリングならびに、中膜平滑筋細胞(smooth muscle cell, SMC)の増殖と遊走を惹起する結果、新生内膜が形成すると考えられている。血管リモデリングにおける SMC の遊走には、**matrix metalloproteinases (MMPs)**が重要な役割を果たすことが知られている。しかし、それだけを抑制することでは十分な血管リモデリングの抑制効果が得られないことから、MMPs 以外のプロテアーゼも血管リモデリングに関与していると推測されている。

近年、システインプロテアーゼであるカテプシン(cathepsin)ファミリーの一つであるカテプシン K (CatK) が心房・心筋細胞より分泌され、強力なコラーゲンとエラスチン分解能を有するという新しい分子機能が明らかにされつつある。さらに、動脈硬化及び冠動脈疾患患者における CatK の血中レベルの上昇、また培養心筋細胞のアポトーシスへの CatK の関与も報告されているが、血管障害や再狭窄と CatK との関連性に関する報告は未だされていない。

【方法】

マウス

本研究では、9週齢(雄)の野生型(CatK^{+/+}; C57BL/6)と CatK 遺伝子欠損型(CatK^{-/-}; C57BL/6)のマウスを用いた。すべての動物実験は、名古屋大学における動物実験等に関する取扱い規定に則って行った。

血管障害モデルならびに実験プロトコール

以下の2種類の障害モデルを使用した。1)内外頸動脈分岐部直下を結紮するのみ(図1Aの上パネル)、2)同部位を結紮後さらにポリエチレンカフ(図1Aの下パネル)を頸動脈周囲に装着する。

先ず、CatK^{+/+}と CatK^{-/-}マウスに上記の2種類の血管障害のモデルを作成し、図1Aに示したタイムコースでサンプリングを行い、両群間を組織学的及び生化学的な比較検討を行った。次に、障害作製3日前から、非選択カテプシン阻害剤 E64d (10mg/kg/day)を1日おきに腹腔内注射し、モデル作製14日目にサンプリングを行った。

免疫組織学的染色

術後図1に示したタイムコースでサンプリングを行い、次の検討を行った。

1. 4日目: Mac3 染色-浸潤したマクロファージ (MΦ) の検討
2. 7、14日目: Ki67 染色/ α -smooth muscle actin (ASMA)染色-増殖している SMC の検討
3. 14、28日: CD31 染色-毛細血管密度の同定

遺伝子ならびにタンパク発現の評価

術後 4 日目に両側の頸動脈を採取し、mRNA を抽出し、RT-PCR 法を用いターゲット遺伝子発現を定量した。内在性コントロールとして GAPDH を用いて補正を行った。1 つのサンプルをトリPLICATEで検討した。さらに、術後 4 日目に CatK^{+/+}と CatK^{-/-}の頸動脈を採取し、細胞溶解液を用い蛋白質を抽出し、ウェスタンブローディングを実施した。

ゼラチン・ザイモグラフィ

頸動脈から抽出した蛋白質 20 μ g を非還元剤サンプル溶液と反応させ、1 mg/ml のゼラチン含有 10%SDS-PAGE にて電気泳動を行った。SDS を除去し、pH7.4 の反応液で 30 時間反応させた後、Coomassie Brilliant Blue 染色と定量を行った。

大動脈切片を使用した平滑筋細胞遊走能

マウス胸部大動脈を単離後、1 \times 1mm に切断し、50ng/mL 血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor、PDGF)含有の無血清培地で培養後、図4A で示したタイムコースで細胞数と増殖面積を定量し、中膜 SMC の遊走能を評価した。

細胞培養ならびに増殖、遊走、浸潤能の評価

エクспラント法を用い、CatK^{+/+}と CatK^{-/-}マウスの大動脈から中膜 SMC を単離し、血清下で培養後、SMC の増殖能は MTS 法を用い、遊走、浸潤能はトランスウェルを用い検討した。

統計分析

データは平均 \pm SEM として表した。2 群間の比較は t 検定を用い、3 群及びそれ以上の比較には、One-way ANOVA (Tukey post hoc tests)法で、SPSS ソフトウェアバージョン 17.0 (SPSS 社、Chicago、IL)を用いて統計解析を行った。P 値 <0.05 を有意差ありと判断した。

【結果】

1. CatK^{-/-}では 2 種類の血管障害による内膜肥厚が有意かつ顕著に抑制された (図1B-E)。
2. 血管障害により CatK の発現が増える一方、その内在性阻害物質であるシスタチン C の発現に変化は認められなかった(図2A-B)。
3. 血管障害による血管組織内の Toll-like receptor (TLR)-2, TLR-4, chemokine (C-C motif) ligand12 (CCL12) , と Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)の遺伝子発現は、CatK^{-/-}において著しく低下した(図2C-G)。しかし、CXC chemokine receptor-4 (CXCR4) の変化は、両群間で認められなかった。
4. CatK^{-/-}群では M Φ の血管壁内への浸潤や血管壁の MMP-2 と MMP-9 の発現・活性が顕著に低下した(図3)。
5. Ex vivo と in vivo の実験において、CatK の遺伝子欠損による中膜 SMC の遊

走、浸潤及び増殖能の低下が観察された(図4A-E)。同様に、CatK^{-/-}マウス由来 MΦ の浸潤能の低下も観察された(図4D, F)。

6. CatK^{-/-}群において、血管中膜における増殖型 SMC [Ki67(緑色) /ASMA(赤色)のダブル陽性細胞]数の有意な低下(図5A-B)と共に、PI3K, Akt, p38MAKP 及び mTOR のリン酸化レベルの低下が観察された(図5C)。
7. 遺伝子欠損あるいは各種阻害剤による CatK の抑制により(選択的 CatK 阻害剤 CatK-II と非選択的阻害剤 E64d)、培養 SMC の増殖能は有意に低下した(図5D-E)。PI3K 阻害剤 (LY294002) も SMC の増殖を顕著に抑制した。一方、MMP 阻害薬 (GM6001)では変化は認められなかった。
8. 非選択的カテプシン阻害薬(E64d)の投与により、中膜 SMC の増殖と新生内膜の形成が著しく低下した。さらに、MΦ の浸潤や MMP-2 と MMP-9 の発現も顕著に低下した(図6)。
9. 外膜の栄養血管の密度 (CD31 陽性血管) は、CatK^{-/-}群ならびに非選択的カテプシン阻害薬投与群で顕著に低下した(図7)。

【考察】

本研究では、血管障害により血管壁内で CatK は高発現し、その内在性阻害因子であるシスタチン C の発現には変化を認められなかった。血管障害による栄養血管形成、血管リモデリング及び新生内膜形成は、CatK^{-/-}マウスならびに非選択的カテプシン阻害薬の投与によって顕著に抑制されたことより、CatK が障害後の血管リモデリングに重要な役割を果たしていることが明らかになった。実際、CatK^{-/-}マウスでは、障害後に誘導される MΦ の浸潤、MMP-2, 9 の発現・活性化、TLR-2, 4, CCL12 ならびに MCP-1 遺伝子発現、さらには PI3K, Akt, p38MAKP 及び mTOR のリン酸化レベルが明らかに低下していた。Ex vivo ならびに培養系の実験においては CatK が SMC の増殖、また SMC や MΦ の遊走、浸潤において重要な働きをすることが明らかになった。これらの結果より、CatK は、TLR-2, 4 を介して MΦ の浸潤や、PI3K/Akt/mTOR のシグナル経路を介して SMC の増殖に関与することが示唆された。

【結語】

本研究より、CatK は血管内治療による血管陰性リモデリングおよび再狭窄に深く関与し、今後の再狭窄治療の新たな分子ターゲットになり得ることが示唆された。