

論文審査の要旨および担当者

学位申請者	森田 知佳 (3DV11003 獣医薬理学)
学位論文題目	生体内の機能を維持した血管の器官培養法 確立：血管恒常性維持のメカニズムを探る
担当者	主査 北里大学教授 小山田 敏文 副査 北里大学教授 佐々木 宣哉 副査 山口大学教授 佐藤 晃一 副査 北里大学准教授 山脇 英之

論文審査の要旨 (3,000 字以内)

【背景と目的 1】

血管組織の器官培養法は、*in vivo* の複雑な因子の関与が除去でき組織構築を維持しながら細胞機能を保持しているため、薬物の長期作用を見る上で有用な実験系である。しかし、抵抗血管であるラット前腸間膜動脈を用いた長期間(3-5 日)の器官培養による血管収縮性の変化を検討した報告は限られている。したがって、ラット摘出前腸間膜動脈を無血清培地で培養した後、血管収縮性の変化を調べ、器官培養法を確立することを第一の目的とした。

【背景と目的 2】

高血圧などの血管壁構造変化が生じる慢性疾患時には、様々な増殖因子が分泌され、血管内皮や平滑筋細胞が脱分化・増殖し血管障害を引き起こす。様々な増殖因子を含む牛胎児血清(Fetal bovine serum: FBS)

を無血清培地に添加した時の血管収縮性と内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響を検討することを第二の目的とした。

【背景と目的 3】

無血清培地での器官培養法は血管機能を維持する上で最善の方法であるとされてきた。しかし急性摘出血管と比べると収縮張力が減弱するなど異なる性質を示す。そこでより生体内で見られる機能を維持した血管の器官培養法を確立するために無血清培地での器官培養後生じる機能変化の詳細機序を検討することを第三の目的とした。

【方法と結果】

雄性ウィスターラットから前腸間膜動脈を摘出後、内皮(Endothelium)保持(E (+))および剥離(E (-))標本作製した。摘出直後の血管標本(Fresh)、無血清培地で3日間器官培養した標本(0% serum)および10% FBSを添加し器官培養した標本(FBS)を作製した。

(1)はじめに0% serumのアゴニストによる収縮張力がFreshと比べどのように変化するか検討した。E (+) 0% serumのnoradrenaline (NA)、endothelin (ET)-1 および5-hydroxytryptamine (5-HT)による最大張力はFreshと比べて減弱する傾向を示したが、有意な差ではなかった。E (-) 0% serumのNAによる最大張力は有意に減弱したが、ET-1 および5-HTによる最大張力はFreshと比べ有意な差はなかった。

【結論】3日間の無血清培地での器官培養後もラット前腸間膜動脈は十分な収縮張力を保持していた(Morita et al. *J Vet Med Sci*, 2010)。

(2)次にFBS長期処置のアゴニストによる収縮張力に及ぼす影響を検討し

た。E (+) FBS の NA、ET-1 と 5-HT による最大張力は 0% serum と比べ増強した。E (-) FBS の NA と ET-1 による最大張力は 0% serum と比べ減弱したが、対照的に 5-HT による最大張力は増強した。

【結論】FBS 長期処置の血管収縮性に及ぼす影響はアゴニストや内皮の有無により異なる(Morita et al. *J Vet Med Sci*, 2010)。

(3)次に FBS 長期処置の内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響について検討した。FBS の内皮依存性弛緩反応は 0% serum と比べ有意に減弱した。FBS のアセチルコリンによる一酸化窒素(NO)産生は 0% serum と比べ有意に減少したが、内皮型 NO 合成酵素のタンパク質発現は変化なかった。 Ca^{2+} イオノフォアまたは phospholipase C 活性化薬による弛緩反応は FBS と 0% serum の間で変化なかった。

【結論】FBS は血管内皮の受容体/ G_q 蛋白質/phospholipase C 経路の障害を介して内皮依存性弛緩反応を減弱させることが示唆された(Morita et al. *Eur J Pharmacol*, 2011)。

(4)無血清培地では血管恒常性維持に重要な栄養素が欠如していると考えられたため、それを補う目的で成熟ラット血清を無血清培地に添加し、内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響を検討した。Fresh、3%成熟ラット血清を無血清培地(0% serum)に添加し3日間器官培養した標本(3% serum)を作製した。0% serumの内皮依存性弛緩反応はFreshと比べ有意に減弱したが、3% serumでは有意に改善した。抗酸化薬N-acetyl-L-cysteine又はミトコンドリア呼吸鎖複合体 I 阻害薬rotenoneの急性処置は0% serumの内皮依存性弛緩反応減弱を有意に改善した。0% serumの内皮細胞のミトコンドリア由来 O_2^- 産生はFreshと比べ有意に増加し、3% serumでは有意に改善した。一方、0% serumと3% serumのミトコンドリア膜電位は共にFreshと比

べ増加していた。

【結論】 無血清培地で器官培養した前腸間膜動脈の内皮細胞ではミトコンドリア膜電位が上昇することにより、ミトコンドリア由来 reactive oxygen species (ROS) 産生が増加し、内皮依存性弛緩反応が減弱した。成熟ラット血清の無血清培地への添加はミトコンドリア由来 ROS を抑制することにより内皮依存性弛緩反応を改善した (Morita et al. *Vascul Pharmacol*, 2013)。

(5) 非定型セリン/トレオニンプロテインキナーゼである mammalian/mechanistic target of rapamycin (mTOR) は細胞の分化、細胞内 Ca^{2+} 動態や多様なシグナルを調節しているため、0% serum で見られる機能変化を引き起こす可能性がある。そこで 0% serum の収縮張力が減弱するメカニズムを mTOR に注目して検討した。Fresh、mTOR 阻害薬 rapamycin を無血清培地 (0% serum) に添加し 5 日間器官培養した標本 (Rapamycin) を作製した。0% serum の KCl による最大張力は Fresh と比べ有意に減弱したが、Rapamycin では有意に改善した。0% serum の mTOR 発現は Fresh と比べ有意に増加したが、Rapamycin では有意に改善した。 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) II のリン酸化レベルを検討したところ、0% serum では Fresh と比べ有意に増加したが、Rapamycin では有意に改善した。

【結論】 0% serum では mTOR 発現が増加し基底状態の CaMKII のリン酸化レベルが増加することにより KCl による収縮張力が減弱すると考えられた。

【総括】

本研究ではラット摘出前腸間膜動脈の無血清培地での器官培養法を

初めて確立するとともに、FBS 長期処置の血管平滑筋の収縮性と血管内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響とその機序を明らかにした。更に無血清培地での長期間の器官培養が引き起こす血管内皮および平滑筋における機能変化の機序の一端を明らかにした。ラット前腸間膜動脈の器官培養法は薬物の長期作用を検討できる有用な系と考えられる。今後、より生体内で見られる機能を維持した器官培養法を確立するためには、無血清培地での器官培養により引き起こされる血管の機能変化の機序を更に詳細に検討することが必要である。

【論文審査の結果】

申請者は、本研究でラット摘出前腸間膜動脈の無血清培地における長期間の器官培養法を初めて確立するとともに、牛胎児血清 FBS 長期処置の血管平滑筋の収縮および形態と、血管内皮依存性弛緩機能に及ぼす影響とメカニズムを明らかにした。更に無血清培地での長期間の器官培養が引き起こす血管内皮および平滑筋における機能変化のメカニズムを初めて明らかにした。今後、より生体内で見られる機能を維持した器官培養法を確立するためには、更に詳細な検討が必要であると考えられるが、現段階においても申請者が本研究において確立したラット前腸間膜動脈の器官培養法は薬物の長期作用を検討できる唯一無二の有用な実験系であると言える。

申請者は、在学3年間でこれらの成果をまとめて早期修了対象者として論文を提出した。審査員一同は、本論文が新規の知見を多く含み医学や獣医学の発展に寄与するものとの認識で一致した。更に、著者が真摯な研究態度と豊かな人間性を持ち、将来研究成果を社会に還元できる能力を有するものであり、博士（獣医学）の学位授与に値すると判断した。