

# 博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

矢内 俊より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 581 号

学位申請者 : 矢 内 俊

学位審査論文 : Implication of overexpression of dishevelled-associated activator of morphogenesis 1 (Daam-1) for the pathogenesis of human Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension (IPAH)

(特発性肺動脈性肺高血圧症の発症機序に対する dishevelled-associated activator of morphogenesis 1 (Daam-1) 過剰発現の関与)

著 者 : Shun Yanai, Megumi Wakayama, Haruo Nakayama, Minoru Shinozaki, Hisayuki Tsukuma, Naobumi Tochigi, Tetsuo Nemoto, Tsutomu Saji, Kazutoshi Shibuya

公 表 誌 : Diagnostic Pathology DOI:10.1186/s13000-017-0614-7

論文内容の要旨 :

<背景と目的> 特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH) は致死性の稀少疾患であるが、その発症機序は依然不明である。これまでの病態解析に関わる研究では、家族集積性のある IPAH 患者より発見された Bone morphogenetic protein receptor type 2 (BMPR2) の遺伝子変異を中心とした発症機序についての研究が多い。しかし BMPR2 遺伝子変異陽性者の 20%しか IPAH を発症せず、責任遺伝子と確定されるには至っていない。申請者らのグループによる最近の研究では、環境常在真菌である *Stachybotrys chartarum* を用いた動物モデルの RNA マイクロアレイ分析で比較した結果、IPAH の発症に Wnt/planar cell polarity (Wnt/PCP) シグナル伝達経路の関与を指摘した。本研究では、ヒト IPAH 発症における Wnt/PCP シグナル伝達系構成タンパク (Wnt-11、Dvl-2、Daam-1) 発現亢進を確認すべく、ヒト肺動脈の免疫組織染色法を行い、顕微鏡観察を行った。

<材料と方法> 9 例の IPAH 患者、7 例の続発性肺動脈性肺高血圧症患者 (APAH) 、及び肺動脈病変のない 16 例の年齢一致対照群の剖検肺より採取されたホルマリン固定・パラフィン包埋切片を用いた。これらの切片に対して抗 Wnt-11、抗 Dvl-2、抗 Daam-1 抗体を一次抗体とした酵素抗体間接法を施した。作製した標本に対して肺動脈の構成要素 (内皮細胞、筋繊維芽細胞、

中膜平滑筋細胞)及び血管径(直径 $100\mu\text{m}$ 以上を中型動脈、未満を小動脈と定義)ごとに区別して、病理組織学的検討を行った。剖検は東邦大学医療センター大森病院にて1958年から2011年に施行され、研究実施に当たっては東邦大学医学部倫理委員会の審査を受けた(認可番号2709425035)。

<結果と考察> Dvl-2、Daam-1の発現はすべての肺動脈構成要素、すなわち内皮細胞、筋繊維芽細胞、中膜平滑筋細胞において認められ、その陽性発現率は各々異なっていた。一方で、Wnt-11の発現はいずれの検体群でも認められなかった。

Dvl-2、Daam-1陽性率を肺動脈構成要素別にまとめたところ、IPAH患者の中膜平滑筋細胞のDvl-2陽性率は低く、Daam-1陽性率は高かったが、APAH患者、年齢一致対照群の中膜平滑筋細胞ではDvl-2陽性率が高く、Daam-1陽性率は低かった。各群においてDaam-1陽性率をDvl-2陽性率で除したところ、IPAH患者群では1.5と高かったが、それ以外の群では0.25から0.78と低かった。また内皮細胞、筋繊維芽細胞ではDvl-2、Daam-1陽性率に3群間での差がなかった。このDvl-2とDaam-1の陽性率の違いを検体群ごとの傾向として評価するために、Dvl-2陽性率とDaam-1陽性率のオッズ比を求め、対照群対IPAH群ならびに対象群対APAH群の間において平均の差の検定を行ったところ、対照群対IPAH群の小動脈中膜平滑筋細胞において $p=0.05$ となり有意差がみいだされた。中型動脈の $p$ 値は0.28であり、有意差は認められなかったが、他の比較群に比べると低値であった。一般にIPAHの初期には小動脈病変が形成され、病勢が進行してから中型動脈病変が形成されると考えられており、この検定結果もIPAHの病態を反映したものと考えられた。

IPAH患者の肺動脈では中膜平滑筋細胞の異常増殖を認めるが、その原因のひとつとしてRas homolog gene family, member A/Rho-Associated coiled-coil-containing protein kinase (RhoA/ROCK)系の発現亢進が知られている。RhoA/ROCK系の発現はBMP2を含むTGF(Transforming growth factor) $\beta$  superfamilyやWnt/PCP系によって制御されていることから、Wnt/PCP系活性化はRhoA/ROCK系をも活性化しているものと考えられた。

<結語> 本研究では、ヒト肺動脈中膜平滑筋におけるDaam-1発現亢進がRhoA/ROCK系を介して、肺動脈壁の肥厚と内膜狭窄を誘導する可能性を指摘した。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 581 号	氏 名	矢 内 俊
学位審査担当者	主 査	高 橋 啓
	副 査	盛 田 俊 介
	副 査	諸 井 雅 男
	副 査	中 野 裕 康
	副 査	池 田 隆 徳

学位審査論文の審査結果の要旨 :

特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH) 発症には Wnt/planar cell polarity (Wnt/PCP) シグナル伝達経路が関与するとの先行研究をうけ、肺動脈における Wnt/PCP シグナル伝達系構成タンパクである Wnt-11、Dvl-2、Daam-1 の発現を、免疫組織化学的手法を用いて明らかにすることを目的として本研究は実施された。

1958 年から 2011 年迄に東邦大学医療センター大森病院にて剖検された IPAH 患者 (9 例)、続発性肺動脈性肺高血圧症 (APAH) 患者 (7 例)、そして肺動脈病変のない年齢一致対照群 (16 例) の肺組織を対象として、ホルマリン固定パラフィン包埋薄切切片に対し抗 Wnt-11、抗 Dvl-2、抗 Daam-1 抗体を用い、肺動脈構成要素である内皮細胞、筋線維芽細胞、中膜平滑筋細胞における各種タンパクの発現を血管サイズごとに観察した。その結果、肺動脈を構成する内皮細胞、筋線維芽細胞、中膜平滑筋細胞はいずれも Dvl-2、Daam-1 が発現していたのに対し、Wnt-11 はすべての対象、すべての動脈構成細胞で発現を認めなかった。IPAH 患者の中膜平滑筋細胞の Dvl-2 陽性率は低く、Daam-1 陽性率が高いのに対し、APAH 患者、年齢一致対照群では、Dvl-2 が高陽性率を、Daam-1 は低陽性率を示した。Daam-1 陽性率/Dvl-2 陽性率比は IPAH 患者群で 1.5 にに対し、他群では 0.25 ~ 0.78 であった。一方、内皮細胞、筋線維芽細胞の Dvl-2、Daam-1 陽性率は 3 群間で差がなかった。この Dvl-2 と Daam-1 陽性率の差を疾患群ごとの傾向として評価するため Dvl-2 陽性率と Daam-1 陽性率のオッズ比を求め対照群対 IPAH 群、対象群対 APAH 群間で検定を行ったところ、対照群対 IPAH 群の小動脈中膜平滑筋細胞において有意差をみた。中型動脈に有意差はなかったものの、他の疾患群よりも低値を示す傾向にあった。IPAH は小動脈から病変が生じ、病態の進行と共に中型動脈へと進展すると考えられており、本結果も IPAH の病態を反映していると考えられた。IPAH の肺動脈には中膜平滑筋細胞の増殖がもたらされるが、その原因の一つに Ras homolog gene family, member A/Rho-Associated coiled-coil-containing protein kinase (RhoA/ROCK) 系の発現亢進が知られている。RhoA/ROCK 系発現は BMP2 を含む TGF $\beta$  superfamily や Wnt/PCP 系により制御されていることから、今回の研究で明らかになった肺動脈中膜平滑筋における Daam-1 の発現亢進が、Wnt/PCP 系、RhoA/ROCK 系を活性化させ肺動脈壁の肥厚と内膜狭窄を誘導している可能性が示された。

平成 29 年 5 月 23 日に開催された学位審査会において、研究要旨の発表後、内容について活発な質疑応答がなされた。Wnt/PCP 系の最上流にあるはずの Wnt-11 が発現していないのにシグナル伝達系タンパクの発現が誘導される機序、肺動脈の病変程度による各種タンパク発現の差異などについて質問がなされたが、申請者は本研究の背景、limitation、今後解明すべき課題などを含め適切かつ丁寧に回答した。

以上より、IPAH における Wnt/PCP 系の関与をタンパク発現の観点から病理組織学的に解明した本研究の意義は高く、審査委員全員一致で本論文は学位に値するとの結論に至り、学位審査会を終了した。