



Activation of Transglutaminase type 2 for Aortic Wall Protection in a Rat Abdominal Aortic Aneurysm Formation

宗實, 孝

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2010-06-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3117

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003117>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	宗 實 孝
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博ろ第 3117 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の 日 付	平成 22 年 6 月 8 日

【 学位論文題目 】

Activation of Transglutaminase type 2 for Aortic Wall Protection in a Rat Abdominal Aortic Aneurysm Formation(大動脈瘤形成における組織型トランスグルタミナーゼの大動脈壁保護効果に関する実験的検討)

審 査 委 員

主 査	教 授	秋 田	穂 東
	教 授	平 田	健 一
	教 授	伊 藤	智 雄

(論文博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Activation of Transglutaminase type 2 for Aortic Wall Protection in a Rat Abdominal Aortic Aneurysm Formation

大動脈瘤形成における組織型トランスグルタミナーゼの大動脈壁保護効果に関する
実験的検討

(指導教員：神戸大学大学院医学系研究科医科学呼吸循環器外科学 大北 裕教授)

宗 實 孝

Objective: The altered structure and composition of the vascular extracellular matrix (ECM) influences the formation of abdominal aortic aneurysms (AAA). Transglutaminase type 2 (TG2), which is a Ca^{2+} -dependent cross-linking enzyme, has been proven the importance for ECM homeostasis, but there is no evidence of TG2 in AAA formation. The hypothesis was investigated that TG2 contributes to protect aortic walls during remodeling of the AAAs.

Methods: In a rat abdominal aortic aneurysm model using a combination of intraluminal elastase infusion and extraluminal calcium chloride, TG2 expression and activity were evaluated at 1 and 8 weeks after the AAA preparation (n=6 at each endpoint), compared with those of the non-prepared aorta (n=6). Additionally, ex vivo experiments of isolated AAA tissue culture with recombinant human TG2, TG2 inhibitor cystamine or tissue necrosis factor (TNF)- α were performed.

Results: TG2 mRNA expression in the AAAs was significantly upregulated at both 1 and 8 weeks (22.4-fold and 5.4-fold increases of the non-prepared aorta, $P=0.0022$ and $P=0.0048$, respectively). TG2 protein expression and activity were also enhanced by fluorescent stainings of the AAAs. Similar mRNA upregulation of TNF- α , interleukin-18, matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 was observed in the AAAs, and TG2 and TNF- α were colocalized in the aortic walls at 1 week. Ex vivo experiments showed that mRNA expressions of TNF- α , MMP-2 and MMP-9 in the cultured

AAA tissue were decreased by exogenous TG2, whereas increased by cystamine. TNF- α

exposure to the AAA tissues was significantly upregulated TG2 mRNA expression ($P=0.0333$).

Conclusion: TG2 expression and activity in AAA formation were enhanced, possibly due to compensatory reaction. TG2 has a potential role of ECM protector in aortic walls during remodeling of the AAAs.

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第2081号	氏 名	宗實 孝
論文題目 Title of Dissertation	Activation of Transglutaminase type 2 for Aortic Wall Protection in a Rat Abdominal Aortic Aneurysm Formation 大動脈瘤形成における組織型トランスグルタミナーゼの 大動脈壁保護効果に関する実験的検討		
審査委員 Examiner	主 査 秋田 穂来 Chief Examiner 副 査 平田 健一 Vice-examiner 副 査 伊藤 智雄 Vice-examiner		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

大動脈瘤は無症候性に発生・進行し、破裂をきたすと有効な治療手段が取れないことが多く、致死率の高い疾患である。大動脈瘤の形成において、高血圧・高脂血症・喫煙などが危険因子として知られており、細胞外基質の分解による血管構造の脆弱化が重要な要因として考えられているが、詳細な発生メカニズムは依然として不明な点が多い。

組織型トランスグルタミナーゼ（TG2）は、Ca²⁺依存性酵素で、生体内に広く存在し、細胞外で架橋結合形成を行なうことによって細胞外基質の構築を行ない、生体構造の保持を担っている。近年、TG2が様々な疾患や機能に関与していることが明らかとなり、炎症反応やアポトーシス、動脈石灰化・線維化、血管新生などの作用が報告されている一方、抗アポトーシス効果や細胞保護効果もあると言われている。これらTG2の多機能性には、TG2の構造変化や細胞特異性などが考えられているが、未だ不明な点が多い。

本研究ではラット大動脈瘤モデルを用いて、大動脈瘤形成過程におけるTG2発現に関して実験的検討を行なった。

エラスターゼと塩化カルシウムを用いたラット腹部大動脈瘤モデルを使用し、術後1週と8週に大動脈瘤壁のTG2発現を、正常腹部大動脈壁と比較しながら、リアルタイムPCRと蛍光染色によって評価した。術後1週と8週の大動脈瘤壁のTNF- α 、IL-1 β 、MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2のmRNA発現を測定し、TG2とTNF- α の蛍光免疫二重染色を施行した。また、術後1週目の大動脈瘤壁をex vivoにて3日間培養し、TG2投与、TG2 inhibitor Cystamine投与、TNF- α 投与時のmRNAの発現について比較検討した。

大動脈瘤壁のTG2 mRNA発現は、術後1週で正常腹部大動脈壁の22.4 \pm 5.2倍（ $p=0.0022$ ）に、術後8週で5.4 \pm 1.2倍（ $p=0.0048$ ）に亢進した。蛍光染色では、術後1週でTG2の発現および活性ともに著明に増強していたが、術後8週ではわずかな増強のみであった。TNF- α 、IL-1 β 、MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2のmRNA発現は、術後1週と8週でTG2発現とほぼ同様の増加傾向を示した。TG2とTNF- α の蛍光免疫二重染色では、両者の局在性がほぼ一致し共に増強していることが確認できた。

大動脈瘤形成におけるTG2発現の亢進が、大動脈瘤形成に関与するとされるTNF- α 、IL-1 β 、MMP-2、MMP-9と同様に形成促進作用によるものか、TIMP-1、TIMP-2のように大動脈壁の構造保護作用によるものかを明らかにするために、術後1週目の大動脈瘤壁を用いたex vivo実験を施行した。3日間の大動脈壁培養において、TNF- α 、MMP-2、MMP-9のmRNA発現はTG2投与群で抑制され、Cystamine投与群で亢進した。また、TNF- α を投与し3日間培養したものでは、TG2 mRNA発現が有意に増加した（ $P=0.0333$ ）。

大動脈瘤の形成過程において、急性期においてTG2発現は著明に亢進した。この急性期TG2発現亢進は、大動脈瘤形成に伴う炎症や細胞外基質分解に対す

る相補的反応であり、TG2 には大動脈壁保護作用があると考えられた。

本研究は、未だ知られていなかった大動脈瘤形成における組織型トランスグルタミナーゼの発現について、ラット大動脈瘤モデルを用いて研究したものであるが、組織型トランスグルタミナーゼに大動脈壁保護作用がある可能性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。