

学位論文題名

「心肺肉芽腫性病変と動脈硬化初期病変における
オステオポンチンの機能的解析」に関する研究

学位論文内容の要旨

1章 オステオポンチンと心肺肉芽腫性病変

-オステオポンチンは肉芽腫性病変を誘導する

【背景】

サルコイドーシスの肉芽腫中のマクロファージでは、オステオポンチン(OPN)が強発現すると報告されている(Carlson, 1997)。このOPNは、早期の免疫反応を誘導するサイトカイン(early T-lymphocyte activation-1, Eta-1)と考えられ、OPN欠損マウスではTh1反応が障害され、肉芽腫が形成されないと報告されている(Ashkar, 2000)。一方で、 δ -サルコグリカン遺伝子の欠損している心筋症ハムスター(TO2)の心臓では、OPNの過剰発現と石灰化を伴う肉芽腫性病変を認める(Williamis, 1995)。

【目的】

心肺肉芽腫性病変におけるOPNの機能について検討する。

【方法】

- (1) 心筋症ハムスター(以下、TO2)にウシ血清アルブミンと完全フロイドアジュバント(BSA-CFA)を皮下投与した。CFAは、熱処理した結核死菌を含む免疫賦活剤である。対照動物として、コントロールハムスター(F1B)を使用した。
- (2) 直接的に、OPNの機能を評価するために、OPN遺伝子を組み込んだアデノウイルス(AdexOPN)を正常ハムスターの肺に導入した。その対照として同力価のAdexLacZを使用した。

【結果】

- (1) TO2ハムスターに完全フロイドアジュバント(CFA)を投与すると、肉芽腫性肺病変が出現する。この病変は、マクロファージやリンパ球を主体とする肉芽腫だった。この病変の出現と、並行して、OPNがmRNAレベルと蛋白レベルで亢進する。これらの変化は、コントロールハムスター(F1B)では起こらなかった。心臓については、コントロールハムスターと異なり、TO2ハムスターではOPNの強発現と、反応性肉芽形成を無処置の段階で既に認めているため、CFAに反応しなかった。
- (2) OPN遺伝子を正常ハムスターの肺に導入すると、肺にマクロファージ、上皮細胞、リンパ球から構成される免疫型肉芽腫が形成された。AdexLacZの気管内投与では、肺に肉芽腫形成を認めなかった。

【考察】

OPNをハムスターの肺に過剰発現させると、マクロファージ、リンパ球の浸潤と肉芽腫の形成を伴う肺病変を誘導した。OPNが、Th-0からTh-1への分化を促すサイトカインとして機能することを *in vivo* で確認した。

2章 オステオポンチンと動脈硬化

-オステオポンチンは脂肪線条を増悪させる

【背景】

動脈硬化部位のマクロファージと血管平滑筋細胞にはOPNが発現していると報告されている(広田, 1993)。このOPNは、マクロファージとT細胞、平滑筋細胞の遊走活性を促進する。

【目的】

動脈硬化において、免疫系により産生されるOPNの役割を調べる。

【方法】

我々の使用したE μ -OPNトランスジェニックマウス(以下、OPN-TG)において、OPN RNAは、免疫グロブリン重鎖のエンハンサー(E μ)の制御下であり、脾臓や胸腺といったリンパ系の臓器に強発現を認める。このマウスは、血管平滑筋細胞よりも、血液細胞が産生するOPNの分布を検討するのに有用である。このOPN-TGマウスに、6週齢から18週齢の間、動脈硬化食を与え、18週齢における動脈硬化の程度とOPNの発現レベルについて検討する。

【結果】

OPN-TGマウスとコントロールマウスに、動脈硬化食を与えると、大動脈基部に泡沫細胞の集簇と平滑筋層の肥厚を主体とする動脈硬化病変を形成した。この動脈硬化病変の面積は、コントロールマウスと比べて、OPN-TGマウスでは有意に拡大する。それに加えて、OPN-TGマウスの病変部の泡沫細胞は、免疫組織学的検討により、OPN蛋白が強発現していた。また、大動脈基部の血管壁では、RT-PCRにより、OPN mRNAの発現亢進を認めた。両群のマウスで、血清総コレステロール値や血清OPN濃度に有意差はなく、局所のOPN発現が動脈硬化を増悪させていると考えた。

【考察】

動脈硬化食の摂取による高脂血症下では、血管内皮細胞が機能異常を起こし、OPNを発現する活性化マクロファージの内皮下へのリクルートメントを起こす。これらのマクロファージが、酸化LDLを取り込むと、更に活性化し、マクロファージが泡沫細胞に分化するのを刺激する。泡沫細胞から産生、放出されたOPNは、血管平滑筋、線維芽細胞、マクロファージを更に遊走させて、動脈硬化の初期病変である脂肪線条の形成過程を促進する。

【結語】

以上より、OPNが強力なサイトカインとして機能し、肉芽腫性病変や動脈硬化の初期病変の増悪因子となることを示した。これらの病変が、OPNの抑制により改善し、この心筋症ハムスター、OPN-TGを用いることにより免疫系におけるオステオポンチンの役割をさらに解明することができると期待される。今回の知見は、肉芽腫性病変や動脈硬化病変の新たな治療法の計画や、メカニズムの解明に有用な情報を提供すると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕
副 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

「心肺肉芽腫性病変と動脈硬化初期病変における オステオポンチンの機能的解析」に関する研究

オステオポンチン (OPN) は、B細胞の活性化を引き起こすサイトカインとして知られ、その標的細胞や機能は多彩にわたっている。OPN遺伝子発現は、動脈硬化部位の粥腫内石灰沈着とそれを取り巻くマクロファージ、またサルコイドーシス、結核などの肉芽腫中のマクロファージ、類上皮細胞と多核巨細胞で認めると報告されているが、*in vivo* での直接的機能は未だ不明である。そこで、申請者は、OPNの機能を追求するため、まず動脈硬化病変の脂肪線条形成時のマクロファージ遊走への関与を、引き続きマクロファージの集簇を中心とする肉芽腫性病変への関与を検討した。

OPNが、動脈硬化促進性に働くか否かを検討するため、免疫グロブリンのエンハンサーを有し、OPNcDNAを過剰発現するトランスジェニックマウス (OPN-TG) を作成した。この系では、造血細胞により作られた外因性OPNの作用を調べることが可能と考えた。コントロールマウスでは、腎と骨にOPNの発現を認めるが、これに加えてOPN-TGでは、脾臓と胸腺に発現を認めた。動脈硬化病変の解析には、OPN-TG群とコントロール群において、高脂肪食を投与し、大動脈基部における動脈硬化病変を定量化した。その結果、高脂肪食群では、OPN-TG群の動脈硬化病変面積は有意に増加した。次に、OPNの免疫染色を行うと、OPN-TG 高脂肪食マウスにおける泡沫細胞では、コントロール群よりOPNが強発現していた。泡沫細胞は平滑筋 α -アクチン陰性であり、マクロファージ由来と考えた。なお、総コレステロールの平均値には両群間で差を認めなかった。以上より、高脂肪食の摂取が、血管内皮細胞の障害を起こし、活性化マクロファージの血管壁への遊走を起こす。また、マクロファージによる酸化LDLの摂取は、マクロファージを更に活性化させ、マクロファージの泡沫細胞への分化を刺激する。この過程で、泡沫細胞から誘導されたOPNは、マクロファージ、血管平滑筋や線維芽細胞を更に遊走させ、血管壁の肥厚をもたらし、動脈硬化を促進すると考えた。

次に、肉芽腫性病変におけるOPNの機能を検討した。心臓に線維化に加えて石灰化周

困に反応性肉芽形成が起こる拡張型心筋症のモデル動物 TO2ハムスター (TO2) を用いた。TO2の肉芽腫形成を検討するため、フロイド完全アジュバント (CFA) を投与後、肉芽腫性病変を解析した。TO2ハムスター心臓では、CFA投与前後のいずれにも肉芽形成を認めた。無処置の肺では肉芽腫を認めないが、CFAで免疫後、肺に肉芽腫が出現した。次に各組織でのOPN mRNAの発現を調べると、TO2ハムスターの心臓には無処置でも発現を認めた。TO2の肺では、免疫後にOPNmRNAが出現した。正常ハムスターでは、免疫の有無に関わらず、心臓と肺にOPNmRNAを認めなかった。気管支肺胞洗浄液中のOPN蛋白、肺組織でのOPNmRNA、肉芽腫はいずれも、免疫後6日目に出現し9日目にピークとなり対応を示した。更に、OPNcDNAを組み込んだアデノウイルス (AdexOPN) を、正常ハムスターの気管支内に注入し、肺での肉芽腫形成を検討した。その結果、AdexOPNの気管内投与により、肉芽腫の形成を確認した。また、OPNの免疫染色では、肺胞上皮、気管上皮、マクロファージにOPNの過剰発現を認めた。AdexOPN誘導性の肉芽腫は、サルコイドーシスのような免疫型の肉芽腫と類似していた。OPNが肉芽腫形成過程に促進因子として作用することを明らかにした。

論文発表に際して、副査の長嶋教授からマウスにOPNを過剰発現させたときの変化について、心筋症ハムスターの心臓でのOPNの意義について、ヒト肢帯型筋ジストロフィーとヒト拡張型心筋症でのOPN発現の有無について、また副査の上出教授から動脈硬化におけるOPNの発現は炎症細胞と平滑筋とどちらが主体かについて、皮下投与の際に遠隔臓器の肺で変化が起こる理由について、また主査の北畠教授からサルコイドーシスの診断にOPNは応用可能かについて、腎臓でのOPNの発現が肉芽腫と関係しているかについて、今後の研究の方向性についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果や文献的知識を引用し、誠実にかつ、概ね適切に解答した。

この論文は、病理組織学的解析と遺伝子組み換え技術を駆使して心筋症ハムスターの心肺肉芽腫性疾患、およびOPNトランスジェニックマウスの動脈硬化病変とOPNの発現の関連を明らかにした最初の報告であることで高く評価され、今後のサルコイドーシスや動脈硬化の研究に示唆と方向性を与えることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。