

氏名	あん どう ふみ ひろ 安東史博
学位の種類	博士(再生医科学)
学位記番号	甲第4号
学位授与年月日	平成18年 3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	血球細胞質ホスホリパーゼ A ₂ α 欠損による動脈硬化の抑制効果
学位論文審査委員	(主査) 林 一 彦 (副査) 重政千秋 久留一郎

学位論文の内容の要旨

細胞質ホスホリパーゼ A₂(cPLA₂)はアラキドン酸代謝の律速酵素であり、多くの細胞の細胞質に普遍的に存在している。アラキドン酸はプロスタグランジン(PG)、ロイコトリエン(LT)といった生理活性物質に代謝され、cPLA₂α 欠損マウスではこれらの代謝産物の血中濃度が著明に抑制されることが報告されている。また cPLA₂α 欠損マウスは炎症性疾患の抑制に関与することが報告されており、このマウスの骨髄を動脈硬化易発症マウスに移植して血球系を cPLA₂α 欠損したものに置換し、その動脈硬化進展に及ぼす影響について検討を行った。

方法

血球由来の cPLA₂α の動脈硬化に対する影響を調べるために、骨髄移植により血球系の cPLA₂α を欠損または保持したマウスを作成した。著明な動脈硬化をきたすアポプロテイン E 遺伝子欠損雌性マウス(ApoE^{-/-}cPLA₂α^{+/+})に X 線照射を施行した後、ドナーの cPLA₂α 遺伝子欠損のないものと欠損のある雄性マウス(ApoE^{-/-}cPLA₂α^{+/+}もしくは ApoE^{-/-}cPLA₂α^{-/-}マウス)より採取した骨髄細胞をレシピエントマウス各 7 匹に移植した。その後 8 週間高コレステロール食を負荷した後、マウスの大動脈、大動脈基部、血清、血漿を採取した。大動脈は中性脂肪染色(ORO 染色)、大動脈基部は ORO 染色と、マウスの単球・マクロファージに対する抗体(MOMA-2)を用いた免疫組織染色を行い、面積全体に対する染色陽性領域の割合を評価した。血清を用いて中性脂肪値と総コレステロール値の測定を行い、血漿は酵素免疫測定法を用いてアラキドン酸代謝産物[ロイコトリエン B₄(LTB₄)、システイニルロイコトリエン(cysteinyl-LT)、6 ケトプロスタグランディン F₁α(6ketoPGF₁α)]を測定した[プロスタサイクリン(PGI₂)は生化学的に不安定で非酵素的に 6ketoPGF₁α に加水分解されるため、これを測定した]。各群間の有意差は、t 検定を用いて評価し、有意差は p < 0.05 を有意と判断した。データは平均±標準偏差で示した。統計解

析ソフトは Stat View 5.0 を用いた。

結 果

骨髄移植前後の観察期間中、血球 cPLA₂α 正常群と欠損群の間に体重の増加量や飼料の摂取量に差は認めなかった。大動脈と大動脈基部における ORO 染色で評価した脂肪染色陽性領域は ApoE^{-/-}cPLA₂α^{+/+}群に比べ ApoE^{-/-}cPLA₂α^{-/-}群で共に有意な抑制を認めた(大動脈;p < 0.01、大動脈基部;p < 0.05)。大動脈基部における MOMA-2 を一次抗体とした免疫組織染色では、ORO 染色の陽性部位とほぼ同じ部位でマクロファージの浸潤が確認された。マクロファージ陽性領域の割合は、ApoE^{-/-}cPLA₂α^{+/+}群に比べ ApoE^{-/-}cPLA₂α^{-/-}群で有意に抑制されていた(p < 0.01)。血漿中のアラキドン酸代謝産物の濃度は、LTB₄、cysteinyl LT、6ketoPGF₁α いずれも ApoE^{-/-}cPLA₂α^{+/+}群に比べ ApoE^{-/-}cPLA₂α^{-/-}群で有意な低値を示した(いずれも p < 0.05)。血清中の中性脂肪値、総コレステロール値は両群において有意差は認めなかった。

考 察

動脈硬化は慢性炎症性疾患の一種であると考えられており、白血球や血小板といった血球細胞がその進展・発症に重要な働きをしている。血球細胞から分泌された様々な催炎症性物質が、血管局所で血管細胞と連携して動脈硬化巣を進展させるとされているが、炎症を抑制することが動脈硬化の進展を抑制することにつながるかどうか、また炎症をどのように抑制すべきかは未解決である。本研究の結果、血球系の cPLA₂α 欠損マウス(ApoE^{-/-}cPLA₂α^{-/-})群では、アラキドン酸代謝産物の血中濃度の有意な低下、および大動脈局所の炎症と動脈硬化の進行が有意に抑制されることが明らかになった。LTB₄ は白血球の遊走能の亢進を介して動脈硬化の進展に関与し、Cysteinyl LT も毛細血管の透過性亢進を介して気道の炎症促進や動脈硬化増悪を示すと報告されている。一方 PGI₂ は血小板凝集抑制や血管平滑筋の弛緩による血管拡張の働きから動脈硬化の改善因子であるとされている。今回、血球系 cPLA₂α の欠損により血中の動脈硬化改善因子と増悪因子の両方のアラキドン酸代謝産物の低下を認めたが、全体としてのバランスによって動脈硬化を抑制する方向へ作用したと考えられる。また、MOMA-2 の免疫組織染色による検討で大血管にて単球やマクロファージ浸潤の抑制が示された。マクロファージの浸潤は、血管内皮機能障害、血管平滑筋細胞の増殖といった過程を引き起こすため、この浸潤抑制によって動脈硬化の進行を抑制できたものと考えられる。飼料の摂取量、体重、血清総コレステロール・中性脂肪濃度は両群間で有意差を認めなかったことから、血球系 cPLA₂α は動脈硬化の独立した増悪因子である可能性が示された。今後は、骨髄移植の組み合わせを変更して、血管側の cPLA₂α 欠損マウスの検討が課題である。

結 論

動脈硬化を発症しやすいアポプロテイン E 遺伝子欠損マウスに、骨髄移植によって細胞質ホスホリパーゼ A₂α 欠損の血球系を導入すると、血中のアラキドン酸代謝産物の有意な減少と大動脈

局所のマクロファージの浸潤抑制を介して炎症による動脈硬化病変の進行を抑制することを明らかにした。

審 査 結 果 の 要 旨

動脈硬化易発症マウス(ApoE^{-/-}cPLA₂ α ^{+/+})に致死線量に近い放射線を照射した後に、細胞質ホスホリパーゼ A₂ α 欠落マウス(ApoE^{-/-}cPLA₂ α ^{-/-})の骨髓細胞を移植した群と ApoE^{-/-}cPLA₂ α ^{+/+}マウスの骨髓を移植した群を用いて、血球系の細胞質ホスホリパーゼ A₂ α 欠損の動脈硬化発症への影響を比較検討した。ApoE^{-/-}cPLA₂ α ^{-/-}移植群において、血液中のアラキドン酸代謝産物の抑制と動脈硬化領域の有意な抑制を認めた。本研究は血球系のホスホリパーゼ A₂ α の欠落により、血漿中のアラキドン酸代謝産物の抑制効果と動脈硬化の抑制効果を誘導するという新たな知見を提示し、循環器内科と再生医療の分野での学術水準を明らかに高めたと認められる。