

学 位 論 文 題 名

Zymosan 誘導性肝炎における
オステオポンチンの関与の検討

学位論文内容の要旨

肉芽種の形成は、生体内の刺激物質を隔絶する為の主たる機構で、慢性炎症の形成をとる生体防御反応の一つである。Zymosan の投与により誘導される肝炎反応は、肉芽種形成に関与する分子機序の解析のためのモデルとして広く用いられている。

本研究では、様々な系統のマウスに Zymosan を経静脈投与し、その肝臓における肉芽種形成の系統差について組織学的に検討した。同時に、この炎症反応時の分子機序を明らかにするため、サイトカインやケモカインの mRNA 発現を RNA Protection Assays (RPA) 法にて解析した。また、inducible NO synthase (iNOS) の mRNA 発現レベルをリアルタイム polymerase chain reaction (PCR) にて解析した。

その結果、検討した全てのマウスにおいて、肝臓における肉芽種形成の程度に、系統間で明瞭な差異が認められた。すなわち B6、BALB/c、DBA 系統のマウスに比べ、C3H、CBA および SJL 系統のマウスの肉芽種形成は、数、大きさ共に低値であった。しかし、これまで肉芽種形成に重要と報告されているインターロイキン 1 β (IL-1 β)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、macrophage inflammatory protein (MIP) -1 α 、MIP-1 β 、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、regulated upon activation normal T cell expressed and secreted (RANTES) の発現の動態は、検討した全てのマウスにおいて有意差が認められなかった。また、これまで肉芽種形成への関与が示されている iNOS の mRNA 発現は、B6、BALB/c、DBA 系統で増強していたが、C3H、CBA および SJL 系統では有意な増加は認められなかった。

そこで我々は、Arg-Gly-Asp (RGD) アミノ酸配列を有する接着分子で、マクロファージやリンパ球等の炎症細胞に遊走能を示し、肝炎発症への関与が示唆されているオステオポンチン (OPN) の mRNA の発現レベルを解析した。その結果、解析を行った全ての系統において、Zymosan 投与に伴う OPN の mRNA 発現量の明瞭な変動は認められなかった。しかし、肉芽種形成が著明な B6、BALB/c および DBA 系統の OPN はアレル a および c であるのに対して、肉芽種形成の弱い C3H、CBA および SJL 系統のマウスは、アレル bOPN であった。

以上の結果から、Zymosan の投与により誘導される肉芽種形成は、OPN のアレル a および c を有するマウスに比して、アレル b 系統のマウスでは低形成であり、これはアレル b OPN の、iNOS の発現および炎症細胞の局所動員能の欠如に起因することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 小 野 江 和 則

副 査 教 授 小 林 邦 彦

学 位 論 文 題 名

Zymosan 誘導性肝炎における オステオポンチンの関与の検討

この学位論文では、様々な系統のマウスに Zymosan を経静脈投与し、その肝臓における肉芽種形成の系統差について組織学的に検討すると同時に、この炎症反応時の分子機序を明らかにするため、サイトカインやケモカインの mRNA 発現を RNase Protection Assays (RPA)法にて解析している。

その結果、肝臓における肉芽種形成の程度に、系統間で明瞭な差異が認められた。すなわち B6、BALB/c、DBA 系統のマウスに比べ、C3H、CBA および SJL 系統のマウスの肉芽種形成は、数、大きさ共に低値であった。しかし、これまで肉芽種形成に重要と報告されているインターロイキン 1 β (IL-1 β)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、macrophage inflammatory protein (MIP) -1 α 、MIP-1 β 、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、regulated upon normal T cell expressed and secreted (RANTES) の発現の動態は、検討した全てのマウスにおいて有意差が認められなかった。また、これまで肉芽種形成への関与が示されている inducible NO synthase (iNOS) の mRNA 発現をリアルタイム polymerase chain reaction (PCR) にて解析したところ、B6、BALB/c、DBA 系統で増強していたが C3H、CBA および SJL 系統では有意な増加は認められなかった。更に、Arg-Gly-Asp (RGD) アミノ酸配列を有する接着分子で、マクロファージやリンパ球等の炎症細胞に遊走能を示し、肝炎発症への関与が示唆されているオステオポンチン (OPN) の mRNA 発現レベルを解析した結果、解析を行った全ての系統において、Zymosan 投与に伴う OPN の mRNA 発現量の明瞭な変動は認められなかった。しかし、肉芽種形成が著明な系統の OPN はアレル a および c であるのに対して、肉芽種形成の弱い系統のマウスは、アレル b OPN であった。

以上の結果から Zymosan の投与により誘導される肉芽種形成は、OPN のアレル a、c を有するマウスに比して、アレル b 系統のマウスでは低形成であり、これはアレル b OPN の、iNOS の発現および炎症細胞の局所動員能の欠如に起因する可能性を示唆している。

この学位論文の公開発表に対して、まず副査の小林教授から、アレル b OPN とアレル a および c の機能を直接比較した実験について、また、OPN がどのインテグリンと結合す

るか、またそのインテグリンはどのような細胞に発現しているか、更に、iNOS の発現と OPN の関係や、ヒトにおける OPN アレルの有無や疾病との関連、あるいは OPN の一般的な機能のアレル間での差異について等の質問があった。次に、副査の小野江教授からは、OPN と iNOS の関係はどちらが上流か、又、肉芽種が低形成である群について、14、21 日と若干の増加傾向が認められることから、更に日数が経過すると肉芽が更に増加する可能性は無いかとの質問や、肉芽を構成する細胞群について、主体はマクロファージと思われるが、免疫染色による詳細な解析をすべきであるとの示唆がなされた。最後に主査の上出教授からの、OPN の機能のアレル間での差異について、より直接的に *in vivo* で検討する実験計画があるのか、との質問があった。

これらの質問に対し、申請者は自らの実験データや文献を引用しつつ、概ね妥当な答弁を行った。

この論文は、肉芽種性の炎症反応時の分子機序における OPN の機能について、アレル間での差異という観点から解析を試みたものであり、ヒトにおいても、従来のアレルに変わる Single Nucleotide Polymorphism (SPN)での多型が報告されていることから、疾病との関連についても更に研究が発展す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習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。