

学 位 論 文 題 名

Mixed allogeneic chimerism with wild-type strains
ameliorates atherosclerosis
in apolipoprotein E-deficient mice

(混合異系骨髄キメリズムはアポE欠損マウスにおける
動脈硬化病巣進展を抑制する)

学位論文内容の要旨

I. 背 景

動脈硬化病巣は、高脂血状態のもと血液細胞と血管組織間で誘導される複雑な炎症反応の結果形成される。初期病巣（脂肪斑; fatty streak）ではTリンパ球や変性脂質を貪食したマクロファージ（Mφ）が認められ、病巣進展に伴ってMφが活性化するとともに中膜平滑筋細胞が血管内皮下に遊走・泡沫化するようになり、複雑病変（線維性硬斑; fibrous plaque）へと進展する。現在、動脈硬化症征圧のため新たな動脈硬化危険因子の発見に注目が集まっている。中でも免疫系因子が動脈硬化発症・進展に深く関与していることが明らかになりつつあるが、いまだ危険因子の同定には至っていない。マウスは遺伝的背景がよく解析されており、多因子疾患である動脈硬化症の解析に有用である。高脂肪食を負荷することにより動脈硬化病巣を生じさせることができ、この病巣進展には近交系マウスの系統によって著明な差、すなわち病巣がはっきりと形成される感受性系統と、全く形成されない抵抗性系統が存在することが報告されている。さらに遺伝学的解析によって、複数の修飾遺伝子（modifier genes; *ath1*~*ath9*）の存在が予測されており、その一部がHDLコレステロールレベルを介して形質を規定していることが報告されている。しかし、これら修飾遺伝子の本態については大部分が不明であり、形質を規定する機能に関する報告もなされていない。

II. 目 的

本研究の目的は、動脈硬化モデルマウスを用いて血液細胞の動脈硬化病巣進展に及ぼす影響を検討し、動脈硬化進展修飾遺伝子の機能を明らかにし、さらに実験治療の可能性を検討することである。

III. 方 法

高脂血症を自然発症し、著しい動脈硬化病巣を呈する28-29週齢・雌 apoE ノックアウトマウス（apoE^{-/-}; C57BL/6 back, H-2^b）を11グレイ（Gy）全身放射線照射してレシピエントとした。動脈硬化抵抗性マウス; SJL/J(H-2^s)または動脈硬化感受性マウス; B10.S/SgSlc(H-2^s)より骨髄細胞を分離し、抗Thy1.2抗体と補体処理で成熟T細胞を除去したのち、レシピエント1匹当たり1.5×10⁷個と、レシピエントと同系のapoE^{-/-}由来骨髄細胞0.5×10⁷個を混合し、尾静脈より注入して骨髄キメラマウス（[SJL+apoE^{-/-}→apoE^{-/-}]、[B10.S+apoE^{-/-}→apoE^{-/-}]）を作製した。コントロールとして未処置 apoE^{-/-}マウス（apoE^{-/-}, NT）、同系移

植 apoE^{-/-}マウス ([apoE^{-/-}→apoE^{-/-}]) を用意した。各群とも普通食 (normal chow diet) で飼育し、骨髄移植施行 10 週目に、前夜より絶食にしたのち屠殺した。採取した末梢血は、一部フローサイトメトリーで白血球表面抗原の違いを利用して造血系細胞の置換を解析し、キメリズムを算出した。残りの血液から血清を分離し、総コレステロール値 (T-Cho)、HDL コレステロール値 (HDL-Cho)、中性脂肪値 (TG) を酵素法で測定した。apoE 蛋白レベルは、血清サンプルを 12%SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後プロットし、マウス apoE と交差する抗ラット apoE 抗体を用いて化学蛍光法でバンドを得たのちデンシトメトリーで解析した。キメラマウスのサンプルと同時にプロットした、未処置 SJL あるいは B10.S の apoE 発現量に対する割合を求めて比較検討の指標とした。また摘出した上行大動脈を含む心臓は、固定・包埋したのち、大動脈弁三尖とも含む面で 10 μm 厚の連続切片を作製し、Oil Red O で脂肪染色した。脂肪染色陽性の病巣をコンピュータ画像解析装置を用いて解析し、各群ともマウス 1 匹・1 切片当りの平均病巣面積を求め検定した。病巣の質的変化を検討するため一部の切片は Masson's trichrome 染色し、結合組織を評価した。

IV. 結 果

レシピエンマウスに致死量の放射線を照射したのち骨髄移植を行ない [SJL+apoE^{-/-}→apoE^{-/-}] 9 匹、[B10.S+apoE^{-/-}→apoE^{-/-}] 10 匹の骨髄キメラマウスを作製した。骨髄移植後 10 週目での末梢血を用いた FACS 解析では、[SJL+apoE^{-/-}→apoE^{-/-}] 77.5 ± 8.8%、[B10.S+apoE^{-/-}→apoE^{-/-}] 70.9 ± 6.5% が異系ドナー由来の白血球に置換しており、明らかな拒絶反応・GVHR は認められなかった。骨髄キメラマウスの血清脂質は、未処置 apoE^{-/-}マウスとくらべて HDL-Cho が両骨髄キメラマウス群で 2.5~2.6 倍とほぼ同程度上昇していた。動脈硬化惹起性 non HDL-Cho は、[SJL+apoE^{-/-}→apoE^{-/-}] 109 ± 15mg/dl、[B10.S+apoE^{-/-}→apoE^{-/-}] 42 ± 5mg/dl と、それぞれ未処置 apoE^{-/-}マウス 370 ± 11mg/dl の 29% および 11% であり、予想に反して動脈硬化感受性系統 B10.S で置換した骨髄キメラマウスの方が有意に低値を示した。骨髄移植による TG 値への有意な影響は認めなかった。Western blotting による血清 apoE は、ドナーの apoE^{+/+}マウス (SJL または B10.S) にくらべて、[SJL+apoE^{-/-}→apoE^{-/-}] 3.3 ± 0.4%、[B10.S+apoE^{-/-}→apoE^{-/-}] 3.0 ± 0.6% と低値ではあるが、両骨髄キメラマウス群では同程度の発現が認められた。従って、骨髄由来細胞の apoE 産生は、他の組織 (主に肝臓) の産生量に較べると低いと考えられた。骨髄移植施行前 (28-29 週齢) のレシピエント apoE^{-/-}マウスでは、広範囲に著しい動脈硬化病巣が認められ、10 週後には未処置 apoE マウスではさらに病巣が進展し、脂質沈着や中心部壊死を伴った泡沫細胞に富む複雑性病変が形成されていた。一方骨髄キメラマウス群では、病巣は大動脈弁周囲のみに局限して細胞成分に乏しく、細胞外マトリックスに富む安定化した状態に変化しており、泡沫細胞はほとんど認められなかった。定量評価の結果、未処置 apoE^{-/-}マウスにくらべて [SJL+apoE^{-/-}→apoE^{-/-}] 群で 4.7%、[B10.S+apoE^{-/-}→apoE^{-/-}] 群で 8.8% まで病巣は縮小し、改善度は動脈硬化抵抗性系統 SJL で置換した骨髄キメラマウスの方が著明であった。

V. 考 案

動脈硬化モデルマウス (apoE^{-/-}マウス) の血液細胞を部分的に apoE^{+/+}マウス由来の細胞で置換することにより、著しい動脈硬化病巣の縮小を認めた。病巣退縮の機序としては、HDL-Cho の上昇や non HDL-Cho の低下など、apoE^{-/-}マウスで認められる脂質代謝異常の改善が考えられる。また、発現はわずかであるが apoE 蛋白直接の抗動脈硬化作用 (泡沫化した Mφ からの脂質の引き抜きを促進、抗炎症作用) も挙げられる。さらに、病巣縮小の程度に対して、キメリズム、血清脂質、apoE 蛋白発現量などが与える影響を考慮するため、これらを共変数として処理し、多変量解析を行った。その結果、ドナーとして用いるマウスの系統 (骨髄由来細胞) が、脂質代謝と独立して動脈硬化病巣進展を規定していることが明らかとなった。SJL は未知の動脈硬化修飾遺伝子 *ath7* によって、動脈硬化抵抗性が規

定されているとの報告がある。今回の結果から *ath7* は骨髄由来細胞の性質を規定している可能性が示唆された。今後、遺伝子座の解明や詳細な機能解析が必要と思われる。

VI. 結 語

動脈硬化抵抗性マウス SJL の動脈硬化抵抗性は骨髄由来細胞の性質に由来しており、骨髄由来細胞が動脈硬化病巣進展を制御していることが示された。混合異系骨髄キメラは、動脈硬化性疾患の新しい治療法を探る上で有用と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 北 畠 顕
副 査 教 授 小野江 和 則

学 位 論 文 題 名

Mixed allogeneic chimerism with wild-type strains ameliorates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice

(混合異系骨髄キメリズムはアポE欠損マウスにおける
動脈硬化病巣進展を抑制する)

動脈硬化病巣は、高脂血症のもと血液細胞と血管組織間で誘導される複雑な炎症反応の結果形成される。現在、動脈硬化症発症のため新たな動脈硬化危険因子の発見に注目が集まっている。中でも免疫系因子が動脈硬化発症・進展に深く関与していることが明らかになりつつあるが、いまだ危険因子の同定には至っていない。マウスは遺伝的背景がよく解析されており、多因子疾患である動脈硬化症の解析に有用である。高脂肪食を負荷することにより動脈硬化病巣を生じさせることができ、この病巣進展には近交系マウスの系統によって著明な差、すなわち病巣がはっきりと形成される感受性系統と、全く形成されない抵抗性系統が存在することが報告されている。さらに遺伝学的解析によって、複数の修飾遺伝子 (modifier genes; *ath1*~*ath9*) の存在が予測されており、その一部が HDL コレステロールレベルを介して形質を規定していることが報告されている。しかし、これら修飾遺伝子の本態については大部分が不明であり、形質を規定する機能に関する報告もなされていない。申請者は血液細胞の動脈硬化病巣進展に及ぼす影響に着目して、骨髄キメラマウスを用いて動脈硬化進展修飾遺伝子の機能を明らかにし、さらに実験治療の可能性を検討した。方法は、高脂血症を自然発症し、著しい動脈硬化病巣を呈する 28-29 週齢・雌 *apoE* ノックアウトマウス (*apoE*^{-/-}) を致死量放射線照射してレシピエントとし、動脈硬化抵抗性マウス; SJL/J、または動脈硬化感受性マウス; B10.S/SgSlc より骨髄細胞を分離し、抗 Thy1.2 抗体と補体処理で成熟 T 細胞を除去したのち、レシピエント 1 匹当たり 1.5×10^7 個と、レシピエントと同系の *apoE*^{-/-} 由来骨髄細胞 0.5×10^7 個を混合し、尾静脈より注入して混合骨髄キメラマウス (*[SJL+apoE*^{-/-}*→apoE*^{-/-}], *[B10.S+apoE*^{-/-}*→apoE*^{-/-}]) を作製した。普通食で飼育し、骨髄移植施行 10 週目に屠殺した。採取した末梢血を用いてフ

ローサイトメトリーで造血系細胞の置換を確認し、残りの血液から血清を分離し、総コレステロール値、HDL コレステロール値、中性脂肪値を酵素法で測定した。また、血清 apoE 蛋白は western blotting をおこない評価した。摘出した上行大動脈から連続切片を作製し、Oil Red O で脂肪染色し病巣面積を求め検定した。骨髄キメラマウスでは、70-80%が異系ドナー由来の白血球に置換されていた。血清脂質では、動脈硬化惹起性 non HDL コレステロールが著しく低下し、動脈硬化感受性系統 B10.S で置換した骨髄キメラマウスの方が、抵抗性系統 SJL で置換した骨髄キメラマウスにくらべて有意に低値を示した。また血清 apoE は、わずかではあるが両骨髄キメラマウス群とも同程度発現していた。動脈硬化病巣は著しく縮小しており、改善度は動脈硬化抵抗性系統 SJL で置換した骨髄キメラマウスの方が著明であった。また、SJL の腹腔 M ϕ は B10.S のものと較べて、変性脂質の取り込みが少ないことを *in vitro* で明らかにした。申請者は、キメラマウスで認められた病巣退縮は、apoE⁺マウスで認められる脂質代謝異常の改善、apoE 蛋白直接の抗動脈硬化作用（泡沫化した M ϕ からの脂質の引き抜きを促進、抗炎症作用）、そしてドナーマウスの骨髄由来細胞によるものと推論し、未知の動脈硬化修飾遺伝子 *ath7* は骨髄由来細胞の性質を規定していると結論づけた。骨髄由来細胞が動脈硬化病巣進展を規定していることを示した報告はこれが初めてであり、今後の動脈硬化症治療の戦略として有望であることが示唆された。

学位論文公開発表後、副査の北島教授からアポ E 蛋白の機能について、キメラマウスでの結果の臨床応用への可能性について、また、主査の上出教授から、動脈硬化病巣における血管平滑筋細胞の関与について、マウス系統間での動脈硬化感受性の違いについて、キメラマウスで認めた動脈硬化退縮の考えられる機序について、また、副査の小野江教授から、SJL の抗動脈硬化作用の機序について、キメラマウスで認めたアポ E 蛋白の由来について質問がなされた。申請者は研究結果に基づいて、あるいは文献的知識を駆使して、誠実にかつ、概ね適切に回答し得た。

本論文は、綿密かつ精緻な免疫学的手法を駆使して、血液細胞の動脈硬化病巣進展に及ぼす影響を明らかにした上で、未知の動脈硬化修飾遺伝子 *ath7* の性質を解析し、今後の動脈硬化症治療研究に示唆と方向性を与えた点が高く評価される。

審査員一同は、これらの研究成果と申請者の豊富な知識ならびに科学に対する識見などをあわせ、申請者が博士(医学)を受けるに十分な資格を有するものと判定した。