

学 位 論 文 題 名

内頸動脈剥離術後プラークを用いた動脈硬化進展における 分子学的機序に対する検討

学位論文内容の要旨

背景と目的

動脈硬化は血管内皮細胞障害を端とし、単球の浸潤及びマクロファージへの分化、多量の脂肪吸収、炎症や線溶と関係を持ちながら、狭心症や心筋梗塞、脳梗塞をきたす。この一連の過程においてマクロファージが重要な役割をはたすことが知られている。動脈硬化巣内のプラークに存在するマクロファージには、向炎症性（M1）と抗炎症性（M2）の性格を持つものが同定されており、プラークの脆弱性に関連すると推測されているが、この関係については明らかではない。

また泡沫化細胞は脂肪滴の形で脂肪を貯留し、脂肪滴は構造蛋白 Adipophilin (ADRP) に囲まれていることが知られている。これまで構造蛋白の研究は主に脂肪細胞において進められており、脂肪滴は小型・未成熟な段階では ADRP にコートされているが、大型・成熟化に伴い同じく構造蛋白である Perilipin に置き換わり、Perilipin が脂肪分解酵素など様々な脂質代謝関連蛋白をコントロールすることで、脂肪貯留と分解双方の制御に関わって効率的に脂肪貯留し、更に脂肪毒性を軽減する可能性が示唆されている。しかしながらマクロファージにおけるこれら脂肪滴周囲蛋白の存在と働きに関しては未だ定説を得ていない。またこれまでの検討の多くはマウスをモデルとしていたが、ヒトとマウスのマクロファージでは VLDL 受容体の有無など性状が異なることも近年示されている。

そこで本検討ではヒト内頸動脈剥離術後検体のプラークに浸潤しているマクロファージの極性とプラークの脆弱性、臨床的なイベントの関係について検討し、さらにヒト末梢血由来の培養マクロファージを用いて泡沫化や炎症性と脂肪滴周囲蛋白(Perilipin と ADRP)との関連について明らかにすることを目的に研究を開始した。

方法

対象は内頸動脈剥離術を受けた患者で、得られたプラークは免疫染色、ウェスタンブロッティング、リアルタイム PCR によって解析された。現病歴や臨床的データは診療録から取

得し、狭窄率と安定性はエコーにより評価された。また健常人から採取した末梢血由来単球から分化・培養させたマクロファージに対して酸化 LDL・VLDL 添加を行い、それらに対して免疫染色、ウェスタンブロッティング、リアルタイム PCR を行いその変化を評価した。

結果

患者は先行する急性の脳虚血症状の有無により有症候群 (n=31)と無症候群 (n=34)に大別された。超音波エコーによる分析により、脆弱なプラークが有症候群で多く認められた (p=0.033、カイ二乗検定)。免疫染色およびウェスタンブロッティングでは、有症候群のプラークにおいては多数のマクロファージの浸潤が認められ、それらの大部分は M1 マクロファージであった、対して無症候群では M2 マクロファージが主に認められた。リアルタイム PCR によって、有症候群において M1 マーカーおよび向炎症性サイトカイン IL-6、ケモカイン MCP-1、MMP-9 の発現が有意に増加していた。

また免疫染色とウェスタンブロッティングからプラーク内マクロファージにおいて脂肪滴周囲蛋白である Perilipin および ADRP 両者の存在を確認した。主に ADRP は有症候群性プラークに発現し、対して Perilipin は有症候群と共に無症候群にも存在が認められた。リアルタイム PCR では無症候群に対する有症候群の相対的 mRNA 発現は ADRP で有意に高値 (3.4 倍) だった。またマクロファージに酸化 LDL 及び VLDL を添加すると、Perilipin でコートされる大型の脂肪滴と ADRP でコートされた小型の脂肪滴が併存して認められた。中性脂肪は主に Perilipin の発現する大型の脂肪滴内に貯留されていた。

結論

本検討において、有症候群性プラークには、向炎症性の M1 マクロファージの浸潤を多く認め、炎症や線溶の亢進、脂肪滴周囲蛋白である Perilipin と ADRP 両者の発現増加を認めた。対して、無症候群性プラークにはマクロファージの浸潤が少なく、発現しているほとんどが抗炎症性の M2 マクロファージで、Perilipin の発現を認めるものの ADRP の発現を認めなかった。ヒトマクロファージでは酸化 LDL によるコレステロールエステルの貯留と同様に VLDL を介した中性脂肪の貯留も泡沫化細胞の形成に重要であり、脂肪滴周囲構造蛋白のうち Perilipin は効果的かつ安定した脂肪貯留に重要な役割を果たし、マクロファージの状態を抗炎症性に保っている可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	筒井裕之
副査	教授	三輪聡一
副査	教授	松居喜郎
副査	教授	渥美達也

学位論文題名

内頸動脈剥離術後プラークを用いた動脈硬化進展における 分子学的機序に対する検討

動脈硬化は血管内皮細胞障害を端とし、単球浸潤及び脂肪吸収、炎症・線溶と関係を持ちながら、狭心症や心筋梗塞・脳梗塞に至る原因となるが、マクロファージが重要な役割をはたすことが知られている。動脈硬化巣プラークに存在するマクロファージには、向炎症性（M1）と抗炎症性（M2）の性格を持つものが同定されておりプラークの脆弱性に関連すると推測されているが明らかではない。脂肪細胞内では Adipophilin（ADRP）や Perilipin 等周囲蛋白に囲まれて脂肪は貯留されるが、マクロファージにおける脂肪滴周囲蛋白の存在と働きに関しては未だ定説を得ていない。本検討では、ヒト内頸動脈剥離術後プラーク内マクロファージの極性とプラークの脆弱性、臨床的なイベントの関係について検討し、さらにヒト末梢血由来の培養マクロファージを用いて泡沫化や炎症性と脂肪滴周囲蛋白との関連について明らかにすることを目的とした。免疫染色およびウエスタンブロッティング、内頸動脈内膜剥離術後プラークでは先行脳虚血症状を有する群において多数のマクロファージの浸潤が認められ、それらの大部分は M1 マクロファージであったことを明らかにした。対して無症候群では M2 マクロファージが主に認められた。リアルタイム PCR によって、有症候性群において M1 マーカーおよび向炎症性サイトカイン IL-6、ケモカイン MCP-1、MMP-9 の発現が有意に増加していた。また ADRP および Perilipin 両者の存在を確認した。ADRP は有症候性プラークで発現が増加し、Perilipin は有症候群と共に無症候群にも存在が認められた。次にヒト末梢血由来単球から分化させたマクロファージに酸化 LDL 及び VLDL を添加すると、Perilipin でコートされる大型の脂肪滴と ADRP でコートされた小型の脂肪滴が併存して認められた。中性脂肪は主に Perilipin の発現する大型の脂肪滴内に貯留されていた。以上本検討において、プラーク内マクロファージの有する性格とプラークの安定性、臨床的脳虚血性疾患との関連性を示した。また脂肪滴周囲構造蛋白、特に Perilipin

は効果的かつ安定した脂肪貯留に重要な役割を果たし、マクロファージの状態を抗炎症状態に保つ可能性が示唆された。

質疑応答では、副査松居教授から、マクロファージとプラーク破綻の因果、特に申請者の検討とは逆にプラークが破綻することが引き金となってマクロファージが浸潤した可能性について質問があった。次いで副査三輪教授から、VLDL コレステロール受容体の構造や VLDL コレステロールとの結合部位・方式について、また松居教授の質問を受けてマウスやウサギなどの実験動物を用いて、プラークの発生や増大、破綻を来させ解析する検討を今後行う可能性と必要性について質問があった。次いで主査筒井教授から、マクロファージが含有する脂肪滴の大きさの規定について、脂肪滴を囲む脂肪滴周囲蛋白について、小脂肪滴が含有する脂質の内容について質問があった。次いで副査渥美教授から、マクロファージをプラークへ浸潤させる、また M1/M2 マクロファージへの分化を運命づける、それぞれの因子について、またプラークへ沈着するコレステロールの種類についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は概ね適切に回答した。

この論文は、動脈硬化の担い手であるマクロファージの有する炎症・線溶に対する性格と、プラークの脆弱性及び脳虚血疾患の発症との関連を明らかにし、更にマクロファージが貯留する脂肪について明らかにした点で高く評価され、本論文の成果から今後さらなる動脈硬化の病態解明と新しい治療開発が期待される。

審査委員一同は、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。