

論文の内容の要旨

論文題目 若年者への同種血管移植後グラフト石灰化促進の機序に
関する基礎的検討

指導教員 高本眞一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 山内治雄

【序論】同種組織片(ホモグラフト)は心臓血管外科手術において世界的に使用され、本邦でも頻度は増している。その特徴として、他の人工弁・血管に比べ組織適合性、術後抗凝固療法の回避、抗感染性等の利点を有する一方、長期耐久性に問題を残している。また、種々の先天性心奇形の血行再建手術において有効な補填組織となるが、若年者への移植後は早期から石灰化を伴うグラフト変性や機能不全が問題であり、その機序や有効な治療法は未だ不明である。本研究では若年者への移植後ホモグラフト石灰化の促進機序に関して、移植後グラフト石灰化に影響するドナー、レシピエントの年齢因子(実験1)、若年者への大動脈移植後グラフト石灰化促進の機序(実

験2)、ラット大動脈中膜平滑筋細胞(RAOSMCs)の TNF- α 刺激、高リン刺激に対する反応(実験3)、体内リン量変化が術後グラフト石灰化に及ぼす影響(実験4)、同種異型移植に伴う免疫応答がグラフト石灰化に与える影響(実験5)について検討した。

【実験1の方法と結果】Lewis ラットを用い、ドナーの下行大動脈をレシピエントの腹部皮下に移植した(同種同系移植)。生後3週をjuvenile(J)、10週をadult(A)と定義し、adult から adult へ移植(A-A 群)し、以下 A-J 群、J-A 群、J-J 群を作成し、7、14、28、56 日後に各々グラフトを摘出した。移植前の A、J グラフトを Preope 群とした(各群 n=6)。J-J 群は移植 7 日後からグラフト中膜の著明な石灰化が出現し、A-J 群も軽度石灰化が出現したが、Preope 群、A-A 群、J-A 群に石灰化はなかった(von Kossa 染色)。グラフト中カルシウム(Ca)量(原子吸光度法)は、Preope 群で有意差はなく、レシピエント年齢の比較では、A-J 群は A-A 群に比べ、J-J 群は J-A 群に比べ有意に増加した($p<0.05$)。一方、ドナー年齢の比較では、A-A 群と J-A 群間で差はなく、J-J 群は A-J 群の 1.5~1.8 倍の高値を示したが有意差はなかった。従って、移植後グラフト石灰化には、Juvenile レシピエントが主要な促進因子となり、Juvenile ドナーは付加的効果を持つと考えられた。

【実験2の方法と結果】同種同系移植モデルを実験1と同様に Adult-Adult 間(A 群)、Juvenile-Juvenile 間(J 群)で作成し、移植後 7、14、28 日後に採血、グラフト摘出を行

った。血中無機リン(Pi)は移植前後を通し J 群が A 群に比べ高値であった($p < 0.05$)のに対し、血中 Ca、血中 $1,25(\text{OH})_2\text{Vitamin D}_3$ は両群間で差はなかった。グラフト中 Ca 量は J 群で有意に増加し($p < 0.05$)、組織中 Pi 量も同様の結果を示した($p < 0.01$)。透過型電子顕微鏡(TEM)では、年齢に関わらず移植後は中膜細胞のアクチン線維の退縮、粗面小胞体の発達、基質小胞の分泌像が観察され、J 群では基質小胞内と細胞外基質で石灰化を伴った。免疫組織染色では、年齢に関わらず Preope 群に比べ移植後に中膜の α -SMA の発現は減少し、マクロファージ(CD68)、骨マーカー(Runx2、osteopontin)の発現は、J 群の石灰化部位で濃く発現し、J 群の非石灰化中膜、Adult 群中膜では薄く発現した。遺伝子発現の比較(realtime RT-PCR 法)では、Preope 群に比べ炎症性マーカー(TNF- α 、IL-6)は 3~5 倍に増加し、筋原性マーカー(α -SMA、SM22)は 10~20%に減少し、骨原性マーカー(BMP2、Runx2、osteocalcin、osteopontin)は各々 4 倍、7 倍、3 倍、14 倍に増加した。Ⅲ型ナトリウム・リン共輸送体(PiT-1)の発現も移植後 5~6 倍に増加した。いずれも移植前後で有意変化を示したが、年齢差は小さく同様の推移を示した。さらに、石灰化抑制因子であるピロリン酸の生成酵素 Enpp1 と輸送体 Ank の発現は移植後に 10~15 倍に増加した一方、ピロリン酸のグラフト中含量は、移植前後の差と年齢差はなかった。従って、年齢を問わず移植刺激による非特異的炎症が中膜細胞の骨芽細胞様形質転換を惹起し、グラフトへの Pi 取り込みは PiT-1 を介して増加し、ピロリン酸は移植後に代謝亢進

するが組織中濃度は一定であり、これらはJ群の石灰化促進に直接寄与しないと推察され、J群特有の高リン血症が細胞外基質へのリン酸カルシウム沈着を促進する可能性が疑われた。

【実験3の方法と結果】RAOSMCsをTNF- α (50ng/ml)投与群{TNF α (+)群}と非投与群{TNF α (-)群}に分け低リン(Pi;1.5mM)培地で7日培養後、 α -SMAとRunx2、 α -SMAとosteocalcinの組み合わせで細胞二重蛍光免疫染色を行った。TNF α (+)群は(-)群に比べ α -SMA発現が減少し、Runx2、osteocalcin発現が増加した。一方、RAOSMCsにTNF- α を0.1~100ng/mlで加え7日培養後のrealtime RT-PCRの結果、TNF- α 濃度依存性に α -SMA、SM22の減少、Runx2、osteocalcinの増加を有意に認めた。また、TNF α (+)群、(-)群に、低リン(Pi;1.5mM、LP群)、高リン(Pi;4.5mM、HP群)を組み合わせ計4群とし14日培養の結果、TNF α -HP群のみで細胞石灰化が出現し(von Kossa染色)、TNF α (-)両群に比べTNF α (+)両群ではアクチン線維の減退、粗面小胞体の発達を認め、さらにTNF α -HP群では基質石灰化を伴った(TEM)。また、TNF α (-)群、(+群)に培地中Pi濃度を1.5~4.5mMと変化させた後のCa定量(OCPC法)の結果、TNF α (+)群は(-)群に比べPi濃度依存性にCa量が有意増加した(p<0.0001)。一方、 α -SMA、Runx2、osteocalcinの発現量はPi濃度による有意差はなかった(realtime RT-PCR)。従って、TNF- α 刺激によりRAOSMCsの骨芽細胞様形質転換が惹起され、さらにPi負荷が加わると石灰化が促進されることから、移植後グラフト石

灰化には中膜平滑筋細胞に対する炎症刺激と高リン血症が重要な役割を持つと考えられる。

【実験4の方法と結果】標準食(NP; Pi 0.9%)、低リン食(LP; Pi 0.2%)、高リン食(HP; Pi 2.0%)を準備した。Juvenile 群移植モデルを実験2と同様に作成し、ドナーに NP、レシピエントに NP または LP を与えた(NP 群、LP 群)。また、NP 群のうち移植時から Pit-1 抑制薬である phosphonoformic acid (PFA; 30mg/kg/day)を osmotic infusion pump を用いて投与した群も比較した(NP+PFA 群)。移植 14 日後、採血しグラフトを摘出した。血中 Pi 濃度は、NP 群に比べ LP 群は有意に低値となり、NP+PFA 群は有意差がなかった。NP 群グラフトは著明な中膜石灰化が出現したが、LP 群、NP+PFA 群では石灰化は著減した(Von Kossa 染色)。グラフト中 Ca 量(原子吸光度法)は NP 群に比べ、LP 群($p<0.005$)、NP+PFA 群($p<0.05$)共に有意に低値となった。グラフト中 Pi 量も同様の結果を示した($p<0.01$)。α-SMA、CD68、Runx2、osteocalcin は各群の発現が同程度で(免疫組織染色)、TNF-α、Pit-1、Runx2、osteocalcin の発現は各群間で有意差はなかった(realtime RT-PCR)。一方、Adult 群に HP 食または NP 食を与え移植 14 日後にグラフトを摘出した結果、HP 群は中膜一部に石灰化が出現し(von Kossa 染色)、NP 群に比べグラフト中 Ca 量、Pi 量は有意に高値を示した($p<0.005$)。従って、組織中 Pi 濃度がグラフト石灰化の決定因子で、血中 Pi 濃度と Pit-1 を介した組織中 Pi 取り込みが影響すると考えられる。

【実験5の方法と結果】Brown Norway から Lewis へ皮下移植を行い Allo 群とした。対照に Lewis 間移植 (Syn) 群を用いた。Juvenile 移植の検討では、Syn 群には NP 食、Allo 群には NP または LP 食を与え、移植 14 日後に各グラフトを摘出した。Syn 群、Allo-NP 群ではグラフト中膜石灰化を認めたが、Allo-LP 群では石灰化は出現しなかった (Von Kossa 染色)。移植前に比べ Syn 群、Allo 群は同等にグラフト中 Ca が増加した ($p < 0.0005$) が、Allo-LP 群では移植前と同レベルに抑制された ($p < 0.0005$)。Adult 移植の検討では、Adult-Allo 群は Adult-Syn 群に比べグラフト中膜に僅かに石灰化が出現し、グラフト中 Ca 量が有意に増加した ($p < 0.05$)。また、年齢を問わず Allo 群は Syn 群に比べ、CD68 陽性細胞がより増加し、 α -SMA 発現はより減退した (免疫染色)。従って、Adult 群では免疫応答がグラフト石灰化の軽度促進作用を示したが、Juvenile 群でのグラフト石灰化促進は無機リンが強く関与し免疫応答の影響は小さいと考えられた。

【結語】本研究から、若年者への同種血管移植後グラフト石灰化促進には免疫応答の影響は小さく、石灰化促進の決定因子は高リン血症である。また、移植に伴う炎症性サイトカイン ($\text{TNF-}\alpha$) 刺激によるグラフト中膜平滑筋細胞の骨芽細胞様形質転換が前提となる。石灰化予防としてリン抑制治療が有効と考えられる。(4,000 字)