

審査の結果の要旨

氏名 山内 治雄

本研究は若年者への同種組織片(ホモグラフト)移植後の石灰化促進の機序を明らかにするため、ラット大動脈皮下移植モデル及びラット大動脈平滑筋細胞(RAOSMCs)培養系を用いて石灰化の定性定量解析、及び炎症性・筋原性・骨原性各遺伝子の発現解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 同種同系ラット(Lewis-Lewis 間)大動脈皮下移植の結果、Adult(生後 10 週)に比べ Juvenile(生後 3 週)がレシピエントの場合、移植後グラフト中膜弾性版に沿って石灰化が出現し、特にドナー、レシピエント両方が Juvenile の場合に石灰化は著明となった。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ことが示された。
2. 移植前後の血漿検査の結果、JuvenileはAdultに比べ血中無機リン(Pi)濃度が高く、血中カルシウム(Ca)、 $1,25(\text{OH})_2\text{Vitamin D}_3$ に差はなかった。グラフト中 Pi 量は Ca 量と同様に Juvenile 移植前後で増加した。透過型電子顕微鏡(TEM)では移植後グラフトの中膜平滑筋細胞の収縮型から分泌型への形質転換が両年齢で示され、免疫組織染色では移植後グラフトは、中膜の筋原性タンパク(α -SMA)発現が減少し、マクロファージ(CD68)、骨原性タンパク(Runx2、osteopontin)の新たな発現が見られ、Juvenile 移植後の石灰沈着部位で著明であった。一方、realtime RT-PCR 法では、移植前後で筋原性遺伝子(α -SMA、SM22)は減少し、炎症性(TNF- α 、IL-6)、骨原性(BMP2、Runx2、osteocalcin、osteopontin)、Ⅲ型ナトリウム・リン共輸送体(PiT-1)の各遺伝子発現は増加したが、いずれも年齢差はなかった。さらに、組織中の石灰化抑制因子であるピロリン酸の含有量は、移植前後、年齢によって差はなかった。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、ピロリン酸の組織中濃度は一定であり、これらは juvenile 移植後のグラフト石灰化促進に直接寄与しないと推察された。若年齢特有の高 Pi 血症が細胞外基質へのリン酸カルシウム沈着に直接作用する可能性が疑われた。
3. RAOSMCs を TNF- α 投与下で培養した結果、細胞形態が収縮型から分泌型へ変化し、 α -SMA 発現が減少し、Runx2、osteocalcin 発現が増加した。また、TNF- α 刺激に Pi 刺激を加えると、両刺激が併存した RAOSMCs のみで石灰化が出現し、細胞中 Ca 量が増加した。一方、Pi は α -SMA、Runx2、osteocalcin 発現量に変化を及ぼさなかった。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 Pi 血症の併存が重要な役割を持つと考えられた。

4. ラット大動脈皮下移植モデルに Pi 調整食を組み合わせ、グラフト石灰化を検討した結果、低 Pi 食は Juvenile ラットの血中 Pi 濃度、移植後グラフト中 Ca、Pi 量を低下させ石灰化を抑制した。Pit-1 抑制効果を持つ phosphonoformic acid(PFA)投与後も同様のグラフト石灰化抑制効果が認められたが、血中 Pi 濃度の変化はなかった。グラフト中 α -SMA、Runx2、osteocalcin 発現は Pi 抑制による影響がなかった。一方、Adult ラットに高 Pi 食を与えると、移植後グラフトの Ca、Pi 量が増加しグラフト石灰化が出現した。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た。
5. 移植後グラフト石灰化に及ぼす免疫応答の影響を、同種異系ラット(Brown Norway - Lewis 間)大動脈皮下移植(allo 移植)を用いて Lewis 間移植(syn 移植)と比べた結果、Juvenile ラットでは、allo 移植後は syn 移植後と同等に石灰化が出現し、allo 移植に低 Pi 食を組み合わせると移植後グラフト石灰化は抑制された。一方、Adult ラットでは、allo 移植後は syn 移植後と異なり、僅かにグラフト中膜石灰化が出現した。免疫応答(拒絶反応)は、Adult 群ではグラフト石灰化の軽度促進作用を示したが、Juvenile 群ではグラフト石灰化促進は Pi が強く関与し免疫応答の影響は小さいと考えられた。

以上、本論文はラット大動脈皮下移植モデル及び RAOSMCs 培養系において、若年齢で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、移植に伴う炎症性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深くかわり、高 Pi 血症が石灰化促進の決定因子となり、Pi 抑制治療がグラフト石灰化予防に有効であることを明らかにした。本研究は、今まで心臓血管ホモグラフト移植後のグラフト不全の要因として考えられながら未解明に等しかった、若年齢による移植後グラフト石灰化促進の機序の解明、及び将来のグラフト生存率延長に向けた治療法の確立に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。