

論文の内容の要旨

論文題目：若年者移植血管片石灰化における TNF- α の関与の検討

指導教員 小野 稔

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

吉井 剛

移植血管グラフトの石灰化は、同種組織移植医療において、移植グラフトの耐久性にかかわる大きな問題である。特に若年者レシピエントにおいては、石灰化は移植後早期に起こりグラフト機能不全の原因となる。若年レシピエントでグラフト石灰化が早期に起こる理由として、若年レシピエントでは成年レシピエントと比較して拒絶反応が強く起こることが原因だとする報告や、若年レシピエントの血中リン濃度が成年レシピエントより高値であることが原因だとする報告がある。組織移植グラフトに起こる変化を検討する手段として、皮下移植モデルがあり、弁・血管グラフトの移植後変化の研究に広く用いられている。血管グラフトの皮下移植モデルでは血管内腔に血流は無く、組織への血液

供給形態も異なり、皮下組織中の Fibroblast などの影響もあることから、内腔に血液が流れる in situ 移植での血流モデルとは組織の変性が異なったものとなることが予想される。しかし、過去の報告によれば、血流モデルと比較して早期に組織変性をきたすものの、起こる組織変性には差はない。

移植血管グラフト石灰化の機序として、血管中膜平滑筋細胞 (Vascular smooth muscle cell; VSMC) が骨芽細胞 (Osteoblast) 様形質転換をきたすことにより中膜石灰化をきたすことが知られており、これは移植によるものではない通常の血管石灰化の機序と酷似している。血管石灰化において、VSMC の骨芽細胞様形質転換の際には、筋原性マーカーである α -SMA、SM22 の発現が減少する脱分化の後、骨芽細胞分化の調節因子である runt-related transcription factor 2 (RUNX2, Core binding factor α 1; Cbfa1) の発現が増加し骨芽細胞様細胞へと形質転換することが知られている。RUNX2 は Bone morphogenetic protein 2 (BMP2)、Fibroblast growth factor (FGF)、レチノイン酸などによって発現促進され、tumor necrosis factor- α (TNF- α) によって発現抑制される。BMP2 は RUNX2 以外に msh homeobox 2 (MSX2) も発現促進させる。MSX2 は間葉系前駆細胞の骨芽細胞への分化を促進させ、脂肪細胞への分化を抑制する働きを持っており、石灰化血管において MSX2 の発現が促進されていることも知られている。

糖尿病患者や慢性腎不全患者では、特に TNF- α を中心とする炎症系マーカーの上昇を伴う軽度の炎症状態にあり、TNF- α は血管石灰化を促進させる因子としても知られている。培養 VSMC への TNF- α 刺激では、用量依存性に ALP の発現増加とカルシウム沈着をきたし、形態的にも骨芽細胞様細胞へと変化する。また、マウスに SM22-TNF- α 遺伝子を導入し血管中 TNF- α の発現を増強させると、血管中 MSX2 発現も増強するという報告がある。また LDLR 欠損マウスに高脂肪食投与すると血管石灰化を誘発できるが、TNF- α 中和抗体である infliximab を投与すると血管での BMP2、MSX2 発現を抑制できることも報告されている。これらより、TNF- α は BMP2、MSX2 の発現を増強させると考えられている。大動脈外膜筋線維芽細胞への TNF- α 刺激では MSX2 発現が BMP2 発現に先行して起こり、BMP2 阻害物質の noggin によっても MSX2 発現増強は抑制されなかったことより、BMP2 と MSX2 は TNF- α 刺激によりそれぞれ独立して発現増強すると考えられている。これらの結果より TNF- α は BMP2、MSX2 の発現をそれぞれ促進させることで、血管石灰化を促進させていると考えられる。

今回の実験は、血管皮下移植モデルを用い Wild type マウスと TNF- α Knock-out マウスをそれぞれレシピエントとし、それぞれでの移植血管グラフトの組織学的変化とグラフト中の石灰化関連因子の変化を調べることで、移植

血管グラフト石灰化における TNF- α の関与を検討することである。今回の実験では拒絶反応による免疫応答の影響を除外するために、拒絶反応を起こさない同種同系移植モデルでの検討を行った。

7 週齢のオス C57BL/6J マウスをドナーとし、3 週齢のオスマウスをレシピエントとして、マウス同種同系血管皮下移植モデルを作成した。レシピエントにはそれぞれ Wild type (WT)として C57BL/6J マウスを、TNF- α Knock-out (KO)として C57BL/6J TNF- α (-/-)マウスを用いた。ドナーマウスより遠位弓部～腹部大動脈を摘出し、レシピエントマウスの腹部皮下に移植。21 日後に摘出した。両群と比較するための Control として 7 週齢のオス C57BL/6J マウスの遠位弓部～腹部大動脈を採取し Fresh graft (FG) 群とした。各群は n=6 とした。

組織染色は、HE 染色、VonKossa 染色、EVG 染色をそれぞれ行い、 α -SMA、CD68 の免疫染色を行った。Real-time PCR にて、TNF- α 、 α -SMA、SM22、BMP2、RUNX2、MSX2、Osteocalcin(OCN)、Osteopontin(OPN)の発現を定量し各群で比較した。Internal control として β -actin を用いた。定量はスタンダードサンプルに対する相対定量で行い、internal control に対する比率で各 mRNA 発現を定量した。

統計学的解析は ANOVA 多群間検定を行い、各群間比較には Turkey 検定を用

いた。p<0.05 を統計学的優位差ありと判断した。統計学的解析には統計解析ソフト JMP 8.0 を使用した。

VonKossa 染色では WT 群の 6 検体中 3 検体で中膜層の石灰化を認めた。石灰化の軽微な部分では中膜弾性板に沿って点状石灰化を認め、石灰化の著明な部分では中膜弾性板に層状に石灰化していた。一方 KO 群では 1 例のみ中膜弾性板に軽微な石灰化を認めるのみであり、半定量的ではあるものの KO 群では移植後グラフト石灰化が抑制されている可能性を認めた。FG 群では中膜弾性版は整列しており、VSMC も扁平な形態を保っていたが、WT 群・KO 群ともに移植後グラフトでは中膜弾性版の配列が乱れ、VSMC も円形状な形態をしたものが散見されており、WT 群・KO 群とともに VSMC は同様の形態的变化を起こしていると考えられた。また中膜・外膜に炎症細胞の浸潤を認めた。免疫染色では、FG 群では中膜平滑筋層に発現していた α -SMA が、WT 群・KO 群ともに発現が消失しており、VSMC での α -SMA 発現が低下していると考えられた。またマクロファージの細胞表面マーカーである CD68 は、FG 群で CD68 陽性細胞を認めなかったのに対し、WT 群・KO 群ともに中膜層、中膜外膜層境界を中心に CD68 陽性細胞が散見され、WT 群・KO 群ともに同様の炎症反応を起こしていると考えられた。

移植後血管グラフト中の TNF- α 発現は WT 群では優位に上昇していたが、

KO 群では FG 群と優位差は無く、移植後血管グラフトに発現している TNF- α はレシピエント由来であることが確認された。 α -SMA、SM22 の発現は WT 群・KO 群ともに FG 群と比較して有意に低下しており、2 群間に有意差は無かった。これより WT 群・KO 群ともに、TNF- α の有無にかかわらず VSMC はその筋原性マーカーを失い、脱分化を起こしていることが判明した。BMP2、MSX2 の発現は WT 群で FG 群と比較して優位に上昇していたが、KO 群では FG 群と有意差は無かった。これは TNF- α 刺激により BMP2、MSX2 発現がそれぞれ刺激されるという過去の報告と矛盾はない。RUNX2 発現は WT 群・KO 群ともに FG 群と比較して有意に上昇しており、WT 群・KO 群の 2 群間では有意差は無いものの KO 群の方が高い傾向にあった。BMP2 発現に有意差があるにもかかわらず、RUNX2 発現に有意差が無い原因として、RUNX2 は BMP2 以外の刺激、例えば皮下組織中の FGF の刺激によって発現が増加している可能性が挙げられる。また有意差が無いものの KO 群のほうが高値である傾向にあったことは、TNF- α が RUNX2 発現に抑制的に働くことが影響しているかもしれない。WT 群・KO 群間で RUNX2 発現に有意差は無かったが、OCN 発現は WT 群では FG 群と比較して有意に上昇しており、KO 群では FG 群と有意差は無かった。OCN は通常 MSC から Osteoblast へ分化する経過の中で、分化の後期で発現し、骨形成に促進的に働くと考えられており、このことは KO 群で移植後血管グラ

フト石灰化が抑制されている可能性と矛盾しない。OPN 発現は WT 群・KO 群ともに FG 群と比較して有意に上昇しており、WT 群・KO 群の 2 群間の比較では KO 群は WT 群より低値の傾向はあったが有意差は無かった。OPN は骨芽細胞分化の過程の中で OCN よりも早期に発現する。WT 群と KO 群での OCN 発現と、OPN 発現の状況からは、VSMC が形質転換を起こし Osteoblast 様細胞へと分化していく中で、KO 群では WT 群と比較して分化段階が未熟な段階でとどまっている可能性がうかがえる。これは、間葉系前駆細胞の骨芽細胞への分化を促進させる働きを持つ MSX2 が KO 群で発現が増加していないこととも矛盾しない。

以上の結果より、移植血管グラフト中 VSMC の脱分化には TNF- α の有無は影響を与えていないが、TNF- α は BMP2、MSX2 の発現を促進させることで移植血管グラフト石灰化を促していると考えられる。TNF- α を抑制することで、グラフト中 VSMC が骨芽細胞様細胞への形質転換の中で分化が未成熟な段階でとどまり、グラフト石灰化を抑制できる可能性がある。