

氏名(本籍)	荒 ^{あら} 木 ^き 真 ^{まさ} 裕 ^{ひろ} (山形県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第2,144号		
学位授与年月日	平成11年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	ヒト動脈硬化病変におけるリポ蛋白リパーゼ(LPL)の解析とヒトLPL遺伝子を導入したトランスジェニックウサギの作製		
主査	筑波大学教授	医学博士	山下 亀次郎
副査	筑波大学教授	医学博士	三輪 正直
副査	筑波大学教授	医学博士	岡戸 信男
副査	筑波大学助教授	医学博士	野村 文夫
副査	筑波大学講師	医学博士	宮内 卓

論文の内容の要旨

(目的)

ヒトの動脈硬化の危険因子の一つとして、レムナントリポ蛋白が注目されている。そこで、レムナント形成および代謝に密接する関連するリポ蛋白リパーゼ(LPL)に着目した。LPLは血管内のカイロミクロン(CM), VLDLを加水分解し、それぞれCMレムナント, 中間密度リポ蛋白質(IDL)とする作用をもっている。

本研究では、まずヒトの剖検例と手術例からの各種動脈組織を用い、LPLが動脈硬化病変の進展にどのように関与しているのかについて、病変部位に存在するマクロファージとLDLの関連性を病理組織学的手法により検討した。次いで、レムナントリポ蛋白代謝と動脈硬化の発症・進展を検討するためLPLトランスジェニックウサギを作成しLPLの発現についても検討を加えた。

(対象と方法)

1) 動脈硬化病変におけるLPLの局在に関する検討

剖検例(12例)および手術例(11例)から大動脈, 冠状動脈, 内頸動脈などの検体を得た。Hematoxylin eosin(HE)染色でBushaらの方法により3種類, 即ち, (1)内膜肥厚(肉眼的にはほぼ正常であるが, 組織学的には内膜の肥厚, 中膜平滑細胞の内膜への遊走など)(2)脂肪斑(マクロファージとTリンパ球が内膜へ浸潤し集塊の形成およびマイクロファージの泡沫細胞化など)(3)粥腫プラーク(大量に貯留した脂肪や壊死した泡沫細胞が無構造のlipid coreを形成しfibrous capが覆っており, lipid coreの近傍にはマクロファージ, Tリンパ球が密集して存在)に分類した。免疫組織染色のため一次抗体として, 抗 α 平滑筋アクチン抗体, 抗CD68抗体, 抗apoE抗体, 抗LPL抗体を用いて行った。また, マクロファージ, LPLおよびapoEの関連性について二重免疫染色により検討した。

2) ヒトLPLトランスジェニックウサギの作製

オスと交尾させたDonorウサギから採取した受精卵にヒトLPL遺伝子導入ベクターLPL pCAL-1(chicken β -actin promoter)とLPL pAL-1(Fxba-A1 promoter)をマイクロインジェクションした。その受精卵を偽妊娠させたRecipientウサギの卵管に移植した。出生した仔ウサギの耳組織からDNAを抽出し, Southern blotting法, PCR法で遺伝子導入を確認した。また, 遺伝子発現様式と組織分布を解析するため, Northern blotting法, In situ hybridization法, 免疫組織染色を行った。

(結果)

1) 動脈硬化病変におけるLPLの局在

内膜肥厚群では、LPLは内膜・中膜の平滑筋細胞を中心に動脈壁の内膜・中膜、外膜のいずれにも認められた。apoEは内膜に分布し内膜と外膜には認められなかった。脂肪斑群、粥腫性プラーク群にはマクロファージ系細胞が内膜に集簇しPLPで強陽性を示した。二重免疫組織染色では、Kp-1で陽性のマクロファージにPLPが染色された。apoEは脂肪斑の内膜、特にマクロファージに認められた。二重免疫染色では、マクロファージの大部分にapoEが同時に存在した。また、粥腫性プラーク群のlipid coreはLPL, apoEともに陽性であった。

2) 作成したヒトLPLトランスジェニックウサギにおけるLPLについて

LPL pCAL-1, pAL-1ともに遺伝子の導入がSouthern blotting, PCPでそれぞれ6羽に確認された。最初に成長した遺伝子導入ウサギはLPL pCAL-1を導入したものでLO1と名づけた。Northern blottingでLPLの発現は胃、腎臓、心臓、肝臓、脳、骨格筋、大動脈の順に強く認め、肝臓には殆ど発現をみなかった。LO1ウサギではLPL蛋白量, LPL活性値ともにヒトの場合と同程度に認められ、ヘパリン静注後のLPL活性は正常ウサギの2.3倍に増加していた。

(考察)

動脈硬化病変が進展するに伴い、特にマクロファージとその周辺においてLPLとapoEの両者が存在したが、その局在様式は異なっており、その理由として両者は異なる機序で出現する可能性が考えられる。トランスジェニックウサギが各種疾患モデルとして利用されているが、マウスは動脈硬化を起こしにくく動脈硬化の研究には必ずしも適していない。そこで本研究において初めてヒトLPLトランスジェニックウサギの作製に成功した事は動脈硬化の成因・病態、更に治療における今後の研究に役立つことが期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

臨床における剖検例および手術例の各種動脈組織を用い既報の方法でHE染色により、内膜肥厚群、脂肪斑群、粥腫プラーク群の3群に分類し、免疫組織染色法により、リポ蛋白リパーゼ(LPL)とともにapoEの局在について検討した結果、両者はマクロファージ系細胞を中心に存在したが、局在様式に違いが認められた。また、病巣の進展とともにLPLとapoEの存在が広く観察されており、両者が動脈硬化病変の形成・進展に関与することを強く示唆する成績を得たことは動脈硬化の成因と進展の解明に有益な知見であり、高く評価できる。また、初めてヒトLPLトランスジェニックウサギの作製に成功し各臓器にLPLの存在が確認され、更に血中LPLがヒトと類似した所見を得た。今後本モデルウサギを用いて研究を発展させることは動脈硬化の成因と進展の解明に大いに寄与することが期待される。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。