

氏名	サウチェンコ アレクサンドル
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第210号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Expression of pentraxin 3 (PTX3) in human atherosclerotic lesions (ヒト動脈硬化症における pentraxin 3 の発現)

論文審査委員	主査 教授 相澤 義房
	副査 教授 内藤 眞
	副査 教授 味岡 洋一

博士論文の要旨

[背景]

Pentraxin 3 (PTX3) は、炎症によって産生される急性期タンパクである。動脈硬化は脂質代謝異常によって惹起されるが、一種の炎症でもあり、粥状硬化病巣に浸潤した白血球や肥満細胞、マクロファージなどから多くの炎症メディエーターが放出されることが知られている。炎症時に産生される急性期タンパクとしてC反応性タンパク質(CRP)が知られているが、PTX3もCRPと同様にペントラキシンファミリーに属している。CRPが肝臓で産生されるのに対し、PTX3は血管内皮細胞、血管平滑筋、マクロファージから産生される。最近、血中のPTX3は感染症、自己免疫疾患、そして心筋梗塞などの病態の指標になることが示唆されている。本研究はヒト動脈硬化病巣におけるPTX3の発現パターンを解明することを目的として、新たに作製された抗体を用いて行われた。

[材料と方法]

1群として、2001年から2007年までに長岡赤十字病院に搬送され治療を受けた心筋梗塞患者150例(平均年齢61.3±11.5歳、男118例、女32例)から血栓除去術によって採取された冠動脈内血栓とプラーク成分をホルマリン固定して用いた。臨床診断は30分以上の胸痛、心電図のST上昇、心カテーテル造影による冠動脈の閉塞の証明および生化学的な心筋障害によって下された。パラフィン切片を作製し、HE染色による形態観察と新規に作成した抗ヒトPTX3抗体(clone No. 1228)、抗好中球抗体(CD15)、抗マクロファージ抗体(CD68、MSR-A)を用いた免疫染色を行った。2群としては56例の剖検例(平均年齢76.6±7.9歳、男5例、女4例)から大動脈を採取した。糖尿病、高コレステロール血症、高

血圧、喫煙などの危険因子は6症例で確認された。動脈硬化組織のパラフィン切片と凍結切片を作成し、1群と同様の染色を行った。脂肪染色には oil red O 染色を用いた。好中球については AS-D chloroacetate esterase の組織化学的染色によっても確認した。動脈硬化の組織学的判定は American Heart Association (AHA) の基準によった。

抗体の蛋白認識を確認するため、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子の存在下で培養した単球と末梢血から分離した好中球から蛋白を抽出し、抗ヒト PTX3 抗体を用いたウエスタンブロットも施行した。

[結果]

血栓除去によって得られた組織のうち 72 例 (48%) はプラーク成分を含む血栓であり、78 例 (52%) は血栓のみであった。プラークの成分は泡沫細胞、コレステロール結晶、無構造の顆粒状物質、コラーゲン線維、弾性線維であった。血栓には多数の赤血球に加え、血小板、フィブリン、および好中球が混在していた。

PTX3 陽性細胞が認められ、脂肪線状 (初期動脈硬化病変) では発現は軽度であり、動脈瘤では泡沫細胞に強く発現した。PTX3 と CD68 の 2 重染色で、PTX3 陽性細胞はマクロファージと一致した。このことから、PTX3 はマクロファージから泡沫細胞への分化につれて発現が誘導されるものと考えられた。マクロファージは MSR-A を発現しており、泡沫状に大型化した細胞は脂肪を蓄積していた。

さらにアテローム斑にあるマクロファージ/泡沫細胞だけでなく、血栓中の好中球も PTX3 を産生していた。PTX3 陽性好中球は時にプラーク内にも検出された。PTX3 産生細胞は CD15 および AS-D chloroacetate esterase 染色で陽性であった。抗 PTX3 抗体を用いたウエスタンブロットでは好中球および培養単球で 45 と 90 kDa のバンドが検出された。

[考案]

本研究に用いた新規抗ヒト PTX3 (clone No. 1228) は PTX3 ノックアウトマウスに免疫して作製されたもので、免疫染色とウエスタンブロットに使用できることが明らかになった。ウエスタンブロットでは 45 kDa と 90 kDa のバンドが検出され、単量体および 2 量体の PTX3 タンパクを認識した。

免疫組織学的には動脈硬化病巣のマクロファージに発現していることが明らかにされた。また、血栓、時に動脈硬化病巣に見られる好中球も PTX3 陽性を示した。最近、血中の PTX3 は心筋梗塞発症後 CRP よりも早く上昇し、心筋梗塞発症のよいマーカーになることが報告された。われわれの観察では、その一因として好中球の関与が強く示唆された。活性化好中球は TNF- α 、IL-6、CRP などの急性期蛋白や炎症性サイトカインを産生することが知られている。さらに、TNF- α や IL-1 β のような炎症性サイトカインは PTX3 の発現を強く誘導する。これらサイトカインは心筋梗塞や動脈硬化病巣でも産生される。こ

く最近、Jaillon らは PTX3 は好中球の顆粒に貯留されており、刺激によって急速に分泌されることを明らかにした(J Exp Med. 2007; 204:793-804)。われわれの研究結果からも、マクロファージのみならず好中球が主たる PTX3 産生細胞として急性冠症候群の不安定プラークの破裂、血栓形成、心筋虚血の過程に関わることが示唆された。

(論文審査の要旨)

動脈硬化の原因はコレステロールの代謝障害であるが、一種の炎症でもある。炎症によって産生される急性期タンパクの C 反応性タンパク質 (CRP) は動脈硬化にも関わりますが、同じペントラキシンファミリーに属している Pentraxin 3 (PTX3) の意義については知られていない。本研究では急性心筋梗塞患者 150 例から採取された冠動脈内血栓とプラーク成分、および 56 例の剖検例から採取した大動脈のホルマリン固定パラフィン切片について免疫組織学的検討を行った。

抗 PTX3 抗体を用いた好中球および培養単球のウェスタンブロットでは 45 と 90 kDa のバンドが認められ、PTX3 の単量体、2 量体を検出した。動脈硬化病変の免疫染色ではマクロファージおよび泡沫細胞が PTX3 を発現した。さらに血栓やプラーク内の好中球も PTX3 を産生していた。最近、PTX3 は CRP よりも鋭敏な心筋梗塞のマーカーとなることが報告され、好中球の PTX3 産生はそれと関連するものと思われた。

以上、本研究はマクロファージのみならず好中球が主たる PTX3 産生細胞として不安定プラークの破裂、血栓形成、心筋虚血の過程に関わることを示唆した点に学位論文としての価値を認める。