

論文内容の要旨

氏名	里井俊平
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医第1016号
学位授与の日付	平成21年6月15日
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当
学位論文題目	マウス急性膵炎進展における $\alpha 2$ アンチプラスミンノックアウトの効果
論文審査委員 (主査)	教授 大柳治正
(主査代行)	教授 塩崎均
(副主査)	教授 工藤正俊
(副主査)	教授 東野英明

【目的】	急性膵炎発症後の壊死病変の成立と進展に微小循環障害が影響することが示唆されており、その修飾因子として凝固・線溶系の関与が予想される。そこで、 $\alpha 2$ アンチプラスミン遺伝子欠損マウス ( $\alpha 2\text{-AP}^{-/-}$ 群)を用い、膵壊死と血管内皮細胞障害の程度を検討した。	
【方法】	$\alpha 2\text{-AP}^{-/-}$ 群及びその野生型マウス ( $\alpha 2\text{-AP}^{+/+}$ 群)に対しセルレイン膵炎を惹起し、最初のセルレイン投与から8・12・24時間後に犠牲死させ、採血と膵臓摘出を行った。膵炎の指標として血清アミラーゼ及びリパーゼ値を測定した。また、HE染色を行い膵臓房細胞壊死の割合を測定した。次に、血管内皮のマーカである von Willebrand Factor (vWF) と、血管内皮増殖因子 (VEGF) の免疫染色を行った。 $\alpha 2\text{-AP}^{-/-}$ 群に VEGF 受容体 (fms-like tyrosine kinase: Flt-1) の抗体を予め静脈投与後、同様にセルレイン膵炎を惹起させ、24時間後に採血と膵臓摘出を行った。	
【結果】	24時間後の膵臓房細胞壊死の面積は $\alpha 2\text{-AP}^{-/-}$ 群で有意に $\alpha 2\text{-AP}^{+/+}$ 群より低下し、 $\alpha 2\text{-AP}^{-/-}$ 群の血清アミラーゼ値及びリパーゼ値は $\alpha 2\text{-AP}^{+/+}$ 群に比べて、8時間で有意に高く24時間では有意に低かった。vWF と VEGF の免疫染色では、両群とも24時間後の $\alpha 2\text{-AP}^{-/-}$ 群においてのみ小葉内にまで発現がみられた。 $\alpha 2\text{-AP}^{-/-}$ 群に抗 Flt-1 抗体を投与した場合、投与しない群に比べ24時間後の血清アミラーゼは有意に高くなったが、壊死面積割合は変わらなかった。	
【考察】	$\alpha 2\text{-AP}^{-/-}$ によりプラスミン活性が亢進すると、膵臓房細胞は壊死からの修復が促進された。その機序の一つとして、プラスミンが VEGF を誘導することにより血管新生を促進し、血管内皮細胞が修復され、膵微小循環が回復したと考えられた。しかし、VEGF 受容体を阻害しても、壊死面積は変わらなかったことから、プラスミンによる微小血栓溶解や障害された細胞外基質の除去などの作用で、組織再構築がなされたことが示唆される。	
【結論】	$\alpha 2\text{-AP}$ 遺伝子欠損マウスにおけるセルレイン急性膵炎で、プラスミンの活性化は、VEGF を介して re-endothelialization を促進し組織修復に寄与すると示唆された。	
博士論文の印刷公表	公表年月日	出版物の種類及び名称
	平成21年6月日 公表予定	出版物名 近畿大学医学雑誌 第34巻 第2号
	公表内容	平成21年 月 日 発行予定
	全文	

急性膵炎は、重症化すると今なお死亡率10%前後の重篤な疾患であり、その重症化機序の解明と対策が急がれている。申請者は、膵炎が重症化し、壊死に進展していく過程における膵微小循環障害、血管内皮細胞傷害、膵虚血、好中球浸潤、好中球エラスターゼや活性酸素の関与の中で、膵微小循環障害の発生機序に注目した。膵微小循環障害には凝固・線溶系が修飾因子として考えられるので、その関与を検討するために、 $\alpha 2$ アンチプラスミン遺伝子欠損マウス( $\alpha 2$ -APKO群)及びその野生型マウス( $\alpha 2$ -APWT群)を使用した。膵炎モデルとしては最も再現性よく初期の膵炎像を誘発し得るセルレイン膵炎を用い、急性膵炎発症後の壊死進展における線溶亢進の影響を検討した。

【方法】 $\alpha 2$ -APKO群と $\alpha 2$ -APWT群に、セルレイン(1回投与量50ug/kg、生理食塩水0.25mlで溶解)を1時間間隔で7回腹腔内投与しセルレイン膵炎を惹起した。マウスは両群各時間で無作為に5~6匹に分け、最初のセルレイン投与から8、12、24時間後に全身麻酔下にて犠牲死させ、採血と膵臓摘出を行った。膵炎の指標として血清アミラーゼ値と血清リパーゼ値を測定した。また、H.E.染色を行い膵腺房細胞の細胞質が退色し核が凝集していれば壊死あるいは壊死前段階と判断した。その解析には光学顕微鏡下倍率100倍で、マウス1匹につき無作為に3か所選択し、壊死あるいは壊死前段階部と膵腺房細胞非壊死部の合計に対する壊死部あるいは壊死前段階部の割合を面積計算ソフトSigmascan Proを用いて画像解析を用いた。さらにこの病理変化にapoptosisが関与するかどうか調べるためにApop Tag Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kitを用い、TUNEL法でApoptosis Indexを測定した。膵炎における線溶系の変動をみるため、plasminogen activator活性の測定をelectrophoretic

enzymographyで行った。血管内皮細胞のマーカであるvon Willebrand Factor (vWF)と、血管新生のマーカである血管内皮増殖因子(VEGF)の免疫染色を行った。膵炎における線溶系の変動をみるために、tissue-plasminogen activator (t-PA)活性の測定をenzymographyで行った。また、 $\alpha 2$ -APKO群にVEGF受容体(fms-like tyrosine kinase : Flt-1)の抗体を予め静脈投与後、同様にセルレイン膵炎を惹起させ、24時間後に採血と膵臓摘出を行った。

【結果】セルレイン膵炎惹起8時間後における $\alpha 2$ -APKO群は $\alpha 2$ -APWT群に比べ、t-PA活性が高く、血清アミラーゼ値及びリパーゼ値は有意に高く、膵腺房細胞壊死およびその前段階の面積は増加した。セルレイン膵炎惹起24時間後の $\alpha 2$ -APKO群は $\alpha 2$ -APWT群に比べ、血清アミラーゼ値及びリパーゼ値は有意に低く、膵腺房細胞壊死およびその前段階の面積は減少した。TUNEL染色で検出されるアポトーシスは、膵全体に分布し、壊死部分への偏在は認めなかった。vWFとVEGFの免疫染色は、膵炎惹起8時間後および12時間後において両群とも発現は見られなかった。膵炎惹起24時間後の $\alpha 2$ -APKO群にvWFとVEGFの発現がみられたが、 $\alpha 2$ -APWT群ではvWFとVEGFの発現がみられなかった。 $\alpha 2$ -APKO群に抗Flt-1抗体を投与した場合、投与しなかったKO群に比べ24時間後の血清アミラーゼ値は有意に高くなったが、壊死およびその前段階の面積割合は変わらなかった。

【考察】 $\alpha 2$ アンチプラスミン遺伝子欠損状態でプラスミン活性が亢進すると、まず膵障害は昂進し、膵腺房細胞壊死あるいはその前段階の状態がセルレイン膵炎惹起8時間後に出現した。これは、蛋白分解酵素でもあるプラスミンの影響と考えられる。また、膵組織中のt-PA活性も増強した

ことから、さらにプラスミンが活性化され、早期の急性膵炎および膵腺房細胞障害を一層促進したと考えられる。膵腺房細胞壊死あるいはその前段階からの回復はアポトーシスとの関連は認められなかったが、セルレイン膵炎惹起24時間後には、これらの病理変化からの回復が促進されていた。その機序の一つとして、プラスミンがVEGFを誘導することにより血管新生を促進し、血管内皮細胞が修復され、膵微小循環が回復し、壊死前段階から回復するとともにすでに壊死に陥った部分にもいくらかの再生が始まったと思われる。しかし、VEGF受容体を阻害しても、これらの病理変化の回復を阻止できなかったことから、ノックアウトマウスにおける膵壊死からの早期の回復現象は、血管新生を介した再生以外の機序も考慮すべきである。すなわち、プラスミンによる微小血栓溶解や障害された細胞外基質の除去などの作用により、今回の検討で壊死として捉えられた壊死前段階の細胞が、核の形態が復旧し細胞質の染色性が回復した可能性がある。急性膵炎の治療において、抗凝固活性を伴う蛋白分解酵素阻害薬が臨床使用されているが、膵炎進展時期を考慮しつつ、線溶系活性化療法を行うことで膵壊死の進展・成立を抑制し得る可能性が示唆された。

**【結論】**今回の検討から、マウス急性膵炎の早期に見られる膵腺房細胞の壊死病変は、線溶系の亢進によりその進展が抑制され、結果として急性膵炎の回復が促進されると考えられた。

本研究成果は、従来不明であった急性膵炎の発症初期における壊死の進展・成立機序における線溶系の関与を初めて示したものであり、膵壊死成立機序解明の端緒となるのみならず、新しい治療法開発の基礎データとしても重要である。よって、本研究者は、医学博士の学位を得る資格があると認める。

氏名	青松 宏美			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	医第1018号			
学位授与の日付	平成22年3月23日			
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当			
学位論文題目	慢性炎症性脱髄性多発神経炎(chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy, CIDP)における血中抗スルファチド抗体活性の検討			
論文審査委員(主査)	教授	楠		進
(副主査)	教授	池上	博	司
(副主査)	教授	福田	寛	二