

論文内容の要旨

氏名	市川英明 <small>いちかわ ひてあき</small>
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医第975号
学位授与の日付	平成20年9月15日
学位授与の要件	学位規程第4条第2項該当
学位論文題目	Involvement of osteopontin as a core protein in cholesterol gallstone formation (コレステロール胆嚢内結石における core protein としての osteopontin の役割)
論文審査委員 (主査)	教授 大柳 治 正
(副主査)	教授 工藤 正 俊
(副主査)	教授 松尾 理

【背景と目的】		
マトリックス蛋白は biomineralization に必須と考えられ、また胆嚢内結石の形成と成長に重要な役割を果たす。Osteopontin (Opn) は glycine - arginine - glycine - aspartate - serine (GRGDS) cell-binding peptide sequence を持つ noncollagenous, acidic bone-matrix glycoprotein である。コレステロール胆石の生成に関わる Opn の役割を解明するために、コレステロール胆石を持つ胆嚢壁、コレステロール胆石ならびにマウスコレステロール結石モデルにおける Opn の発現を検討した。		
【方法】		
コレステロール胆石を持つ胆嚢壁ならびにコレステロール胆石の人体材料を用いて抗 Opn 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行った。またマウスコレステロール結石モデルの胆嚢に対して reverse transcriptase polymerase chain reaction を用いた Opn の mRNA を検討した。		
【結果】		
コレステロール胆石を持つ胆嚢壁の上皮細胞、またコレステロール結石の中心部分には Opn の高度な発現が認められた。コントロールとして用いた肉眼的に胆嚢内結石を持たない胆嚢に観察された Early microscopic stones にも肉眼的に観察される大きな結石と同様の Opn の発現が高度に認められた。胆石を持つ胆嚢壁の上皮には多数の macrophage の浸潤が認められ、これら macrophage にも Opn は高度に発現していた。マウスコレステロール結石モデルの胆嚢における Opn mRNA の発現は催石食を与えた極早期に認められ、この時期には炎症性細胞の浸潤は軽度であった。		
【考察】		
これらの結果から Opn はコレステロール胆嚢内結石の Core protein として働くと考えられた。		
博士論文の印刷公表	公表年月日	出版物の種類及び名称
	2008年 月 日 公表予定	出版物名
	公表内容	Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery
	全文	2008年 月 日 発行予定

論文審査結果の要旨

研究の背景と目的

胆嚢内結石はその肉眼的形態から大きく1コレステロール結石、2；ビリルビンカルシウム結石、3；黒色石の3種類に大別される。それぞれの成因と生成機序は古くより検討されてきた。コレステロール胆石の成因としては胆汁中のコレステロールは通常、胆汁酸・レシチンと複合ミセルを作り、水に可溶の状態にある。しかし、コレステロールの量に対して、胆汁酸やレシチンの量が相対的に不足していると、複合ミセルを作ることが出来なかったコレステロールが過飽和状態となり結晶をつくる。つまり胆石形成指数 Lithogenic Index =コレステロール/(胆汁酸+レシチン)の比が増大するとミセル形成が低下し、その結果コレステロール析出しやすくなり結石が形成される。

一方ビリルビンカルシウム結石は、ビリルビンは肝臓でグルクロン酸と結合して排泄の容易な抱合型（直接型）ビリルビンになる。この抱合型は水溶性であるが、胆汁中に大腸菌感染などが起こると、細菌のもつβ-グルクロニターゼの酵素の働きで胆汁中のビリルビンからグルクロン酸がはずれて、遊離型ビリルビンになる。この遊離型ビリルビンは不溶性でカルシウムと結合しやすく、ビリルビンカルシウムとなって析出し沈殿する。これが固まったものがビリルビンカルシウム結石であるとされている。また黒色石と胆道感染の間には関連は認められていない。

この様な知見が集積しつつあるが、結石形成の初期像である core 部分は未だ解明されていない。Core の部分はカルシウム塩の沈着を認めることがほとんどである。また、生体内のカルシウム塩の沈着にはオステオポンチン(Opn)の関与が報告されている。そこで、申請者らはコレステロール胆石の生成の初期段階に関わる Opn の役割を解明するために、コレステロール胆石を持つ胆嚢壁、コレステロール結石ならびにマウス催コレステロール結石モデルにおける Opn の発現を core 部分に焦点を当てて、人体材料ならびにマウス催石モデルを使用して検討した。

対象と方法

コレステロール結石により急性胆嚢炎発症後、20±14 週後に手術的に胆

嚢摘出された群：結石群（年齢 42±12 歳 男性 7 人女性 13 人）の胆嚢とその結石を、また肝細胞癌手術時に随伴性胆嚢摘出術が行われた群：コントロール群（年齢 59±4 歳 男性 8 人 女性 2 人）の胆嚢を用いて抗 Opn 抗体を使用した免疫組織化学的染色を行った。

また SLC-ICR マウスを 1%のコレステロールと 0.5%の cholic acid を加えた催石食で飼育することにより、マウス催コレステロール結石モデルを作製し、この胆嚢に対して同様の免疫組織化学的染色ならびに Reverse transcriptase polymerase chain reaction 法を用いて Opn の mRNA 発現を検討した。免疫組織化学的染色は ENVISION 法（DAKO 社）にて行い、発色は DAB と ACE+ を用いた。

結果

臨床例においてコレステロール胆石を持つ胆嚢壁、およびコレステロール結石の中心部分には Opn の高度な発現が認められた。コントロール群における胆嚢壁の Opn 発現は軽度であったが、コントロールの中に胆嚢壁に顕微鏡的にみとめられた Early microscopic stones にも、肉眼的に観察される結石と同様の Opn の発現が高度に認められた。胆石を持つ胆嚢壁の上皮には多数の Opn 陽性の macrophage の浸潤が認められ、これら macrophage はコントロールと比較して有意に多く浸潤していた。

マウス催コレステロール結石モデルの胆嚢には 10 週目にほぼ 100%にコレステロール結石をみとめるが、免疫組織化学染色による Opn の発現は催石食摂食早期に上皮内細胞質に高度に認めた。しかし、摂食後 42 日後には胆嚢内腔に認められる結石周囲には Opn の発現が認められるものの、上皮内の Opn 発現は軽度であった。RT-PCR 法にて検出した Opn mRNA の発現は催石食を与えた極早期のみに認められ、この時期には胆嚢壁に認められる炎症性細胞の浸潤は軽度であった。

考察

これらの結果からコレステロール結石形成に関してその核形成に Opn が関わっていることが考えられた。

すなわち、上皮内に発現した Opn が結石の Core として働き、その後に Core を異物とした炎症反応が生じ、マクロファージの動員とマクロファージによる Opn の過剰分泌のため、結石が形作られていることが考えられた。

したがって本研究はコレステロール結石の Core 形成に Opn が大きな役割を果たしていることを、特に最も初期に過飽和のコレステロール刺激によると思われる胆嚢上皮細胞の Opn 発現が成立機序に重要な役割を果たすことを、臨床例と動物実験で明らかにした学問的価値の高い仕事であり、臨床的にも意義深いものであると考えられ、学位論文に値すると考えられる。

氏名	小池 竜太
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	医 第 9 7 7 号
学位授与の日付	平成 21 年 3 月 21 日
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Concurrent Chemoradiotherapy For Esophageal Cancer With Malignant Fistula (瘻孔を有する食道癌の同時化学放射線療法)
論文審査委員 (主査)	教授 西 村 恭 昌
(副主査)	教授 塩 崎 均
(副主査)	教授 中 川 和 彦