

# 論文内容要旨

論文題目 狭窄化大動脈弁におけるマクロファージ亜型の分布と  
石灰化との関連性について

責任講座： 外科学第二 講座

氏 名： 大場 栄一

## 【内容要旨】 (1,200 字以内)

【背景と目的】大動脈弁狭窄症 (AS)の最大要因は、退行性変化による石灰化である。大動脈弁の石灰化には osteogenic signaling cascade (OSC)の活性化が関与するとされているが、その詳細は未だに不明である。本研究では石灰化大動脈弁におけるマクロファージ (M $\phi$ )亜型の分布と OSC の活性化を有する osteoblast-like cell (OLC)との関連について明らかにすることを目的とした。【方法】2011年3月から2012年12月までのAS患者、36手術症例 [男女比 19:17, 平均 76.3 歳 (57~86 歳)]をAS石灰化群とした。本研究では加齢性石灰化ASのみを対象とし、先天性ASが指摘されていた症例や、病理診断にてリウマチ性ASが疑われた場合は対象から除外した。病理学的に石灰化のない大動脈弁の剖検例6症例 [男女比 5:1, 平均 66 歳 (57 歳~74 歳)]を非石灰化 (対照)群とした。大動脈弁組織を、ホルマリン固定後にパラフィン切片として通常の組織学的検索と免疫染色に、一部は凍結材料として逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)に用いた。大動脈弁組織におけるM $\phi$ の亜型 [M1 (CD68+, iNOS+, CD163-), M2 (CD68+, CD163+, CD206+), Mox (CD68+, CD163+, HO-1+)]の分布を免疫染色で検討した。大動脈弁を線維層, 海綿層, 心室層, さらにそれぞれを弁基部, 弁腹部, 弁尖部の計9区画に分け, さらに石灰化周囲を1区画として, それぞれにおける陽性細胞を測定した。次にOLCとM $\phi$ 亜型との関係を見る為に, M $\phi$ 亜型抗体とOLCのマーカーであるbone morphogenetic protein 2 (BMP2)との蛍光二重染色を行った。さらに凍結標本でRT-PCRを行い, CD206, HO-1, BMP2のmRNAの発現を検討した。【結果】弁全体において最も多かったM $\phi$ 亜型は, AS石灰化群, 非石灰化群ともにiNOS+M1であった。しかし, AS石灰化群と非石灰化群との間でiNOS+M1は統計学的有意差がでなかった。一方, iNOS以外のマーカー (CD68, CD163, CD206, HO-1)に陽性のM $\phi$ が非石灰化群に比べてAS石灰化群で有意に多かった ( $p < 0.01$ )。AS石灰化群で区画別に陽性細胞を比較すると, どのM $\phi$ 亜型も石灰化周囲に多くみられた。AS石灰化群でCD163+CD206+M2とCD163+HO-1+Moxは弁基部, 弁腹部の方が弁尖部より多い傾向にあった。しかし, 石灰化の多くは線維層にあったのにも関わらず, CD163+CD206+M2とCD163+HO-1+MoxはAS石灰化群, 非石灰化群ともに海綿層で有意に多かった。蛍光二重染色ではCD206+及びHO-1+M $\phi$ の一部がBMP2を共発現していた。RT-PCRでも, BMP2が発現している症例ではCD206もしくはHO-1のどちらかが発現していた。【結論】本研究で石灰化大動脈弁でのM $\phi$ 亜型の分布を初めて明らかにした。また, 石灰化大動脈弁に見られるCD206+M2とHO-1+Moxとの一部がBMP2を共発現しており, OLCの候補の一つとなりうることを示唆された。

Key word: 大動脈弁狭窄症, マクロファージ, M2, Mox, osteoblast-like cell

平成 26 年 1 月 23 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

## 学位論文審査結果報告書

申請者氏名：大場 栄一

論文題目：狭窄化大動脈弁におけるマクロファージ亜型の分布と石灰化との関連性について

審査委員：主審査委員

川前 金幸



副審査委員

貞弘 光章



副審査委員

本郷 誠治



審査終了日：平成 26 年 1 月 16 日

### 【 論文審査結果要旨 】

申請者は、大動脈弁狭窄症 (AS) の最大要因は、退行性変化による石灰化であることから、その機序について解明した。石灰化の要因として、**osteogenic signaling cascade (OSC)** の活性化が関与するとされており、石灰化大動脈弁におけるマクロファージ (**Mφ**) 亜型の分布と **OSC** の活性化を有する **osteoblast-like cell (OLC)** との関連について明らかにした。

2011 年 3 月から 2012 年 12 月までの AS 患者、36 手術症例 [男女比 19:17, 平均 76.3 歳 (57~86 歳)] を AS 石灰化群とした。本研究では加齢性石灰化 AS のみを対象とした。[男女比 5:1, 平均 66 歳 (57 歳~74 歳)] を非石灰化 (対照) 群とした。大動脈弁組織を、ホルマリン固定後にパラフィン切片として通常の組織学的検索と免疫染色に、一部は凍結材料として逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (**RT-PCR**) に用いた。大動脈弁組織における **Mφ** の亜型 [**M1 (CD68<sup>+</sup>, iNOS<sup>+</sup>, CD163<sup>+</sup>)**, **M2 (CD68<sup>+</sup>, CD163<sup>+</sup>, CD206<sup>+</sup>)**, **Mox (CD68<sup>+</sup>, CD163<sup>+</sup>, HO-1<sup>+</sup>)**] の分布を免疫染色で検討した。大動脈弁を線維層, 海綿層, 心室層, さらにそれぞれを弁基部, 弁腹部, 弁尖部の計 9 区画に分け, さらに石灰化周囲を 1 区画として, それぞれにおける陽性細胞を測定した。次に **OLC** と **Mφ** 亜型との関係を見る為に, **Mφ** 亜型抗体と **OLC** のマーカーである **bone morphogenetic protein 2 (BMP2)** との蛍光二重染色を行った。さらに凍結標本で **RT-PCR** を行い, **CD206**, **HO-1**, **BMP2** の mRNA の発現を検討した。

結果、弁全体において最も多かった **Mφ** 亜型は、AS 石灰化群, 非石灰化群ともに **iNOS<sup>+</sup>M1** であった。しかし、AS 石灰化群と非石灰化群との間で **iNOS<sup>+</sup>M1** は統計学的有意差がでなかった。一方、**iNOS** 以外のマーカー (**CD68**, **CD163**, **CD206**, **HO-1**) に陽性の **Mφ** が非石灰化群に比べて AS 石灰化群で有意に多かった ( $p < 0.01$ )。AS 石灰化群で区画別に陽性細胞を比較すると、どの **Mφ** 亜型も石灰化周囲に多くみられた。AS 石灰化群で **CD163<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>M2** と **CD163<sup>+</sup>HO-1<sup>+</sup>Mox** は弁基部, 弁腹部の方が弁尖部より多い傾向にあった。しかし、石灰化の多くは線維層にあったのにも関わらず、**CD163<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>M2** と **CD163<sup>+</sup>HO-1<sup>+</sup>Mox** は AS 石灰化群, 非石灰化群ともに海綿層で有意に多かった。蛍光二重染色では **CD206<sup>+</sup>** 及び **HO-1<sup>+</sup>Mφ** の一部が **BMP2** を共発現していた。RT-PCR でも、**BMP2** が発現している症例では **CD206** もしくは **HO-1** のどちらかが発現していた。

本研究で石灰化大動脈弁での **Mφ** 亜型の分布を初めて明らかにし、**OLC** の候補の一つとなりうることを示唆した画期的な論文であり、学位に値するものと判断した。

(1, 200字以内)