

学 位 論 文 要 旨

氏 名

稲 福 征 志

題 目

粥状硬化症の発生進展機序の分子病理学的研究
(Molecular pathological studies on atherogenesis.)

近年重要な健康問題となっている生活習慣病の基本病変は動脈硬化症、特に粥状硬化症である。粥状硬化症の発生進展においては血管内膜の平滑筋細胞 (VSMCs) の増生が重要な形態学的因子の一つとなっている。本研究はヒトの病理解剖例や実験動物を用いて、粥状硬化症における VSMCs の増殖機序の解明を目的として行った。また同時に我々は沖縄県産黒糖の粥状硬化症に及ぼす影響について実験的に検討した。

DNA 傷害修復機能の不活性化によって遺伝子変異が生じやすくなる『ゲノム不安定性』が腫瘍の発症において重要であるとされている。また粥状硬化病変 (AT) の成因学説の一つにモノクローン学説が提唱されている。我々は『ゲノム不安定性』の一つとされる『マイクロサテライト不安定性 (MSI)』のヒト AT への関与について検討した。MSI は AT が進行するに従って高頻度に検出され、それらの事より MSI がヒト AT における VSMCs の形質転換に関与していると示唆された。次に我々は日本ウズラの大動脈 AT の発生進展における細胞増殖関連遺伝子の役割について検討した。日本ウズラの初期 AT においてはマクロファージ (M ϕ) 由来の泡沫細胞の蓄積が主体となり、中期から後期 AT にかけてはヒト VSMCs に類似した血管繊維芽細胞 (VFBs) の増殖が主体となり病変が進行する。初期 AT においては c-Fos 遺伝子と c-Src 遺伝子の mRNA 発現が亢進しており、これら遺伝子が M ϕ の泡沫化や増殖に重要である事が示唆された。中期から後期 AT においては c-Myc 遺伝子と PCNA 遺伝子の発現が亢進していた。細胞増殖抑制作用を有する p27 遺伝子は、腫瘍において mRNA 発現が有意に亢進する事は殆ど報告されていないが、日本ウズラの進行性 AT では p27 遺伝子 mRNA 発現が亢進していた。従って日本ウズラ AT においては c-Myc 遺伝子や PCNA 遺伝子の働きによる VFBs の増生に拮抗して、p27 遺伝子発現が反応性に亢進している事が示唆される。沖縄県で製造されている黒糖は以前から血清脂質低下作用や抗酸化作用が報告されている。本研究ではアポリポタンパク質 E 欠損 (ApoE $^{-/-}$) マウスと日本ウズラを用いて、黒糖の AT の発生進展に及ぼす影響について検討した。なお実験対照としてはグラニュー糖を用いた。黒糖は ApoE $^{-/-}$ マウスの重度の AT に影響を与えなかったが、血清中性脂質濃度 (TG) の上昇と副睾丸周辺脂肪組織の蓄積を抑制していた。黒糖を摂取した日本ウズラの血清 TG の上昇と初期 AT の発生進展は有意に抑制されていた。さらに大動脈 AT における c-Jun 遺伝子 mRNA 発現も有意に低下していた。従って黒糖が AT の予防に有効である可能性が示唆された。

学 位 論 文 要 旨

氏 名

Masashi Inafuku

題 目

Molecular pathological studies on atherogenesis.
(粥状硬化症の発生進展機序の分子病理学的研究)

The basic pathological lesion of lifestyle-related disease, which is an important health problem, is atherosclerosis (AT). The proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) in the aortic tunica intima is one of the important morphological factors in atherogenesis. The present studies were carried out to elucidate the mechanisms of the VSMCs proliferation in atherosclerotic lesions using autopsied human and experimental animal aortas. We also examined the effects of Okinawan Kokuto, non-centrifugal cane sugar, on the development of atherosclerotic lesions in animals.

Microsatellite instability (MSI) caused by the inactivation of DNA repair functions have been suggested to be important events in tumorigenesis. Monoclonal theory which related with tumorigenesis has also been proposed as one of the atherogenesis theories. From the stand viewpoint of monoclonal theory, we have studied the MSI in human AT. The present results suggested that MSI play a role in the transformation of VSMCs in human atherogenesis because MSI were more frequently detected in the advanced AT. Next we investigated the mRNA expression of proliferation-related genes on the development of aortic atherosclerotic lesions in Japanese quail. mRNA expression of c-Fos and c-Src genes significantly increased in the early phase of AT formed by the accumulation of macrophage (Mf)-derived foam cells. mRNA expression of c-Myc, PCNA, and p27 genes significantly increased in the mid to late phase of AT mainly formed by the proliferation of fibroblasts which is similar to human. Therefore we surmise that p27 gene inhibits c-Myc and PCNA genes mediated fibroblast proliferation in advanced AT. The Kokuto produced in Okinawa, Japan, has been reported to have the serum lipid-lowering effects and antioxidant activities. In this study, we examined the effect of Kokuto on the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E (apoE^{-/-}) mice and Japanese quail, and used sucrose as control. Dietary intake of Kokuto produced advanced AT and did not inhibit the progression of AT in apoE^{-/-} mice. However dietary intake of Kokuto decreased the serum triglycerides (TG) level and the accumulation of epididymal fat tissue in mice. Dietary intake of Kokuto produced the early phase of AT. Compared with quail fed sucrose, quail fed Kokuto decreased the serum TG level and inhibited the early phase of AT. mRNA expression of c-Jun gene also decreased in aorta of quail fed Kokuto. We suggest that Kokuto has functions to prevent the development of AT.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	稲福 征志
審査委員	主査 琉球 大学 教授 屋 宏典
	副査 琉球 大学 教授 新城 明久
	副査 宮崎 大学 教授 窄野 昌信
	副査 佐賀 大学 教授 柳田 晃良
	副査 鹿児島大学 教授 林 國興
審査協力者	琉球大学医学部 助教授 戸田 隆義
題 目	粥状硬化症の発生進展機序の分子病理学的研究 (Molecular pathological studies on atherogenesis)
<p>近年、健康上重要な問題となっている生活習慣病の基本病変は動脈硬化症、特に粥状硬化症である。粥状硬化症の発生進展においては血管内膜の平滑筋細胞（VSMCs）の増殖が重要な形態学的因子の一つとなっている。本研究はヒトの病理解剖例や実験動物を用いて、粥状硬化症における VSMCs の増殖機序の解明を目的として行った。また、我々は沖縄県産黒糖の粥状硬化症に及ぼす影響についても実験的に検討した。</p> <p>DNA傷害修復機能の不活性化によって遺伝子変異が生じやすくなる『ゲノム不安定性』が腫瘍の発症において重要であるとされている。また粥状硬化病変（AT）の成因学説の一つにモノクローン学説が提唱されている。本研究においてはマイクロサテライト不安定性（MSI）を指標としてAT進展におけるDNA障害修復機能低下の関与について検討した。その結果、MSIはATが進行するに従って高頻度に検出され、DNA修復機能低下がヒトATにおけるVSMCsの形質転換に関与していることが示唆された。</p> <p>次に我々は日本ウズラをモデルとして大動脈ATの発生進展における細胞増殖</p>	

関連遺伝子の役割について検討した。日本ウズラの初期ATにおいてはマクロファージ由来の泡沫細胞の蓄積が主体となり、中期から後期ATにかけてはヒトVSMCsに類似した血管繊維芽細胞（VFBs）の増殖が主体となり病変が進行する。初期ATにおいてはc-Fos遺伝子とc-Src遺伝子のmRNA発現が亢進しており、これら遺伝子がマクロファージの泡沫化や増殖に重要である事が示唆された。中期から後期ATにおいてはc-Myc遺伝子とPCNA遺伝子の発現が亢進していた。細胞増殖抑制作用を有するp27遺伝子発現が腫瘍において亢進するとの報告はないが、日本ウズラの進行性ATではp27遺伝子mRNA発現が亢進していた。これは日本ウズラATにおいてはc-Myc遺伝子やPCNA遺伝子の働きによるVFBsの増生に拮抗してp27遺伝子発現が亢進したためと考えられた。

さらに、血清脂質低下作用や抗酸化作用が報告されている食品の動脈硬化発症に対する影響について沖縄産黒糖を例として検討した。なお、本実験においてはモデル動物としてウズラ及びアポリポタンパク質E欠損(ApoE^{-/-})マウスを用い、対照群にはグラニュー糖を摂取させた。黒糖はApoE^{-/-}マウスの重度のATに影響を与えなかったが、血清中性脂質濃度(TG)の上昇と副睾丸周辺脂肪組織の蓄積を抑制していた。黒糖摂取により日本ウズラの血清TGと初期ATの発生進展は有意に抑制された。これに伴い、c-Fos及びPCNA遺伝子発現については抑制傾向、c-Jun遺伝子については有意な低下が認められた。c-Fos及びPCNA遺伝子はそれぞれ動脈硬化初期及び中期に発現が亢進する遺伝子であることから、黒糖摂取群の動脈内膜においては初期から中期における繊維芽細胞の増殖が抑制されている可能性が示唆された。

以上のことから、本論文は粥状硬化症の発生進展の分子機序を提唱し、生活習慣病予防のための重要な基礎的知見を見いだしていることから、博士(学術)の学位論文として十分価値があると判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	稲福 征志
審査委員	主査 琉球 大学 教授 屋 宏典
	副査 琉球 大学 教授 新城 明久
	副査 宮崎 大学 教授 窄野 昌信
	副査 佐賀 大学 教授 柳田 晃良
	副査 鹿児島大学 教授 林 國興
審査協力者	琉球大学医学部 助教授 戸田 隆義
実施年月日	平成 19 年 1 月 2 6 日
試験方法（該当のものを○で囲むこと。）	
<input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査、副査及び審査協力者は、平成19年1月26日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（学術）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。また、本研究は農学と医学の両領域にまたがり、学際的内容を多く含むことから博士（学術）の学位に相当すると判定した。</p>	

学位申請者 氏名	稲福 征志
<p>【質問1】日本ウズラの粥状硬化病変の発生進展に際して、種々の遺伝子発現が変動していましたが、その中で繊維芽細胞の増殖に関与すると思われる遺伝子はどれでしょうか</p> <p>【回答1】特定することは出来ません。しかし、c-fos、c-Myc および PCNA 遺伝子発現は細胞増殖に関連しているとの報告があるので、それら遺伝子発現が繊維芽細胞の増殖に関与すると考えられます。</p> <p>【質問2】粥状硬化症における遺伝子発現の変動は病変の原因となっているのか、それとも病変が生じた事による結果なのでしょう</p> <p>【回答2】In vitro および In vivo 実験においては、c-Fos、c-Myc および PCNA 遺伝子を過剰発現させると血管平滑筋細胞が増殖すると報告されている事から、これら遺伝子発現は粥状硬化症の原因となっていると考えられます。c-Src および p27 遺伝子の機能調整はタンパク質レベルで行われている事が報告されているので、それら遺伝子の機能については更なるタンパク質レベルの実験が必要と考えています。</p> <p>【質問3】粥状硬化症の発生進展においては、クロファージの蓄積と平滑筋細胞の増殖はどちらが重要であると考えているか？</p> <p>【回答3】どちらが重要であるとは言えません。炎症性細胞であるマクロファージに重点をおき粥状硬化病変の成因論として炎症説を唱える研究が、近年主流となっていると思われます。しかしながら炎症性細胞は様々な病変に関与するという観点から考えると、腫瘍を含めた多くの病変は炎症性病変であると言えます。また血清脂質濃度が低下すると粥状硬化病変部のマクロファージ数は減少していく事が解っています。一方、病変部にて増殖した平滑筋は減少しません。そのため我々は粥状硬化病変の発生進展における平滑筋細胞の増殖を重要視し、その増殖機序を解明するための研究を行いました。</p> <p>【質問4】黒糖中の何の成分が、粥状硬化症の抑制に効果的であると考えていますか？</p> <p>【回答4】どの成分が効果的であるかは解りません。しかし本実験においては、抗酸化活性が最も強い黒糖が最も効果的であり、逆に抗酸化活性が最も低かった黒糖の抑制作用が最も弱かった事から、黒糖中の抗酸化活性成分が重要であると考えられます。黒糖にはサトウキビ由来の成分ならびにその製造工程で生じた成分が多く含まれているため、今後黒糖から成分を単離して、有効成分の特定を行う必要があると考えています。</p> <p>【質問5】黒糖の投与量が30%は多すぎるのではないかと？</p> <p>【回答5】黒糖は約90%がショ糖および5%が水分であるため、残り5%の中に有効成分が含まれていると考えられます。その中でも有効成分となりうるのは約2%程と考えています。黒糖中の有効成分の量を目安にした場合、ある程度の量を摂取させないと効果が得られない可能性が考えられましたので、本実験では30%というレベルの黒糖を投与しています。しかしながら、御指摘のように栄養バランスを保つ意味においては、半合成試料を用いる実験が好ましいと考えられますので、今後の検討課題とさせていただきます。</p> <p>【質問6】多量の黒糖を投与したウズラの健康状態は大丈夫であったか？</p> <p>【回答6】ショ糖摂取群と比較して黒糖摂取群の健康状態に違いは見られませんでした。</p>	