

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成22年度博士課程入学

氏名 玉本 隆司

指導教員名 辻本 元

論文題目：

Studies on pathophysiological characteristics of feline serum amyloid A
(猫血清アミロイドAの病態生理学的特性に関する研究)

血清アミロイドA (SAA) は猫における主要な急性相蛋白である。SAA は炎症性サイトカインの刺激を受けて主に肝臓で合成される。合成された SAA は血中へと放出され、その血中濃度は平常時の 1000 倍位以上に達することがある。SAA はもともと、慢性炎症性疾患に続発しておこる続発性 AA アミロイドーシスで沈着するアミロイド線維の血中前駆物質として同定されたが、その急性相蛋白としての生理学的特性から医学領域では炎症マーカーとして臨床応用されている。

人においてはさらに、SAA が炎症マーカーというだけでなく予後の指標にもなり得ることが示されている。しかし、猫における SAA 濃度測定の臨床的有用性について検討した報告は少なく、また予後との関連について調査した報告はこれまでにない。そこで、研究の前段階 (第0章) として、こういった猫 SAA の臨床的側面について症例を用いて検討した。

結果として、猫においても人と同様にさまざまな炎症性疾患及び腫瘍性疾患に伴って血中 SAA 濃度の上昇が認められた。それらの症例において SAA 濃度の上昇と生存期間の関連について調査したところ、有意な関連が認められた。特に炎症性疾患と腫瘍性疾患においては、個別に見た場合にも SAA 濃度が上昇していた群で有意に生存期間が短縮していた。

SAA と予後との関連を単純に考察すると、SAA 濃度の高値は原疾患の重症度を反映し、原

疾患の重症度が生存期間に影響したと考えることができる。しかし、それとは別の原因として、SAA の病態生理学的な特性が病態形成や増悪に関与したのではないかと考えた。そこで本論文では、第 1 章で猫の SAA の単球刺激作用について検討した。第 2 章では腫瘍性疾患における SAA の影響を調査するため、猫の腫瘍細胞株への SAA の直接的な作用について検討した。第 3 章では SAA が病態の増悪に影響するならばそれを抑制することが治療的意義をもつと考え、SAA 制御の一つの候補として SAA の代謝機構に関する検討を行った。

第 1 章 猫 SAA による末梢血由来単球刺激作用に関する検討

人の SAA は単球や好中球による各種サイトカインの産生を促進することがわかっている。猫で報告されている SAA はその発現パターンや全体的なアミノ酸配列から人の SAA と相同であると考えられるが、8 アミノ酸の挿入が存在し、また機能に関する報告もない。そこで、本章では猫の SAA が人の SAA で報告されているような作用をもつのかどうかについて、末梢血由来単球による TNF- α 産生を指標として検討した。

過去に報告されている遺伝子配列をもとに、組み換え猫 SAA を大腸菌を用いて作製・精製した。健康な猫から末梢血を採取し、単球を分離・培養して用いた。単球に組み換え猫 SAA を添加し、TNF- α の mRNA 発現および培養液中への蛋白の分泌をそれぞれ定量 PCR 法および ELISA 法を用いて測定した。また、炎症性サイトカインの発現に重要な転写因子である NF- κ B の活性化については免疫蛍光法を用い、SAA の受容体候補である TLR4 の関与についてはアンタゴニストによる競合拮抗法を用いて、それぞれ検討した。

結果として、組み換え猫 SAA 蛋白は末梢血由来単球による TNF- α の mRNA 発現および蛋白分泌を、用量および時間依存的に促進した。また、SAA は NF- κ B の活性化を促進し、その上流の経路として TLR4 を介して作用していることが明らかとなった。

今回の結果から猫の SAA は内因性の TLR4 アゴニストであることが示された。TLR4 は細菌の外毒素であるリポ多糖 (LPS) の受容体として知られていることから、SAA には LPS と類似した作用があると考えられた。

第 2 章 猫 SAA の腫瘍細胞の浸潤性への影響に関する検討

血中 SAA 濃度は腫瘍性疾患においても増加することがあるが、腫瘍の臨床ステージと SAA 濃度の間に関連があることが報告されている。このことから、SAA が腫瘍の浸潤や転移に関連するのではないかと考えられている。SAA は単球刺激などを介した間接的な作用によって腫瘍の進行に関連していると考えられているが、SAA の直接的な作用について検討した報告はほとんどない。そこで本章では、猫 SAA の直接作用を、腫瘍細胞株を用いて検討した。

対象とする細胞として猫乳腺腫瘍由来細胞株 4 株と猫リンパ腫由来細胞株 3 株を用いた。

組み換え猫 SAA は第 1 章と同様の方法で作製した後、カラムを用いて脱塩した。浸潤性の指標として細胞外マトリックス分解酵素である Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) の mRNA 発現を定量 PCR 法にて、蛋白産生をゼラチンザイモグラフィ法にて検出した。また、細胞外マトリックス成分を用いたチャンバーアッセイにて浸潤性についても検討した。

結果として、乳腺腫瘍細胞株では MMP-9 の蛋白産生は全細胞株で認められ、浸潤性に関しても 3 細胞株で用量依存性の亢進が認められた。リンパ腫細胞株では 3 株中 1 株で MMP-9 の mRNA 発現および蛋白産生の亢進が認められ、同細胞株では浸潤性の亢進も認められた。

本章の結果から、SAA が腫瘍細胞による MMP-9 産生や腫瘍細胞の浸潤を促進することが明らかとなった。MMP-9 は腫瘍の浸潤や転移に関連しており、乳腺腫瘍やリンパ腫を含む多くの腫瘍に罹患した猫で発現が亢進していることが報告されている。これらの報告と合わせると、SAA は腫瘍によって産生が亢進されるだけでなく、腫瘍細胞に直接的に作用してその浸潤や転移を促進することによっても、病期の進行に関与していることが予測された。

第 3 章 末梢血由来マクロファージによる猫 SAA の取り込みに関する検討

第 1 章および第 2 章で猫 SAA が病態形成や進行に影響を及ぼす可能性が示唆された。したがって SAA の制御は臨床的に有用であると考えられ、候補の一つとして代謝機構の制御が挙げられる。SAA の代謝経路として、マクロファージによる取り込みが人やマウスで知られているが、猫での報告はない。そこで本章では、猫の末梢血由来マクロファージによる SAA の取り込みについて検討すると同時に、マクロファージを LPS で刺激あるいはデキサメタゾン (Dex) で抑制した場合の影響についても調査した。

第 1 章と同様に健常な猫から単球を分離し、6 日間培養することでマクロファージに分化させた。マクロファージの培養系に組み換え猫 SAA を添加し、培養液中 SAA 濃度の変化を経時的に ELISA 法にて測定した。また、SAA がマクロファージに取り込まれる様子を蛍光免疫法を用いて視覚化した。さらにマクロファージに LPS あるいは Dex を事前に添加した場合についても検討した。

結果として、猫末梢血由来マクロファージの培養液中に添加された SAA は経時的に減少し、24 時間後にはほとんど検出されなくなった。蛍光免疫法では、マクロファージの細胞質に SAA が取り込まれている様子が観察された。LPS はこの取り込みに影響しなかったが、Dex によって取り込み反応は著しく阻害された。

本章の結果から、炎症を抑える目的で臨床的に汎用されるグルココルチコイドが、SAA の取り込みに関しては阻害的に働くことが示唆された。グルココルチコイドはマクロファージのさまざまな機能を抑制することが報告されており、SAA の取り込みに関連する受容体の発現を抑制した可能性があると考えられた。

考察

本研究の成果によって、まず猫 SAA の単球刺激作用が明らかとなった。本研究では TNF- α という 1 種類のサイトカインについてしか検討できていないが、LPS と受容体を共有していることや多数のサイトカインの転写調節に関わる NF- κ B を活性化することから、SAA はより多くのサイトカイン産生に影響しているものと考えられる。人では、SAA は多くのサイトカイン類の産生を促進すると報告されている。したがって、強い炎症反応を伴う病態においては、産生された SAA 自身がさらなる炎症反応と SAA 産生を惹起することで病態の増悪に関与している可能性がある。

腫瘍においては SAA が腫瘍細胞からの MMP-9 産生を促進したが、人では MMP-9 自身も腫瘍の予後因子と考えられていることから、SAA は MMP-9 産生を通して予後に影響を及ぼしている可能性がある。また、SAA が直接的に腫瘍細胞の浸潤を促進することから、腫瘍の臨床ステージの進行に関連していると考えられる。

第 1 章と 2 章の結果から SAA 自身が炎症や腫瘍の増悪因子である可能性が示唆された。また、持続的な SAA の高値は二次性アミロイドシスの発症要因と考えられていることから、SAA 濃度の制御は新たな治療対象となり得ると考えられた。その一つとして代謝機構について検討した結果、抗炎症剤として汎用されるグルココルチコイドがマクロファージによる SAA の取り込みに関しては阻害的に働くことが示唆された。グルココルチコイドの投与によって炎症反応が抑制されれば SAA 産生は減少すると考えられるが、その一方で SAA の取り込み・代謝は阻害されることから、不適切な使用は有害な作用をもたらす可能性が示唆された。

SAA を制御する方法として SAA の作用を阻害することもあげられる。ただし、第 1 章で示されたように、SAA は生体防御や炎症反応の根幹をなす経路 (NF- κ B や TLR4) を介して作用するため、それらの阻害剤については副作用などについて今後慎重に検討する必要がある。

一連の研究によって、SAA の病態生理学的特性の一部が明らかとなった。当初 SAA は炎症マーカーとして注目され、SAA 濃度の高値は炎症の結果としてのみ捉えられてきたが、SAA 自体が病態形成や進行に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。つまり、疾患の進行において、SAA を介した悪循環が生じている可能性がある。原疾患の治療が基本ではあるが、治療法の確立していない疾患や転移性腫瘍において、SAA の制御は有効な補助療法になり得ると考えられ、QOL の改善に役立つかもしれない。SAA の制御についてはまだまだ課題は多いが、本研究がそのひとつのきっかけとなるだろう。今後さらなる研究をおこない、SAA を標的とした新たな治療戦略を発展させていきたい。