

A11 ラット実験的心筋梗塞(MI)における Osteopontin (OPN) の発現と経時的変化

小松原一正、村上 充、草地省藏、二宮善文、武田賢治、岩部明弘、上田敏行、瀬崎悟之、綾田陽子、辻 孝夫
岡山大学・医・第1内科 分子医化学

【目的】OPN は integrin と結合して細胞接着性を示すのみならず細胞遊走能等をもつ糖蛋白で、創傷治癒において debridement や matrix の再構築・線維化への重要な役割が報告されているも MI における検討は無い。MI における OPN の発現と局在を Type I collagen $\alpha 1$ chain [$\alpha 1(I)$] と比較検討した。【方法】雄性 SD rat54 頭を用い、左冠動脈を結紮し梗塞を作成後、経時的に摘出し in situ (ISH)法、Northern blot 法、蛍光抗体免疫染色法を施行した。統計は ANOVA を用いた。【結果】ISH：梗塞作成後 2 日で梗塞境界部に強い発現を認め、7 日には梗塞中心部まで進展し、14 日では梗塞中心部に弱い発現を認めるのみであった。発現細胞は梗塞早期(1-3 日)は macrophage、後期は fibroblast(7 日以降)が主体であった。Northern blot：Sham 心では OPN の発現は認めるも低値であった。梗塞作成後 1 日から発現量は sham 心の 42 倍と増加を認め、2 日には 58 倍と著増し peak に達し、以後減少し 14 日で 14 倍であった。変化は有意である ($P<0.001$)。免疫染色：ISH と同様に蛋白レベルで梗塞部での発現増強が確認された。 $\alpha 1(I)$ との比較：OPN は $\alpha 1(I)$ に比し早期に発現増加し、かつ増加の度合いも大きい。【結論・考案】1) MI における OPN の発現・経時的変化と局在及び発現細胞が証明された。2) macrophage における梗塞早期の発現と、 $\alpha 1(I)$ との比較に加え比較的後期の fibroblast における発現から、OPN は梗塞早期の炎症の時期と、後期の治癒機転の両方に役割を果たしていることが考えられた。

Expression of Osteopontin in the Infarct Zone of Experimentally Induced Myocardial Infarction in Rats

Issei Komatsubara, Takashi Murakami, Shozo Kusachi, Yoshifumi Ninomiya, Kenji Takeda, Akihiro Iwabu, Toshiyuki Ueda, Satoshi Sezaki, Yoko Ayada, Takao Tsuji
1st Dept. of Internal Medicine, Okayama Univ. Medical School
Dept. of Molecular Biology and Biochemistry, Okayama Univ. Medical School

A12 Pycnodysostosis にみられたカテプシン K のシグナルペプチド部分における遺伝子異常とその機能解析

大阪大学医学部整形外科

藤田 良、中田 研、安井夏生、松井好人、片岡英一郎、越智隆弘

【目的】Pycnodysostosis は、低身長、骨硬化症、易骨折性、指趾末節骨末端の融解、鎖骨の形成不全、縫合の閉鎖遅延を伴う頭蓋骨の異常を特徴とする、常染色体劣性の遺伝形式を示す極めてまれな骨系統疾患である。1996 年に、破骨細胞に特異的に発現しているシステインプロテアーゼであるカテプシン K(CK)遺伝子が疾患原因遺伝子であることが報告された。現在までに、5 家系で 4 つの CK 遺伝子の異常が見つかった。我々は pycnodysostosis の 1 家系に対し CK 遺伝子の解析と、その異常遺伝子による発病機序につき細胞生物学的解析を行った。

【方法】典型的な表現型を示す pycnodysostosis 1 症例について、骨折手術時に提供された仮骨および骨髓血からの培養破骨細胞様細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法により CK c-DNA を得、塩基配列を決定した。また、患者および家族の末梢血から genomic DNA を抽出し、CK 遺伝子の塩基配列を決定した。次に、患者 CK-cDNA と正常 CK-cDNA を FLAG-tag をつけ発現ベクター pcDNA3.1 に組み込み、COS-7 細胞にトランスフェクションし、CK 遺伝子発現を RT-PCR 法で、CK 蛋白発現を抗 FLAG 抗体を用いた免疫染色およびウエスタンブロットングにより解析した。

【結果】患者では、シグナルペプチド部分に新しい遺伝子変異である、Leu9 (CCA) の Pro (CTA) への変異がみられた。両親はヘテロで、妹は、正常型のホモであった。正常 80 例では、この変異は認められなかった。患者 CK、正常 CK 導入細胞では、m-RNA の発現はいずれも認められたが、蛋白の発現は、正常 CK 導入細胞では免疫染色により細胞質に認められ、患者 CK 導入細胞では発現が認められなかった。ウエスタンブロットングにおいても、患者 CK を導入した細胞では、正常 CK を導入した場合に比べ蛋白発現の著しい減少が確認された。

【考察】本症例では、CK 遺伝子のシグナルペプチドの異常のため CK の小胞体内へのトランスロケーションが障害され、蛋白発現が障害されたため、CK の機能不全を来し、pycnodysostosis に至ったと考えられる。

A Mutation in the Signal Peptide Region of Cathepsin K that cause Pycnodysostosis

Yoshi Fujita, Ken Nakata, Natsuo Yasui, Yoshito Matsui, Eiichiro Kataoka, and Takahiro Ochi
Dept. of Orthop. Surg., Osaka Univ. Medical School