

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10766

研究課題名(和文) 静脈グラフトにおけるプロスタノイド受容体の発現とポジティブ・リモデリングの誘導

研究課題名(英文) Expression of prostanoid receptors and induction of positive remodeling in vein grafts

研究代表者

西部 俊哉 (NISHIBE, TOSHIYA)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：10261306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：動脈・静脈グラフトに関する研究では、プロスタノイド誘導体が内膜肥厚を始めとするグラフト不全を予防することが示されてきたが、その作用機序は明らかになっていない。そこで、われわれはプロスタノイド受容体に関する発生学的な知見に基づいて、「血管リモデリングの過程で脱分化した血管平滑筋細胞にプロスタノイド受容体が発現し、動脈・静脈グラフトのリモデリングに関与している」との仮説を立てた。

ラット自家静脈移植動物モデルを用いて、血管リモデリングの過程でPGE1及びPGI2の受容体であるEP2及びIPが脱分化した血管平滑筋細胞に発現していることを示し、グラフトリモデリングに関与していることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈・静脈グラフトを使用した血行再建術は虚血性心疾患や下肢閉塞性動脈硬化症などの動脈硬化性疾患に対する治療として広く行われているが、グラフト不全に基づく狭窄や閉塞の問題は解決されていない。薬剤投与や遺伝子導入による新生内膜肥厚の抑制に関する基礎・臨床研究が数多く報告されているが、中でも有効性が認められたもののひとつとしてプロスタノイドがある。本研究では血管リモデリングの過程でプロスタノイドの受容体であるEP2及びIPが脱分化した血管平滑筋細胞に過剰に発現していることを明らかにしたが、この結果はグラフト不全を予防する方法の確立につながるものであり、広く患者に恩恵を与えることに寄与すると考える。

研究成果の概要(英文)：Previous studies on arterial and venous grafts have shown that prostanoids may prevent graft failure due to intimal thickening. However, its mechanism has not yet been clarified. We hypothesized based on the embryological findings of prostanoid receptors that prostanoid receptors are expressed in vascular smooth muscle cells (VSMCs) dedifferentiated during the process of vascular remodeling, and these receptors are involved in positive remodeling of arterial and venous grafts. In a rat autologous vein implantation model, the expression of EP2 and IP (prostacyclin receptor) mRNAs and proteins during graft remodeling was investigated using quantitative polymerase chain reaction and western blotting, respectively. The localization of EP2 and IP was also investigated by immunohistochemistry. We demonstrated that EP2 and IP were expressed in dedifferentiated VSMCs during the remodeling process, and this result suggested that these receptors may be involved in graft remodeling.

研究分野：血管外科学

キーワード：静脈グラフト プロスタノイド EP2 IP リモデリング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動脈グラフトや静脈グラフトを使用した血行再建術は虚血性心疾患や下肢閉塞性動脈硬化症などに代表される動脈硬化性疾患に対する治療として広く行われているが、グラフト不全に基づく狭窄や閉塞などが依然として問題になっている。そのような変化は動脈硬化性病変と同様の機序、すなわち血管壁の炎症に伴う新生内膜肥厚が原因であることが明らかにされつつある。静脈グラフト採取の際、低酸素や加圧、操作などのストレスが内膜障害を引き起こし、その修復治癒の完成まで通常 3~4 週程度かかる。その際、グラフト壁では細胞増殖、細胞死、細胞遊走および細胞外マトリックスの産生・分解をきたすような血管構築の変化(血管リモデリング)が起きることが知られている。内膜障害により血小板の付着や壁透過性の亢進などが起こり、血液より滲み込んだり増殖因子や血管作動性物質が局所に産生されたりして血管平滑筋細胞が成熟型から幼若型へ脱分化して、その結果として血管平滑筋細胞が増殖したり膠原線維の産生が促進されたりして新生内膜肥厚を生ずることが示されている。

また、薬剤投与や遺伝子導入による新生内膜肥厚の抑制に関する臨床研究や基礎研究が数多く報告されているが、その中でも有効性が認められた薬剤のひとつとしてプロスタノイド誘導体がある。プロスタノイドは 1958 年に Bergstrom により単離されて以来、多くの研究者によりその多彩な生体内作用について報告されてきたオータコイドである。心臓血管領域におけるプロスタノイドの生理活性として血管平滑筋細胞の収縮及び弛緩作用や血管壁の炎症反応の抑制作用、血小板凝集の抑制作用などがあるが、それらによる血管リモデリングの調節作用が解明されつつある。

われわれは血管平滑筋細胞に分化や脱分化に伴ってプロスタノイド受容体の発現が変化することが明らかにしており、静脈グラフトにおいては逆に血管平滑筋細胞の脱分化に伴ってプロスタノイド受容体の発現が変化することが予想される。プロスタノイドによる生理活性は細胞膜表面に発現するプロスタノイド受容体の種類によって異なってくる。プロスタノイド受容体には、トロンボキサン A₂、プロスタグランジン I₂ (PGI₂)、PGF₂、PGD₂、PGE₂ にそれぞれ特異的な受容体として TP、IP、FP、DP、EP が存在し、その中でも EP に関しては EP1、EP2、EP3、EP4 のような 4 つのサブタイプに分けられている。心臓血管領域で使用されるプロスタノイドは PGE₁ 誘導体や PGI₂ 誘導体であり、血管平滑筋細胞の弛緩作用や血管壁の炎症反応の抑制作用、血小板凝集の抑制作用の発揮を目的としており、これらの作用を発揮する EP2、EP4、IP のようなプロスタノイド受容体が発現していることが予想される。

動脈・静脈グラフトを使用した研究ではプロスタノイド誘導体が新生内膜肥厚を始めとするグラフト不全を予防することが報告されているが、その作用機序は未だ明らかになっていない。そこで、われわれはプロスタノイド受容体に関する発生的な知見に基づいて、「血管リモデリングの過程で成熟型から幼若型に脱分化した血管平滑筋細胞にプロスタノイド受容体が発現しており、プロスタノイド誘導体が動脈・静脈グラフトのポジティブ・リモデリングを誘導する」と仮説を立てた。

2. 研究の目的

「血管リモデリングの過程で成熟型から幼若型に脱分化した血管平滑筋細胞にプロスタノイド受容体が発現しており、プロスタノイド誘導体が動脈・静脈グラフトのポジティブ・リモデリングを誘導する」と仮説を立て、本研究はその仮説を動物モデルにより証明すること。

3. 研究の方法

(1) 抗体

一次抗体として、ウサギ EP₂ 受容体 (Cayman Chemical)、ヤギ IP 受容体 (Santa-Cruz)、マウス SMemb (Yamasa)、マウス SM アクチン (Dako Cytomation)、マウス Vimentine (Dako) を使用した。陰性対照として、マウス、ウサギ、ヤギ IgG (Santa-Cruz) を使用した。二次抗体として、HRP 標識抗ウサギ IgG (Dako)、HRP 標識抗ヤギ IgG (Santa-Cruz)、FITC 標識抗マウス、ヤギ、ウサギ IgG (Santa-Cruz)、Rodamine 標識抗マウス IgG (Santa-Cruz) を使用した。Hoechst 33342 (Molecular Probes) を核染色に使用した。

(2) 自家静脈グラフト移植動物モデル

10 週齢から 12 週齢の雄 Wister Rat (250~300g) を使用した。硫酸アトロピン 0.15mg/kg、ケタミン 30mg/kg の腹腔内注射により全身麻酔を導入し、14G サーフロー針の外筒を気管内挿管し、1.5%セボフルレンにて吸入麻酔、人工呼吸管理を行った。頸部と腹部を剃毛、消毒し、頸部正中切開し左総静脈を起始部から内・外頸系静脈まで静脈グラフトとして採取した。腹部正中切開し、大動脈を腎動脈分岐部から総腸骨動脈分岐部まで剥離露出した。1000IU/kg のヘパリンナトリウムを陰茎静脈より投与し、大動脈を腎動脈分岐直下、総腸骨動脈直上で遮断し、採取した静脈グラフトを 10-0 ナイロン糸による連続縫合で端々吻合した。遮断を解除し、止血したのち頸部創、腹部創を閉鎖した。

静脈グラフトは術後 1 日、4 日、7 日、14 日、28 日に同様の麻酔を行って両端の大動脈を含めて採取した。移植前の静脈グラフトを対照とした。サンプルは、RNA later RNA Stabilization Regent (Qiagen) で保存、あるいは氷冷生理食塩水でフラッシュして液体窒素で凍結した。免疫蛍光法のサンプルは、氷冷 4%パラホルムアルデヒドで保存した。

(3) RNA 抽出と Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

total RNA は TRIzol Reagent (Invitrogen) で抽出し、DNase I (Qiagen) で処理し、RNeasy mini kit (Qiagen) で精製した。サンプルを RiboGreen RNA Assay Kit (Molecular Probes) で定量し、その濃度を紫外線吸光度法で測定した。また、サンプルを無作為抽出して、1.2%ホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動で定量及び品質確認した。

プロトコールに従って、SuperScript II Reverse t Transcriptase (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行った。得られた cDNA で TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いて real-time qPCR を行った。Prism 7000 (Applied Biosystems) を使用し、50 サイクルで PCR 反応を行った。また、プライマーの増幅効率を検量線の傾きから確認した。得られた値は GAPDH で標準化された。表 1 に EP2 と IP の primer と probe を示す。

表 1. 使用した primer と probe の一覧

EP2	forward	5'-TATTCCAACCTCCTAGTGTGA-3'
	reverse	5'-CTCTTTCTGAAGATACCGC-3'
	TaqMan probe	5'-FAM-CGCATGCAGCTTCGGAGCAAAAGA-TAMURA-3'
IP	forward	5'-AACTTCCGTAATTTTGCTT-3'
	reverse	5'-AAGACCAACACAACAGACAC-3'
	TaqMan probe	5'-FAMCCCTGGGTCTTCATTCCTTTTCCGAAA-TAMURA-3'

(4) Western blotting

SDS-PAGE 後のゲルにメンブレンを密着させ、分離したタンパク質に電圧をかけてゲルからメンブレンに移し、タンパク質を移動させたメンブレンに一次抗体 (前述) を反応させた。メンブレンのシグナルは Amersham ECL Prime Western Blotting Detection System (GE Healthcare Lifescience) を用いて検出し、Lumino-Imageanalyzer LAS-1000 (富士フイルム) によって定量化した。

(5) 免疫蛍光染色

サンプルを OCT コンパウンドに沈め、凍結溶媒で急速凍結した。クライオスタットで 5 μ m の切片に薄切した。一次抗体 (前述) で処理し、EP₂ 及び IP は FITC 標識抗体、平滑筋細胞マーカーは Rhodamine 標識抗体で蛍光染色した。切片は Hoechst 33342 で対比染色した。画像は BX-51 蛍光顕微鏡 (Olympus) を使用して、同一条件で撮影した。

(6) 統計分析

結果は、平均±標準偏差として記載した。グループ間は分散分析に比較した。いずれも両側検定であり、 $p < 0.05$ を統計的に有意差ありとした (Statview, SAS Institute, Cary, NC)。

4. 研究成果

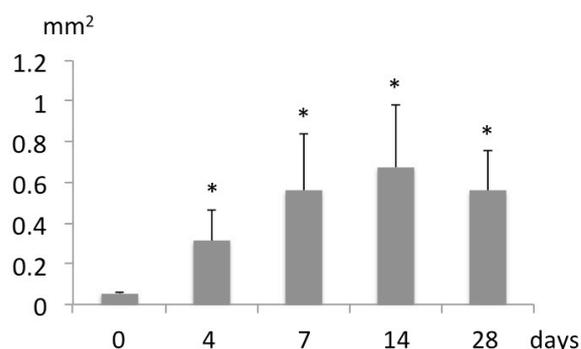
(1) 自家静脈グラフト移植動物モデル

自家静脈グラフト移植動物モデルを作成し、4 日目 (n=5)、7 日目 (n=5)、14 日目 (n=5)、28 日目 (n=5) に犠牲死させ、サンプルを摘出した。対照として、移植前の自家静脈 (n=5) を使用した。

(2) 仮性内膜厚

対照 0.054±0.002mm²、4 日目 0.312±0.075 mm²、7 日目 0.56±0.28 mm²、14 日目 0.673±0.309 mm²、28 日目 0.558±0.099 mm² であり、対照と比較して 4 日目~28 日目で有意に厚くなっていた。

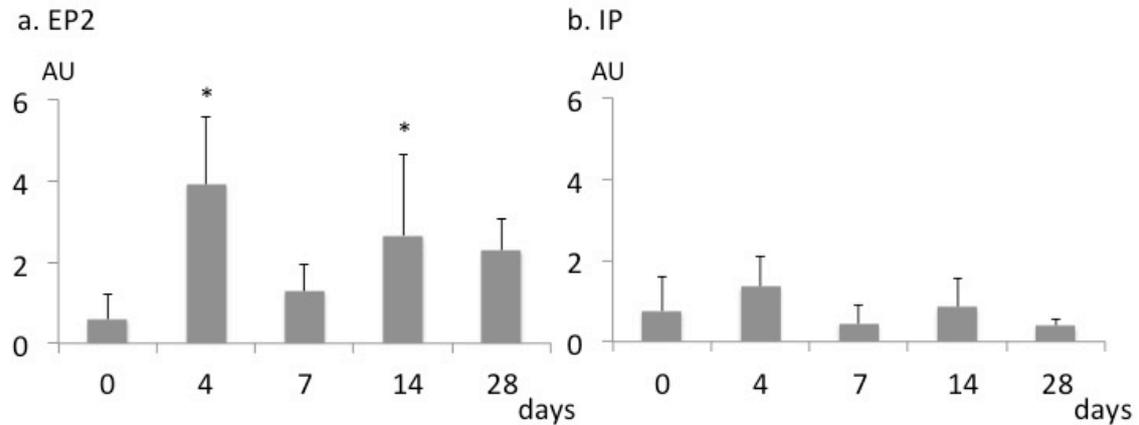
図 1. 仮性内膜厚



(3) EP2 および IP mRNA の発現

EP2 mRNA の転写レベルは、対照 0.58 ± 0.31 、4 日目 3.90 ± 0.84 、14 日目 2.65 ± 1.01 、28 日目 2.28 ± 0.39 であり、対照と比較して 4 日目と 14 日目で有意に上昇していた。(図 2a)。IP mRNA の転写レベルは、対照 0.75 ± 0.83 、4 日目 1.35 ± 0.74 、14 日目 0.85 ± 0.72 、28 日目 0.39 ± 0.18 であり、対照と比較して 4 日目に上昇傾向にあった (図 2b)。

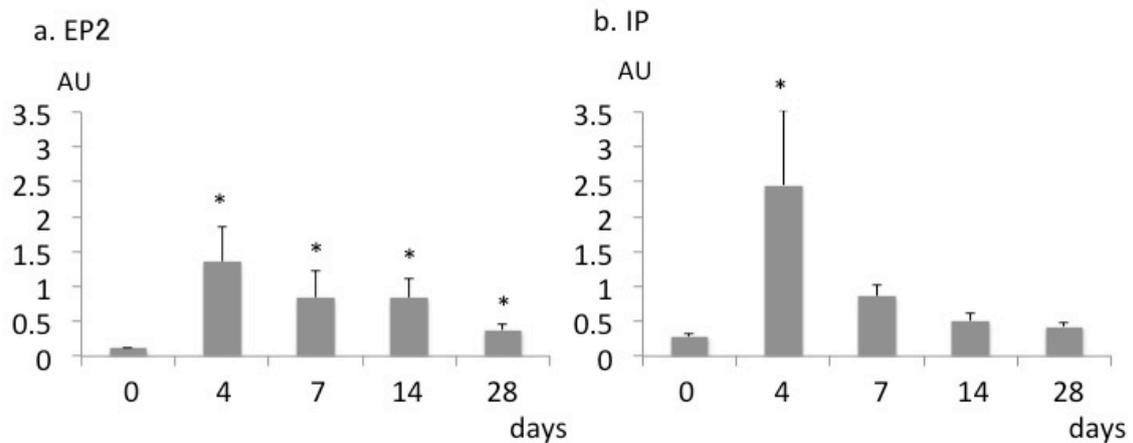
図 2. EP₂ 及び IP mRNA の発現 (AU, arbitrary unit; *, $p < 0.05$)



(3) EP2 および IP タンパク質の産生

EP2 タンパク質は、対照 0.34 ± 0.08 、4 日目 2.13 ± 0.21 、7 日目 3.38 ± 0.88 、14 日目 4.64 ± 0.84 、28 日目 2.42 ± 0.46 であり、対照と比較して 4~28 日目で有意に上昇していた。IP タンパク質は、対照 0.28 ± 0.03 、4 日目 2.45 ± 1.06 、7 日目 0.85 ± 0.17 、14 日目 0.51 ± 0.12 、28 日目 0.42 ± 0.05 であり、対照と比較して 4 日目に有意に上昇していた。

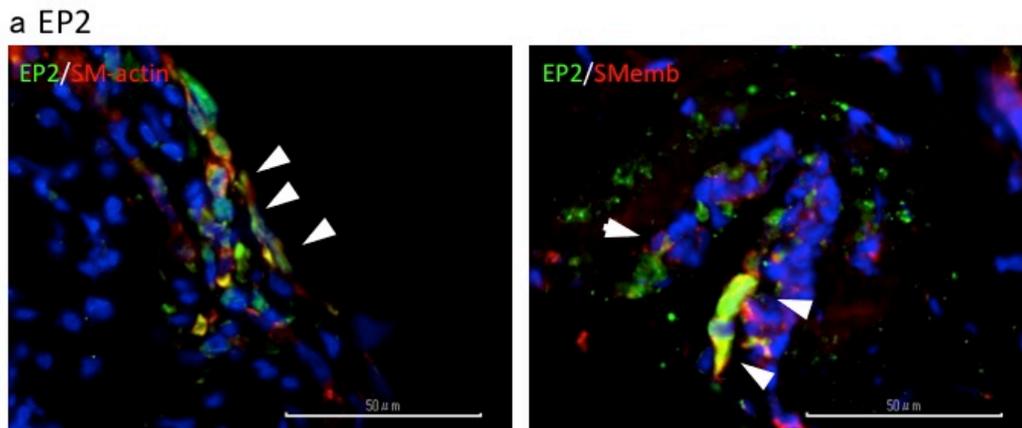
図 3. EP₂ 及び IP タンパク質の産生 (AU, arbitrary unit; *, $p < 0.05$)



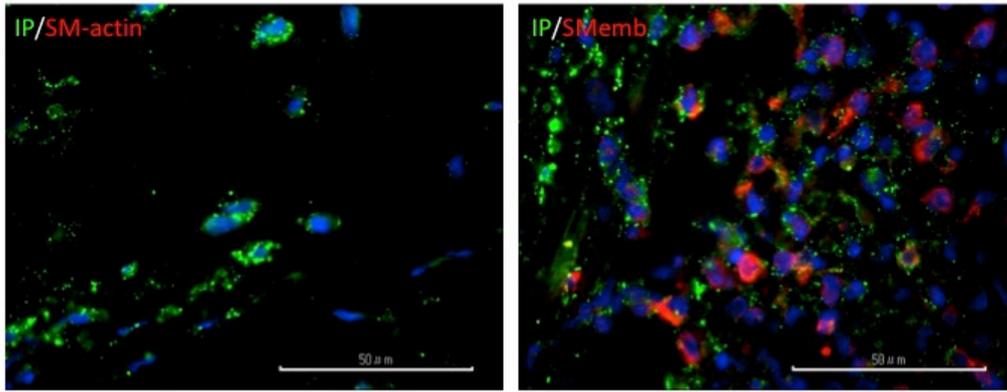
(4) EP2 及び IP の局在

蛍光免疫染色によれば、EP2 は血管平滑筋細胞に局在しており、とくに幼若型血管平滑筋細胞に局在していた (図 4a: 矢印)。IP は幼若型血管平滑筋細胞に局在した (図 4b)。

図 4. EP₂ 及び IP の局在



b. IP



(5) まとめ

静脈グラフトは、内膜障害により血管平滑筋細胞が成熟型から幼若型へ脱分化して、結果として血管平滑筋細胞が増殖したり膠原線維が産生したりして新生内膜肥厚を生ずるが、本研究によってその過程で幼若化した血管平滑筋細胞が血管拡張作用や血管平滑筋細胞増殖抑制作用を有する PGE₂ や PGI₂ のようなプロスタノイドの受容体 (EP2 や IP) を発現することが明らかになった。これは体内の恒常性 (ホメオスターシス) を保つための修復治癒機転の一環と考えられる。

今後の課題として、PGE₁ 誘導体や PGI₂ 誘導体の投与が発現した EP2 や IP を介してポジティブ・リモデリングを促進し、移植後の新生内膜肥厚を抑制することができるかを直接証明することがある。現在、自家静脈グラフト移植動物モデルに浸透圧ポンプを植え込み、PGE₁ 誘導体あるいは PGI₂ 誘導体を経静脈的に持続投与し、同様の評価を行い、静脈グラフトのリモデリングの変化を調べることを計画中である。

<引用文献>

- ①. Fuxian Z, **Nishibe T**, Yasuda K, Yingji J, Changming Z, Zuotian M. Effect of cilostazol on endothelial cell denudation and proliferation in canine vein grafts. *Surg Today*. 31:891-4, 2001.
- ②. Kudo FA, Kondo Y, Muto A, Miyazaki K, Dardik A, Nishibe M, **Nishibe T**. Cilostazol suppresses neointimal hyperplasia in canine vein grafts. *Surg Today*. 39:128-32, 2009.
- ③. Muto A, Kondo Y, Pimiento JM, Fitzgerald TN, Dardik A, **Nishibe T**. Vasodilator response correlates with outcome in chronic critical limb ischemia. *J Surg Res*. 161:156-61, 2010.
- ④. Muto A, **Nishibe T**, Miyauchi Y, Kondo Y, Yamamoto Y, Dardik A, Shigematsu H. Prostaglandin receptors EP2 and IP are detectable in atherosclerotic arteries and plaques. *Int Angiol*. 29:43-8, 2010.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西部俊哉 武藤紹土 近藤ゆか 荻野 均
2. 発表標題 静脈グラフトにおけるプロスタノイド受容体（EP2）の発現に関する研究
3. 学会等名 第119回日本外科学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----