

平成 21 年 5 月 16 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591227
 研究課題名 (和文) 血管炎に伴う血管虚血下の血管内皮細胞・平滑筋細胞の機能および応答機構の解明と治療
 研究課題名 (英文) Evaluation of the function and response mechanism in vascular endothelial cell and smooth muscle cell caused by vasculitis, and its treatment.
 研究代表者
 小川 俊一 (OGAWA SHUNICHI)
 日本医科大学・医学部・教授
 研究者番号：50194436

研究成果の概要：

血管炎症後に長時間虚血を誘発した細胞は、炎症のみの細胞、正常細胞に比し、細胞膜およびミトコンドリアの K_{ATP} チャンネル電流密度は有意に低下し、血管の虚血により血管平滑筋細胞障害が惹起されることが示唆された。さらに、分子生物学的検討においても血管炎後に血管虚血を誘発し、それが長期間に亘ることにより血管内皮細胞機能は有意に低下することが推察された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：血管炎、血管虚血、血管内皮細胞、血管内皮機能、血管平滑筋

1. 研究開始当初の背景

全身の血管炎を主たる病態とする川崎病の後遺症で問題になるのは冠動脈瘤およびその前後に形成される狭窄性病変である。この様な異常な冠血行動態を起こす冠動脈障害の初期病変は冠動脈瘤の形成にある。我々は巨大冠動脈瘤の形成された部位に動脈硬

化・血管老化現象が惹起されていることを報告しているが(深澤隆治、小川俊一: Coronary artery aneurysm induced by Kawasaki disease in children show features typical senescence. Circ J. 2007 71(5):709-15.)それは、冠動脈瘤形成よりほんの数ヶ月後にはすでに観察される。動脈瘤が形成された血管壁は血管再構

築の一環として内膜の増殖を中心に、血管壁が肥厚する。さらに、川崎病では内膜側だけでなく外膜側の障害が著しく、病理組織学的には汎血管炎となっている。当然、冠動脈の栄養血管である *vasa vasorum* も血管炎を起こし、周囲の組織障害と相俟って血管障害を惹起し、血管壁に十分な血流を供給出来ない状態となっていることが考えられる。以上より、血管壁自体の肥厚、および栄養血管障害が相俟って冠動脈瘤の血管壁は虚血を起こしている可能性が示唆される。この血管の虚血に伴い、さらなる血管自体の形態的变化、機能異常が進行し、動脈硬化、石灰化などの病的状態に進んでいくことが予想される。現在までに、血管炎に伴う血管虚血下の血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の機能異常および虚血に対する応答機構に関しての報告はない。

2. 研究の目的

血管炎に伴い、動脈の栄養血管である *vasa vasorum* も血管炎を起こし、周囲の組織障害と相俟って血管障害を惹起し、血管壁に十分な血流を供給出来ない状態となっていることが考えられる。以上より、血管壁自体の肥厚、および栄養血管障害が相俟って冠動脈瘤の血管壁は虚血を起こしている可能性が示唆される。血管炎に伴う血管壁の虚血により以下の現象が引き起こされる可能性があると考えている。①血管内皮機能の低下による収縮・弛緩機構の破綻、②血管内皮細胞機能低下に伴い血栓形成が助長される、③血管内皮細胞障害に伴う慢性の血管炎、およびそれに伴う動脈硬化の発症、④血管平滑筋細胞の分化異常が起こり構成型より分泌型に変化し、動脈硬化の発症に関与する、⑤さらに、分泌型に分化した血管平滑筋細胞やマクファージが骨芽細胞遺伝子の発現を誘導し血管壁の石灰化に関与する。以上の仮説を証明するために、血管炎を起こした動脈壁より血管平滑

筋細胞および血管内皮細胞を分離し、虚血負荷を加え、それぞれの細胞機能、応答機構の検討を行う。

3. 研究の方法

1). 血管炎の作成

ラット成獣に対し、馬血清 10ml/kg を 1 週間間隔で 2 回静脈内投与をし、この間、経時的に体表面心エコー図にて動脈壁を中心に血管炎の形成過程を検討する。

2). 血管炎を起こした左鎖骨下動脈の摘出および血管平滑筋細胞の単離

体表面エコーにて血管炎の形成を確認後、エーテル麻酔下に開胸し無菌的に左鎖骨下動脈を摘出し、リング状の動脈を縦方向に切開し、板状の血管標本を作製した。内膜を綿棒で擦過し、内膜を除去した。摘出した動脈を Ca-free Hanks 液 (組成 mM: NaCl 138.8, KCl 5.4, NaH₂PO₄ 1.2, MgCl₂ 0.5, HEPES 10, EGTA 0.1, PH7.4) に入れた。次に、papain (0.4mg/ml, Sigma 社), dithiothreitol (0.19mg/ml, Sigma 社), bovine serum albumin (0.2mg/ml, Sigma 社) を含む Hanks 液中で摘出した動脈を細切し、37°C で 5-8 分間インキュベートした。次に動脈組織を collagenase (0.25mg/ml, Yakult 社) を含む液で 37°C 5-7 分インキュベートした後、酵素を含まない液に移し、保存した。使用する毎に組織片を液中で攪拌し、単離血管平滑筋細胞を取り出した。

3). 血管炎を伴う血管平滑筋細胞の虚血条件下での微小電気生理学的検討

(1) 血管炎が惹起された血管平滑筋細胞、および血管炎が惹起されていない正常の血管平滑筋細胞を用いて、それぞれの細胞に対して、K_{ATP} チャンネル開口薬である Pinacidil (100mM) を作用させ Ramp-pulse による whole cell パッチクランプ法を用いて、Pinacidil 依存性の K_{ATP} チャンネル電流密度の測定を行った。さらに、K_{ATP} チ

チャンネル阻害薬である Glibenclamide (2mM) を添加し、 K_{ATP} チャンネル電流の抑制効果を検討した。全細胞電流 (Whole-cell 電流) 記録のための細胞灌流液: Tyrode 液 (細胞灌流液) の組成 (mM): NaCl 143, KCl 5.4, NaH_2PO_4 0.33, $MgCl_2$ 0.5, $CaCl_2$ 1.8, glucose 5.5, HEPES 5, $CdCl_2$ 0.2mM (Ca^{2+} current の阻害のため) (pH 7.4, KOH にて補正)。パッチ電極内組成 (mM): KOH 120, KCl 20, $MgCl_2$ 2, HEPES 5, EGTA 10, ATP-Mg 1, Aspartic Acid 60 (pH 7.2, Aspartic Acid にて補正)。なお、 K_{ATP} チャンネルを誘発する際には、glucose を含まない Tyrode 液に、Cyanide (2mM, 酸化阻害) とイソプロピルイソチオシアネート (IAA 5mM, 解糖系を阻害) を加えて、細胞を灌流した。すべての電気生理学的実験は室温 (約 22°C) にて施行した。

(2) Cyanide による虚血誘発下の血管平滑筋細胞の K_{ATP} チャンネル電流密度の測定

単離した血管平滑筋細胞を代謝阻害薬としてシアン化ナトリウム (NaCN 2mM, 酸化阻害) とイソプロピルイソチオシアネート (IAA 5mM, 解糖系を阻害) を添加し、虚血モデルとした (Yokoshiki H et al. Pflugers Arch 1999)。短時間虚血処理 (10 分間)、長期間虚血処理 (60 分間) を行い、虚血処理を行わない以上 3 群の血管炎惹起細胞系を用いて whole cell K_{ATP} チャンネル電流密度およびミトコンドリア K_{ATP} チャンネル電流密度の測定を行い比較検討し、虚血プレコンディショニング効果を検討した。Cyanide (2mM, 酸化阻害) とイソプロピルイソチオシアネート (IAA 5mM, 解糖系を阻害) を添加し、Ramp-pulse による whole cell K_{ATP} チャンネル電流密度の測定を行った。さらに、 K_{ATP} チャンネル阻害薬である Glibenclamide (2mM) を添加し、 K_{ATP} チャンネル電流の抑制効果を検討した。

4) HUVEC を用いた、虚血誘発下における血管内皮細胞の作動性物質を中心とした発現の検討

Confluent に培養された HUVEC を

TNF α 100pM Over night で刺激し、血管内皮細胞の炎症を惹起させた。さらに TNF α 負荷した培養 HUVEC を用い、シアン化ナトリウム (NaCN 2mM, 酸化阻害) とイソプロピルイソチオシアネート (IAA 5mM, 解糖系を阻害) を添加し、虚血モデルとした (Yokoshiki H et al. Pflugers Arch 1999)。虚血負荷時間は、15 分、30 分、1 時間、2 時間、8 時間である。正常の HUVEC, TNF α のみ負荷したもの、それぞれの時間で虚血処理をしたものの Plate の培養液を保存、および細胞は Takara RNA Kit Lysis Buff 600 ul (6Mercaptoethanol 入り) に溶かしこんで保存。培養細胞より RNA を抽出し、既存の AppliedBio 社製のプロトコルを用いて定量 PCR 法により以下の血管作動性物質・炎症性物質の発現を検討した。IL-6, IL-8, ET-1, Ang II, VEGF, TGF β 、ICAM-1, VCAM-1, RAGE。

4. 研究成果

1) 血管炎を伴う血管平滑筋細胞の虚血条件下での微小電気生理学的検討

(1) 血管炎による血管平滑筋細胞の K_{ATP} チャンネル電流

血管炎が惹起された動脈の血管平滑筋細胞は、正常の血管平滑筋細胞に比し、有意に K_{ATP} チャンネル電流密度は低下した (Table 1)。

Table 1

	n	K_{ATP} 電流密度 (pA/pF)
血管炎が惹起された血管平滑筋細胞	4	11.3 ± 4.8*
正常の血管平滑筋細胞	5	46.8 ± 6.9

* p<0.05 vs. other group

また、上記の血管平滑筋細胞において Pinacidil 添加により増加した K_{ATP} チャンネル電流は Glibenclamide の添加により完全に抑制された。

以上より、血管炎により血管平滑筋細胞の Pinacidil 依存性の K_{ATP} チャンネル密度は減少し、活動電位の延長が惹起され、それにより流入する Ca^{2+} が増加し、細胞内 Ca^{2+} の過負荷による細胞障害が惹起される可能性が示唆された。

(2) Cyanide による虚血誘発下の血管平滑筋細胞の K_{ATP} チャンネル電流密度の測定
短時間の 2mM の Cyanide の添加による虚血処理した血管平滑筋細胞の K_{ATP} チャンネルの outward current は虚血処理を施していないもの、長時間虚血処理を施したものに比し、有意に電流密度は増加した (Table 2)。

Table 2

	n	K_{ATP} 電流密度 (pA/pF)
短時間虚血処理	4	35.1 ± 4.8 *
長時間虚血処理	4	8.3 ± 2.3 *
虚血処理無し	5	12.5 ± 4.6

p<0.05 vs. other groups

一方、長期間虚血処理をした血管平滑筋細胞に於ける K_{ATP} チャンネル電流密度は虚血処理を施していない細胞に比し有意に低下した (Table 2)。

さらに、3 系列の血管平滑筋細胞において、 K_{ATP} チャンネル電流は Glibenclamide により完全に抑制された。Cyanide 添加により一時的に虚血を惹起したわけだが、この結果より、短期間の虚血処理では K_{ATP} チャンネル電流は増加し、逆に長期の虚血処理では K_{ATP} チャンネル電流は有意に低下した。つまり、血管に恒常性に虚血がもたらされる事により K_{ATP} チャンネル機能は低下する。

次に、血管炎が惹起され、かつ長時間虚血が誘発された血管平滑筋細胞のミトコンドリア K_{ATP} チャンネル電流は有意に低下した。一方、短時間虚血処理をした細胞では虚血処理を施していないものに比し有意に電流密度は増加した。(Table 3)。

Table 3

	n	K_{ATP} 電流密度 (pA/pF)
短時間虚血処理	4	13.6 ± 1.3*
長時間虚血処理	4	2.6 ± 1.8*
虚血処理無し	4	6.1 ± 1.2

p<0.05 vs. other groups

なお、3 系列の血管平滑筋細胞 K_{ATP} チャンネル電流は Glibenclamide の投与により完全に抑制された。

これらのことは、恒常的に血管虚血が存在すると血管平滑筋細胞膜の K_{ATP} チャンネル電流と同様にミトコンドリアの K_{ATP} チャンネル電流も有意に減少し、電気生理学的な血管平滑筋細胞障害が惹起されることが明らかになった。

2) 虚血誘発下における血管内皮細胞作動性物質を中心とした関連物質の発現結果

(1) サイトカインの変動

TNF α で刺激し、血管炎と同様の刺激を与えると IL-6 は変動しないが、IL-8 は有意に増加し、その後の虚血誘導により IL-8 は有意に低下した。なお、虚血の誘導後 IL-6 の変動は有意ではなかった (Table 4)。

Table 4

	IL-6	IL-8
cont	1.0 ± 0.08	1.0 ± 0.02
TNF α	0.97 ± 0.03	1.2 ± 0.01*
15 min	0.96 ± 0.03	1.05 ± 0.04
30 min	0.99 ± 0.04	1.01 ± 0.06
1 h	0.97 ± 0.04	0.97 ± 0.01*
2 h	0.98 ± 0.02	0.97 ± 0.01*
8 h	0.95 ± 0.09	0.96 ± 0.01*

* p<0.05, vs. control

(2) 接着因子の変動

接着因子においては ICAM-1 および VCAM-1 は TNF α 刺激後有意に増加し、そのご虚血誘導により有意に低下した (Table 5)。

Table 5

	ICAM-1	VCAM-1
cont	1.0 ± 0.03	1.0 ± 0.02
TNF α	1.03 ± 0.02*	1.04 ± 0.01*
15 min	1.01 ± 0.05	1.01 ± 0.01
30 min	0.98 ± 0.03	1.01 ± 0.02
1 h	0.97 ± 0.04	1.01 ± 0.01
2 h	0.98 ± 0.01	1.0 ± 0.03
8 h	0.95 ± 0.01*	0.96 ± 0.01*

* p<0.05, vs. control

(3) growth factors の変動

TGF β 、VEGF 共には TNF α 刺激後に傾向を示し、虚血誘導によりより増加、虚血誘導 2 時間後より VEGF は有意に増加し、虚血に伴う血管新生に寄与していることが推察された(Table 6)。

Table 6

	TGF β	VEGF
cont	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.04
TNF α	1.01 ± 0.03	1.01 ± 0.03
15 min	1.02 ± 0.03	1.05 ± 0.03
30 min	1.02 ± 0.02	1.02 ± 0.05
1 h	1.04 ± 0.04	1.03 ± 0.02
2 h	1.05 ± 0.02	1.11 ± 0.01*
8 h	1.09 ± 0.02*	1.12 ± 0.01*

* p<0.05, vs. control

(4) ET-1 および Ang II の変動

血管内皮作動性物質である ET-1(Endothelin-1) および Ang II (Angiotensin-II)の変動は、TNF α 刺激後有意に増加し、その後の虚血誘導にて減少傾向を示した。しかしそれは有意では無かった。

(5) RAGE の変動

RAGE(Receptor of advanced glycation endproducts)は血管の老化に深く関与するが、TNF α 刺激およびその後の虚血誘導によりさらに増加する傾向にあったが、その変動は有意ではなかった。

まとめ

血管炎後の虚血誘導により血管内皮細胞機能は分子生物学的に見てもその機能は明らかに低下している。虚血後の血管新生に関する成長因子である VEGF のみ有意な増加を示した。以上より、血管炎後に長期間虚血の状態に曝されることにより血管内皮機能は有意に低下することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Ryuji Fukazawa, Ei Ikegam, Miki Watanabe, Miharuru Hajikano, Mitsuhiro Kamisago, Yasuhiro Katsube, Hitoshi Yamauchi, Masami Ochi, Shunichi Ogawa. Coronary artery aneurysm induced by Kawasaki disease in children show features typical senescence. Circ J. 2007 71(5):709-15. 査読あり

2. Ryuji Fukazawa, Shunichi Ogawa. Long-Term Prognosis of Patients with Kawasaki Disease: At Risk for Future Atherosclerosis? J Nippon Med Sch. 2009 (in print). 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

1. Shunichi Ogawa, Ryuji Fukazawa, Mitsuhiro Kamisago, Ei Ikegami, Miki Watanabe, Miharuru Hajikano, Masanori Abe, Yasuhiro Katsube.

Estimation of silent myocardial ischemia caused by coronary microcirculatory disturbance after Kawasaki disease. European Society of Cardiology Congress 2008, 2008年9月1日, Munich, Germany

2. Yasuhiro Katsube, Shunichi Ogawa. A new marker for vasculitis, pentraxin 3, is elevated in patients with Kawasaki disease. European Society of Cardiology Congress 2008, 2008年9月2日, Munich, Germany

3. Ryuji Fukazawa, Shunichi Ogawa. Inositol 1,4,5-Triphosphate 3-Kinase C polymorphism associated with disease severity and coronary artery lesions in Kawasaki disease. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009年3月22日,大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 俊一 (OGAWA SHUNICHI)
日本医科大学・医学部・教授
研究者番号：50194436

(2) 研究分担者

勝部 康弘 (KATSUBE YASUHIRO)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20246523

深澤隆治 (RYUJI FUKAZAWA)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：80277566

(3) 連携研究者