

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590875

研究課題名(和文) 薬物溶出性ステント留置血管の機能異常発現に関する分子機序の解明

研究課題名(英文) Molecular Mechanisms of Hyper-contraction of Drug-eluting Stent Implanted Coronary Arteries

研究代表者 安田 聡 (YASUDA SATOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00431578

研究成果の概要(和文)：薬物溶出性ステント(DES)は近年冠動脈インターベンションの中心的な役割を担っており、これまで全世界で約 600 万人が植え込み術をうけている。DES 留置後の機能異常発現に関する分子機序として、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho を標的蛋白質として同定された細胞内セリンスレオニンリン酸酵素である Rho-キナーゼが重要な役割を果たしていることを動物モデル・ヒトにおいて明らかになった。また臨床的に汎用されるカルシウム拮抗薬ニフェジピンに Rho キナーゼ抑制・DES 留置血管保護作用があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence indicates that coronary vasoconstricting responses are enhanced at the edges of coronary segment implanted with drug-eluting stents (DES) compared with bare-metal stent (BMS) in humans. We have recently demonstrated that Rho-kinase pathway plays an important role in DES-induced coronary hyperconstricting responses in pigs in vivo and in patients with coronary artery diseases. Also, chronic treatment with long-acting nifedipine suppresses DES-induced coronary hyperconstricting responses and inflammatory changes, at least in part, through Rho-kinase pathway inhibition in pigs in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：循環器病学

科研費の分科・細目：ライフサイエンス

キーワード：循環器・高血圧, トランスレシヨナルサーチ

1. 研究開始当初の背景

Rho キナーゼは、細胞内 Ca²⁺濃度非依存的に血管平滑筋の収縮弛緩を制御する重要な分子スイッチである。収縮性血管作動物質の刺激により G 蛋白質に共役した受容体を介して低分子量 G 蛋白質である Rho が活性化さ

れ、その標的タンパクの一つである Rho キナーゼが活性化される。活性化された Rho キナーゼは、ミオシン軽鎖脱リン酸化酵素(MLCPh)のミオシン結合サブユニット(MBS)をリン酸化することによりその活性を阻害する。その結果、MLCK/MLCPh 活性のバランスが崩れ、MLC のリン酸化が上

昇することで血管平滑筋は過収縮する (Shimokawa H, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1767-75.)。

ステント治療に代表される冠動脈インターベンション(PCI)は、バイパス手術に比べより低侵襲であり薬物療法に比べより血行再建(血流増加)を達成し得ることから、虚血性心疾患に対する治療法として中心的な役割を果たしてきた。特に近年金属ステント表面に免疫抑制剤を含有したポリマーが塗布されており薬剤が徐放される薬物溶出性ステント(DES: drug-eluting stent)が登場し、その使用頻度は増加の一途をたどり、全 PCI の 60~70% を占めるに至っている。一方で DES に伴う遅発性ステント血栓症や血管反応性の異常(冠動脈攣縮)の報告もされている。これらの血管機能異常発現のメカニズム解明は、DES をより安全に効果的に使用するために不可欠である。

2. 研究の目的

DES 留置血管の機能異常発現に関する分子機序を明らかにすること。

3. 研究の方法

十分な鎮静麻酔・ヘパリン投与下に、ミニブタ(雄、体重 25~30 kg) 左総頸動脈よりカテーテルを挿入、左前下行枝・左回旋枝に DES あるいは BMS を留置する。DES: Cypher™ に対しては BMS: BX Velocity™ を、DES: Taxus™ に対しては BMS: Express™ を、ステント径・長を一致させて使用した。ステント留置前後でセロトニン(5-HT) 10 μ g/kg、100 μ g/kg、ブラディキニン 0.1 μ g/kg、ニトログリセリン 10 μ g/kg の冠動脈内注入に対する血管反応性を評価した。また、選択的 Rho-キナーゼ阻害薬である hydroxyfasudil 事前投与後にセロトニンによる血管収縮反応を再検する。実験 2 日前よりアスピリン 300mg + クロピドグレル 150mg を投与し、以降慢性期(4 週間)再評価を行った。血管反応性評価後、過量のペントバルビタールにて安楽死後心摘出、左右の冠動脈を生理食塩水 1000ml で灌流後 5%ホルマリン 2000ml を用いて固定し、ステント留置部位およびその周辺部位の再内皮化の程度・血栓形成・炎症性細胞浸潤について検討した。

冠動脈疾患患者(ヒト)においても、ステント留置後の血管反応性をアセチルコリン冠動脈内投与にて評価し、DES 留置群と金属ステント(BMS)留置群で比較検討した。

4. 研究成果

1) In vitro 研究: ヒト冠動脈平滑筋細胞に

において、パクリタキセルを臨床的組織濃度である 10^{-9} ~ 10^{-6} mol/L とともに 24 時間培養すると Rho-kinase \cdot (ROCK2) と Rho-kinase \cdot (ROCK1) の mRNA 発現が濃度依存性に亢進した (n=9)。また、同細胞を 10^{-8} mol/L のパクリタキセルとともに 24 時間培養すると Rho-kinase 活性が亢進した (n=6)。血管平滑筋細胞における Rho/Rho-kinase 経路へのパクリタキセルの直接的な影響が示唆された。

2) In vivo 研究: 家畜ブタにパクリタキセル溶出性ステント (PES) と同様のプラットフォームを持つ金属ステント (BMS) を留置し 4 週後に血管反応性の評価を行った。セロトニン 100 μ g/kg 冠動脈内投与により、BMS と比較して PES 留置周囲部分では血管過収縮がより顕著であった (PES -53 ± 3 vs. BMS $-32 \pm 4\%$, n=6, $P < 0.01$)。セロトニンによる血管過収縮は選択的 Rho-kinase 阻害薬 hydroxyfasudil (100 μ g/kg/3 min) の事前投与により抑制された。一方ブラディキニンによる内皮依存性弛緩反応は両群で差異は認められなかった。

3) Ex vivo 研究: ステント留置部の近位端と遠位端の血管を単離し内膜除去後に、セロトニン負荷 (1×10^{-9} ~ 3×10^{-6} mol/L) により生じる等尺性張力の検討を行ったところ、BMS 留置血管と比較して PES 留置血管でより強い収縮が認められた。

4) 組織学的検討: PES 留置血管ではステント周囲の微小血栓の形成、ならびに炎症性細胞の浸潤が BMS に比しより高率に認められた。

5) 臨床研究: 冠動脈疾患患者(ヒト)においても、アセチルコリン冠動脈内投与に対する血管反応性を DES 留置群と BMS 留置群で比較検討した。動物実験と同様、DES 群で血管過収縮反応が認められ、Rho キナーゼ選択的阻害薬 hydroxyfasudil によりその反応は抑制された。なお約 10 μ m という高度画像分解能を有する光干渉断層撮影装置 (Optical Coherence Tomography: OCT) を用いた評価では、過収縮反応を示すステント周辺部位に血管形態(内膜肥厚の程度)に両群間で明らかな差異は認められなかった。すなわち機能的異常がより大きな役割を果たしている可能性が示唆された。

6) In vivo 薬物介入研究: ブタステントモデルにおいて、臨床的に汎用されるカルシウム拮抗薬・ニフェジピン (4mg/kg 体重/日) をステント植え込み 3 日前より、血管反応性試験の 1 日前まで 4 週間投与を行うと、組織での Rho キナーゼ発現・活性ともに低下し、セロトニンに対する過収縮反応も抑制された。ニフェ

ジピンは DES 留置血管に対して保護的に作用することが明らかになった。

以上の一連の結果より、DES による冠動脈過収縮反応の病態に Rho-kinase 経路が重要な役割を果たしていることが明らかになった。カルシウム拮抗薬が Rho-キナーゼ阻害効果を有する DES 留置血管保護薬として有用である可能性が示唆された。

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 6 件)

- 1) Tsuburaya R, Yasuda S, Shiroto T, Ito Y, Gao JY, Aizawa K, Kikuchi Y, Ito K, Takahashi J, Ishibashi-Ueda H, Shimokawa H. Treatment with nifedipine suppresses coronary hyperconstricting responses and inflammatory changes induced by paclitaxel-eluting stent in pigs in vivo -Possible involvement of Rho-kinase pathway- Eur Heart J. 2011(in press) 査読有り
- 2) Kikuchi Y, Yasuda S, Aiazawa K, Tsuburaya R, Ito Y, Takeda M, Nakayama M, Ito K, Takahashi J, Shimokawa H. Enhanced Rho-kinase activity in circulating neutrophils of patients with vasospastic angina. -possible biomarker for diagnosis and disease activity assessment - J Am Coll Cardiol. 2011 (in press) 査読あり
- 3) Gao JY, Yasuda S, Tsuburaya R, Ito Y, Shiroto T, Hao K, Aizawa K, Kikuchi Y, Ito K, Shimokawa H. Long-Term Treatment with Eicosapentaenoic Acid Ameliorates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Pigs in Vivo - Involvement of Rho-kinase Pathway Inhibition -. Circ J.2011 (in press) 査読有り
- 4) Tsuburaya R, Yasuda S, Ito Y, Shiroto T, Gao YJ, Ito K, Shimokawa H. Eicosapentaenoic acid reduces ischemic ventricular fibrillation via altering monophasic action potential in pigs. J Moll Cell Cardiol. 2011 (in press) 査読有り
- 5) Yasuda S, Shiroto T, Shimokawa H. Authors' reply. J Am Coll Cardiol. 2010;

55: 1399-1400. 査読有り

- 6) Shiroto T, Yasuda S, Tsuburaya R, Ito Y, Takahashi J, Ito K, Ishibashi-Ueda H, Shimokawa H. Role of Rho-kinase in the pathogenesis of coronary hyperconstricting responses induced by drug-eluting stent in pigs in vivo. J Am Coll Cardiol. 2009; 54:2321-2329. 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

- 1) Aizawa K, Yasuda S, Takahashi J, Takii T, Kikuchi Y, Tsuburaya R, Ito Y, Ito K, Nakayama M, Takeda M, Shimokawa H. Involvement of Rho-kinase Activation in the Pathogenesis of coronary hyperconstricting responses by drug-eluting stents in patients with coronary artery disease. 日本循環器学会学術集会: 2011年3月18~21日; 横浜
- 2) Tuburaya R, Yasuda S, Aizawa K, Gao JY, Ito Y, Shiroto T, Ito K, Ishibashi-Ueda H, Shimokawa H. Long-term treatment with nifedipine suppresses coronary hyperconstricting responses induced by paclitaxel-eluting stent in pigs in vivo -Possible involvement of Rho-kinase. 日本循環器学会学術集会: 2011年3月18~21日; 横浜
- 3) Kikuchi Y, Aizawa K, Yasuda S, Tsuburaya R, Ito Y, Matsumoto Y, Takeda M, Nakayama M, Ito K, Takahashi J, Shimokawa H. Rho-kinase activity in circulating neutrophils for diagnosis and disease activity assessment of vasospastic angina. 日本循環器学会学術集会: 2011年3月18~21日 2011年3月18~21日; 横浜
- 4) Gao JY, Yasuda S, Tsuburaya R, Ito Y, Aizawa K, Kikuchi Y, Ito K, Shimokawa H. Long-term treatment with eicosapentaenoic acid ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs in vivo -Potential involvement of Rho-kinase pathway-日本循環器学会学術集会: 2011年3月18~21日; 横浜
- 5) Tsuburaya R, Yasuda S, Aizawa K, Gao

J, Ito Y, Shiroto T, Ito K, Ishibashi-Ueda H, Shimokawa H. Long-term treatment with nifedipine suppresses coronary hyperconstricting responses and inflammatory changes induced by paclitaxel-eluting stent in pigs in vivo: possible involvement of rho-kinase pathway. Annual Scientific Meeting of the American Heart Association; 2010年11月13日～17日; Chicago, USA.

6) Gao JY, Yasuda S, Tsuburaya R, Ito Y, Aizawa K, Kikuchi Y, Ito K, Shimokawa H. Long-term treatment with eicosapentaenoic acid ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs in vivo -A potential role of Rho-kinase pathway-. Annual Scientific Meeting of the American Heart Association; 2010年11月13日～17日; Chicago, USA.

7) Kikuchi Y, Aizawa K, Yasuda S, Tsuburaya R, Ito Y, Nakayama M, Takeda M, Ito K, Takahashi J, Shimokawa H. Enhanced Rho-kinase activity in circulating neutrophils in patients with vasospastic angina -Possible usefulness for diagnosis and disease activity assessment-. Annual Scientific Meeting of the American Heart Association; 2010年11月13日～17日; Chicago, USA.

8) Shiroto T, Yasuda S, Tsuburaya R, Ito Y, Ishibashi-Ueda H, Ito K, Takahashi J, Shimokawa H. Rho-kinase pathway plays an important role in the pathogenesis of coronary hyperconstricting responses induced by drug-eluting stent. Annual Scientific Meeting of the American Heart Association; 2009年11月14日～18日; Orland, USA

〔図書〕（計1件）

1) 安田聡, 下川宏明. 冠攣縮性狭心症. 小室一成編. 循環器疾患のサイエンス. 東京: 南山堂; 2010: p. 98-104.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況（計0件）

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cardio.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 聡 (YASUDA SATOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 00431578

(2) 研究分担者

下川 宏明 (SHIMOKAWA HIROAKI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 00235681

(3) 連携研究者

()

研究者番号: