

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 4日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390357

研究課題名（和文）脂肪細胞由来因子をターゲットとした血管内膜肥厚に対する新しい治療戦略

研究課題名（英文）Adipocytokine is the new target of the strategy for the prevention of intimal hyperplasia

研究代表者

古森 公浩 (KOMORI KIMIHIRO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40225587

研究成果の概要（和文）：PPAR- γ リガンドにはインスリン抵抗性改善作用以外に、抗炎症・細胞増殖抑制、アディポサイトカイン分泌調節などを介して心血管保護作用を発揮し、循環器領域における新たな分子標的薬として注目されている PPAR- γ リガンドであるピオグリタゾン投与により静脈グラフトの内膜肥厚抑制効果を認め、細胞増殖の抑制とアポトーシスの亢進を伴っていた。ピオグリタゾンのような PPAR- γ アゴニストはバイパス術後の静脈グラフト閉塞を予防する治療法の標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Pioglitazone attenuates intimal hyperplasia of the vein graft after autologous bypass grafting by its ability to suppress cell proliferation and enhance apoptosis. Pioglitazone could represent a therapeutic target for the prevention of graft failure after bypass grafting.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般、血管外科学

キーワード：脂肪細胞由来因子、血管内膜肥厚、自家静脈グラフト

1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、血管内膜肥厚、いわゆる自家静脈グラフト内膜肥厚およびステント再狭窄と肥満、メタボリックシンドロームとの関連を明らかにし、さらにこれらの病態に伴うアディポサイトカイン産生異常をターゲットとした新たな血管治療戦略を開発することである。

本研究の背景：閉塞性動脈硬化症に対する血管内治療が普及してきているが、自家静脈グラフトを用いたバイパス術

も標準治療の一つである。問題点として自家静脈グラフトを用いた下腿へのバイパス手術では術後5年で約20～30%に晩期閉塞を認める点があり、静脈グラフトの内膜肥厚が原因の一つと考えられている。様々な治療が試みられているが、標準的治療法は確立していない。そのため、静脈グラフトの内膜肥厚を抑制する何らかの治療法の確立が望まれるところである。

ピオグリタゾンは Proximosome Proliferator - Activated Receptor- γ

(PPAR- γ)のリガンドで、臨床では2型糖尿病に対するインスリン抵抗性改善薬として用いられている(参考文献4)。近年、PPAR- γ リガンドにはインスリン抵抗性改善作用以外に、抗炎症・細胞増殖抑制、アディポサイトカイン分泌調節などを介して心血管保護作用を発揮し、循環器領域における新たな分子標的薬として注目されており、2型糖尿病患者における心血管イベント発生を低下させた。さらに注目すべき点として、ピオグリタゾン是非糖尿病患者において冠動脈ステント留置後の内膜肥厚を抑制することが報告されている。

これらの報告と一致して、基礎実験でもピオグリタゾンが動脈障害後の内膜肥厚を抑制させることが数々報告されている(参考文献8-12)。これらの結果を考慮すると、ピオグリタゾンにはインスリン抵抗性改善作用以外にも血管リモデリングに関連する修飾因子として作用する可能性が考えられる。

ピオグリタゾンによる静脈グラフト内膜肥厚抑制効果に関する報告はほとんどなく、今回、ウサギ静脈グラフトモデルを用いて、ピオグリタゾン投与による内膜肥厚抑制効果について検討した。

2. 研究の目的

ウサギ静脈グラフトモデルを用いて、ピオグリタゾン投与による内膜肥厚抑制効果について検討した。

3. 研究の方法

(1) 薬剤

実験には5' adenosine monophosphate - activated protein kinase (AMPK)、phosphorylated AMPK、phosphorylated extracellular signal - regulated kinase (ERK) は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif)から購入した。Total ERK 抗体は Cell Signaling (Beverly, Mass)より購入した。アディポネクチン抗体は総アディポネクチンを検出する抗体を R & D Systems (Minneapolis, Minn)より購入した。ピオグリタゾンは武田製薬より譲り受けた。

(2) 実験手順

すべての動物実験は名古屋大学大学院医学系研究科の動物実験倫理委員会の承認のもと、倫理規定に沿って行われた。日本白色種、オス、体重が2.5~3.0 kgのウサギを対照群とピオグリタゾン投与群に分け、ピオグリタゾン投与群には手術1週間前よりピオグリタゾン入りの餌を開始した。以前の報告と同様にピ

オグリタゾンの1日投与量は、3 mg/kgとなるようにした(参考文献13,14)。バイパス術を行い、静脈グラフトを採取するまでピオグリタゾンを混餌投与とした。対照群には通常の餌を投与した。

(3) バイパス手術

麻酔の導入はケタミン(50 mg/kg)とキシラジン(10 mg/kg)の筋注にて行い、麻酔維持はケタミン(10 mg/kg)とキシラジン(10 mg/kg)の静注にて行った。バイパス手術は右外頸静脈を約2.0 cm採取し、reverse graftとして右総頸動脈に8-0プロリンで端々吻合にてバイパスを行った(参考文献15,16,17)。右内頸動脈および右外頸動脈三分枝のうち二分枝を結紮し、血流を落とした状態で実験を行った。

(4) グラフト採取

バイパス手術時と同様の麻酔を行った後、静脈グラフトを周囲組織より剥離し摘出した。グラフトを採取した後、ウサギはペントバルビタール(50 mg/kg)の過量投与により安楽死させた。採取した静脈グラフトの内腔に4%ホルマリンを浸し30分間、100 mmHgの圧をかけて内腔を固定し、同液に一晩浸透させた。その後、パラフィン固定を行い、5 μ mの切片を作成した。

(5) 内膜肥厚の評価

採取した約2 cmの静脈グラフトを4分割し、それぞれをパラフィン固定したものを5 μ mの切片とした。脱パラフィン後、Hematoxylin and Eosin (HE)染色、Elastica van Gieson (EVG)染色を行った。内膜面積、中膜面積、全血管面積をMACSCOPEにて計測した。4個の切片の平均値を1つの静脈グラフトの内膜肥厚として統計学的に評価した。

(6) 免疫組織化学的評価

バイパス術後14日目に静脈グラフトを採取し、Ki-67染色、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuride-5' -triphosphate nick-end labeling (TUNEL)染色を行い、新生内膜の細胞増殖、アポトーシスについて評価した。採取した静脈グラフトを4分割し、それぞれをパラフィン固定したものを5 μ mの切片とした。脱パラフィン後、Ki-67染色、TUNEL染色を行った16,17。4分割した切片を、それぞれ400倍の倍率でランダムに8ヵ所、観察し、新生内膜のKi-67陽性細胞、TUNEL陽性細胞、全細胞数を計測した。Ki-67陽性細胞およびTUNEL陽性細胞を全細胞数で割ったものをKi-67 index、TUNEL indexとした。4分割した切片の平均値を1つの静脈グラフトのKi-67 index、TUNEL index

とした。

(7) ウェスタンブロット

バイパス術後 14 日目に静脈グラフトを採取し、ウェスタンブロットにて AMPK および ERK シグナルについて検討した。採取した静脈グラフトを phosphate buffered saline で洗浄し、3 mm の切片を作成し、すぐに液体窒素で凍結させた。凍結標本を ice-cold lysis buffer (20mM Tris-hydrochloride pH 8.0, 1% NP-40, 150mM NaCl, 0.5% deoxycholic acid, 1mM sodium orthovanadate, protease inhibitor) にてホモジナイズさせた。ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動でタンパクを分離した。1000 倍希釈した一次抗体で免疫ブロットし、続いて 5000 倍希釈した二次抗体で免疫ブロットを行った。バンドは化学発光検出キット (Amersham Pharmacia Biotech Piscataway, NJ) を用いて評価した。ウェスタンブロットは対照群、ピオグリタゾン投与群、偽手術群で評価を行った。剥離操作のみ行い、バイパス術を施行していない静脈を偽手術群として検討した。

(8) 血液検査

一晩絶食とし、バイパス術後 28 日目のグラフト採取前に血液を採取した。血糖、総コレステロール、中性脂肪、LDL コレステロール、HDL コレステロールを和光純薬工業株式会社のキットを用いて測定した。血中アディポネクチンは採取した血液を遠心分離にかけた後、nonreducing sample buffer に溶かし、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動でタンパクを分離し、評価した(参考文献 18)。

(9) 統計学的評価

統計は StatView 5.0 software (SAS Institute, Cary, NC) を用いて行った。データは平均値±標準誤差で表記した。一元配置分散分析、Scheffe 分析にて統計学的に評価を行い、 $P < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) 結果

①血液検査

ピオグリタゾン投与は血糖値、コレステロール、中性脂肪、LDL コレステロール、HDL コレステロール値に影響を与えなかった。

②静脈グラフト内膜肥厚の評価

術後 28 日目での内膜肥厚はピオグリタゾン投与群で $0.54 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ 、対照群で $0.93 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ とピオグリタゾン投与群で有意に抑制されていた ($P <$

0.01)。

③静脈グラフト新生内膜の細胞増殖、アポトーシスの評価

新生内膜での Ki-67 陽性細胞は対照群で $16.8 \pm 1.7 \%$ 、ピオグリタゾン投与群で $4.1 \pm 1.1 \%$ とピオグリタゾン投与群で有意に抑制されていた ($P < 0.05$)。TUNEL 陽性細胞はピオグリタゾン投与群で $3.5 \pm 0.5 \%$ 、対照群で $1.2 \pm 0.1 \%$ とピオグリタゾン投与群でアポトーシスは有意に亢進していた ($P < 0.05$)。

④血中アディポネクチンの評価

バイパス手術により血中アディポネクチン濃度に影響を与えなかった。ピオグリタゾン投与群において血中アディポネクチンが 1.8 倍上昇していた。

⑤静脈グラフトでの AMPK、ERK の発現の評価

静脈グラフトでの AMPK のリン酸化はバイパス術を行っていない静脈と比較して促進されていた。静脈グラフトで AMPK のリン酸化は促進されていたが、AMPK リン酸化の程度はピオグリタゾン投与群において有意に増加していた。ERK のリン酸化はバイパスを行っていない静脈と比較して静脈グラフトで増加していたが、ピオグリタゾン投与群において有意に抑制されていた。

(2) まとめ

ピオグリタゾン投与により静脈グラフトの内膜肥厚抑制効果を認め、細胞増殖の抑制とアポトーシスの亢進を伴っていた。ピオグリタゾンのような PPAR- γ アゴニストはバイパス術後の静脈グラフト閉塞を予防する治療法の標的とな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 43 件)

1. Morimae H, Maekawa T, Tamai H, Takahashi N, Ihara T, Hori A, Narita H, Banno H, Kobayashi M, Yamamoto K, Komori K
Cost disparity between open repair and endovascular aneurysm repair for abdominal aortic aneurysm: a single-institute experience in Japan Surg Today, 42: 121-126, 2012 査読有
2. Kodama A, Narita H, Kobayashi M, Yamamoto K, Komori K
Usefulness of POSSUM Physiological score for the Estimation of Morbidity

- and Mortality Risk after Elective Abdominal Aortic Aneurysm Repair in Japan Circulation J, 75, 550-556, 2011 査読有
3. Sugimoto M, Banno H, Idetsu A, Matsushita M, Ikezawa T, Komori K
Surgical experience of 13 infected infrarenal aortoiliac aneurysms: Preoperative control of septic condition determines early outcome Surgery, 149: 699-704, 2011 査読有
 4. Sato T, Tamai H, Kobayashi M, Yamamoto K, Komori K
Immunohistochemical properties in the patients with Buerger's disease- Possible role of Plasminogen Activator Inhibitor-1(PAI-1) for preservation of vessel wall architecture Cardiovascular Pathology, 20, 266-271, 2011 査読有
 5. Morisaki K, Shibata R, Takahashi N, Ouchi N, Maehara Y, Murohara T, Komori K
Pioglitazone prevents intimal hyperplasia in experimental rabbit vein graft. J Vasc Surg, 54 (6), 1753-58, 2011 査読有
 6. Horii A, Shibata R, Morisaki K, Murohara T, Komori K
Cilostazol Stimulates Revascularisation in Response to Ischaemia via an eNOS-Dependent Mechanism Eur J Vasc Endovasc Surg, 43, 62-65, 2011 査読有
 7. 古森公浩
喫煙によって閉塞性動脈疾患はどの程度悪化するのか
特集：禁煙対策と循環器疾患 Heart View Vol.16 No.1:53-57, 2011(メジカルビュー社) 査読無
 8. Banno H, Morimae H, Ihara T, Kobayashi M, Yamamoto K, Komori K
A late type III endoleak from fabric tears of a Zenith stent graft A mosaic pattern of intrasac hematoma might be a serious finding. Surgery Today, in press 2011 査読有
 9. Sugimoto M, Komori K
Mycotic aneurysm of the tibioperoneal trunk which precipitated acute compartment syndrome : Report of a Case. Surg Today, in press 2011 査読有
 10. Niimi K, Kobayashi M, Narita H, Yamamoto K, Komori K
Evaluation of the Efficacy of Venous Thromboembolism Prophylaxis Guideline Implementation in Japan Surg Today, 40: 1129-1136, 2010 査読有
 11. 古森公浩
腹部大動脈瘤手術
「手術」2月号特集 一般外科医必読 血管外科の基本手技 Vol.64 No.2:183-196, 2010 (金原出版株式会社) 査読無
 12. 古森公浩
末梢血管外科手術における再手術
「日本心臓血管外科学会雑誌」 Vol.39 No.2 : 54-59, 2010 (日本心臓血管外科学会) 査読無
 13. 古森公浩
末梢動脈再建術に愛用の手術器具・材料
「臨床外科」特集腹壁癒痕ヘルニア治療 Up Date Vol.65 No.7 : 929-933, 2010 (株式会社医学書院) 査読無
 14. Kodama A, Komori K, Hattori K, Yamanouchi D, Kajikuri J, Itoh T:
Sarpogrelate hydrochloride reduced intimal hyperplasia in experimental rabbit vein graft J Vasc Surg, 49, 1272-81, 2009 査読有
 15. Kodama A, Komori K, Kajikuri J, Itoh T:
Chronic treatment of hydroxytryptamine type 2a receptor antagonist sarpogrelate hydrochloride modulates the vasoreactivity of serotonin in experimental rabbit vein grafts J Vasc Surg, 50, 617-25, 2009 査読有
- [学会発表] (計 136 件)
1. 古森公浩
そけい靭帯以下の動脈病変に対する EVT の展望～TASC II B を控えて～
第 4 回九州 Joint Endovascular Therapeutics (The4th QJET) 2011 年 10 月 15 日、小倉記念病院 講堂 北九州市
 2. Komori K
Current status of the therapeutic

- strategy in the patients with peripheral arterial disease
第 43 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2011 年 7 月 16 日、ロンドン札幌
3. 玉井宏明、森崎浩一、宮地紘樹、前川卓史、高橋範子、渡辺芳雄、森前博文、井原努、堀昭彦、坂野比呂志、小林昌義、山本清人、古森公浩
Buerger 病罹患動脈壁における Notch シグナルの発現について
第 111 回日本外科学会定期学術集会
(会期 2011 年 5 月 26~28 日 要旨集)
 4. 森崎浩一、前川卓史、玉井宏明、高橋範子、渡辺芳雄、森前博文、井原努、堀昭彦、坂野比呂志、小林昌義、山本清人、古森公浩
ピオグリタゾンによる静脈グラフト内膜肥厚抑制効果の検討
第 111 回日本外科学会定期学術集会
(会期 2011 年 5 月 26~28 日 要旨集)
 5. 古森公浩
血管病治療の最前線 第 25 回 日本血管外科学会 近畿地方会
(2011 年 3 月 12 日 和歌山県立医科大学 高度医療人育成センター5F)
 6. 森崎浩一、前川卓史、玉井宏明、高橋範子、渡辺芳雄、森前博文、井原努、堀昭彦、坂野比呂志、小林昌義、山本清人、古森公浩
「遠隔成績を考慮した間歇性跛行肢の治療選択」当科での間歇性跛行肢に対する血行再建術の検討
第 41 回 日本心臓血管外科学会
2011 年 2 月 24 日、東京ベイ舞浜ホテル クラブリゾート
 7. Komori K
Endothelium, nitric oxide and vein grafts
Fourth Scientific Meeting Asian Society for Vascular Biology
(November 21, 2010) Cheung Kung Hai Conference Centre, Hong Kong, China
 8. Morisaki K, Shibata R, Banno H, Kobayashi M, Yamamoto K, Murohara T, Komori K
Pioglitazone Prevents Intimal Hyperplasia In Experimental Rabbit Vein Graft
American Heart Association Scientific Sessions 2010 (November 17, 2010) McCormick Place, Chicago, IL, USA
 9. 坂野比呂志、森崎浩一、玉井宏明、高橋範子、渡辺芳雄、森前博文、井原努、堀昭彦、小林昌義、山本清人、古森公浩
血管内膜肥厚とミッドカインの関連について
第 51 回 日本脈管学会総会 2010 年 10 月 14 -16 日、旭川グランドホテル 北海道
 10. Komori K
Current Status of Therapeutic Angiogenesis for the Patients with Peripheral Arterial Disease in Japan
The 11th Annual Congress of Asian Society for Vascular Surgery
The 4th Annual Meeting of World Federation of Vascular Societies
The 5th Asian Venous Forum
(June 30, 2010) The Westin Miyako, Kyoto
 11. Komori K
Differences in the Endothelial Function and Morphological Modulation between the Canine Autogenous Vein and Arterial Grafts Endothelium and Intimal Thickening
The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide
(June 16, 2010) Kyoto International Conference Center, Kyoto
 12. Hori A, Shibata R, Narita H, Kobayashi M, Yamamoto K, Komori K
Cilostazol Causes Angiogenesis Mediated through the Enhancement of Nitric Oxide Production in the Ischemic Hindlimb of Mouse
2010 Vascular Annual Meeting
(June 11, 2010) Hynes Convention Center, Boston, Massachusetts, USA
 13. 古森公浩
血管外科領域におけるトランスレーショナルリサーチ -Nitric Oxide とセロトニン- 第 38 回日本血管外科学会総会
2010 年 5 月 21 日、大宮ソニックシティ・パレスホテル大宮
 14. 井原努、森崎浩一、玉井宏明、前川卓史、高橋範子、森前博文、堀昭彦、成田裕司、小林昌義、山本清人、古森公浩
IFU (Instruction For Use) 外に施行した腹部大動脈瘤ステントグラフト内挿術の検討
第 38 回日本血管外科学会総会
2010 年 5 月 21 日、大宮ソニックシティ・パレスホテル大宮
 15. 古森公浩
教育講演「日常診療に役立つ脈管診療の実際」
「動脈・静脈疾患外科治療の現況」～血管内治療か?外科治療か?～
The 27rd Live Demonstration in KOKURA
2010 年 5 月 16 日、北九州

16. 森崎浩一、前川卓史、玉井宏明、高橋範子、森前博文、井原努、堀昭彦、成田裕司、小林昌義、山本清人、古森公浩
ヨーダアレルギー・腎機能障害症例に対する炭酸ガス血管造影の有用性
第110回日本外科学会定期学術集会
2010年4月9日、名古屋
17. Komori K
THERAPEUTIC ANGIOGENESIS FOR THE PATIENTS WITH PERIPHERAL ARTERIAL DISEASE
The 10th Annual Congress of Asian Society for Vascular Surgery
(October 16, 2009) BEXCO, Busan, Korea
18. Komori K
Differences in the Endothelial Function and Morphological Modulation between the Canine Autogenous Vein and Arterial Grafts - Endothelium and Intimal Thckening -
Satellite Symposium of the IUPS2009
(July 25, 2009) Nagoya City University Hospital Nagoya
19. Kodama A, Tamai H, Idetsu A, Morimae H, Hori A, Narita H, Kobayashi M, Yamamoto K, Kajikuri J, Itoh T, Komori K
SARPOGRELATE HYDROCHLORIDE MODULATES THE EXPRESSION OF 5-HYDROXYTRYPTAMINE TYPE 2A AND TYPE 1B RECEPTORS IN EXPERIMENTAL RABBIT VEIN GRAFTS
10th MOVD 2009, 10th International Symposium on Mechanisms of Vasodilatation
(June 3, 2009) Matsushima, Miyagi
20. Kodama A, Tamai H, Idetsu A, Morimae H, Hori A, Narita H, Kobayashi M, Yamamoto K, Komori K
Sarpogrelate Hydrochloride Modulates the Expression of 5-Hydroxytryptamine Type 2A and Type 1B Receptors in Experimental Rabbit Vein Grafts
Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Annual Conference 2009 (May 1, 2009) Washington
21. 古森公浩
卒業教育セミナー
末梢血管外科手術における再手術
第39回日本心臓血管外科学会学術総会
2009年4月21日、富山国際会議場
22. 出津明仁、玉井宏明、森前博文、児玉章朗、堀昭彦、成田裕司、小林昌義、山本清人、古森公浩
総腸骨動脈瘤を合併した腹部大動脈瘤に対するステントグラフト内挿術の治療戦略 第109回日本外科学会定期学術集会 2009年4月3日、福岡

〔図書〕(計32件)

1. 古森公浩
急性動脈閉塞症
医学書院, 今日の診療指針, 2011, 21-34
2. 古森公浩
末梢動脈瘤
文光堂, 今日の心臓手術の適応と至適時期, 2011, 322-324

〔その他〕

ホームページ

1. 名古屋大学医学部・大学院医学系研究科
血管外科学 (第一外科)
<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/1766/1778/kekkangekagaku>
2. 名古屋大学 血管外科
<http://www.vascsurg.j>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古森 公浩 (KOMORI KIMIHIRO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 40225587

(2) 研究分担者

室原 豊明 (MUROHARA TOYOAKI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 90299503

柴田 玲 (SHIBATA REI)
名古屋大学・大学院医学系研究科 特任講師
研究者番号: 70343689

山本 清人 (YAMAMOTO KIYOHITO)
名古屋大学医学部附属病院 講師
研究者番号: 10298359

小林 昌義 (KOBAYASHI MASAYOSHI)
名古屋大学医学部附属病院 助教
研究者番号: 60329381

(3) 連携研究者なし