

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 5月11日現在

機関番号：11301  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21591785  
 研究課題名（和文）心臓移植後冠動脈病変に対するプロテオグリカン「デコリン」による  
 遺伝子治療法の開発  
 研究課題名（英文）The development of novel therapy for cardiac allograft vasculopathy  
 after heart transplantation to modulate the proteoglycans formation  
 研究代表者  
 川本 俊輔（KAWAMOTO SHUNSUKE）  
 東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
 研究者番号：20400244

研究成果の概要（和文）：心臓移植後の慢性期の冠動脈病変の進行に、主要な細胞外マトリックスであるプロテオグリカンの冠動脈内膜での増加が深く関与していることに着目し、兔新生仔の肺動脈成熟モデルを用いて、硫酸プロタミンを投与し内因性のプロテオグリカンヘパラン硫酸の制御の可能性を検証した。将来的なプロテオグリカン制御のための遺伝子治療の開発のもととなる基礎的データを得ることができた。

研究成果の概要（英文）：Focusing on overproduced proteoglycans as major components of extracellular matrix in the cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation, vascular maturation process has been examined in newborn rabbits model to pursue possibility for proteoglycans modulation by administrating protamine sulfate to inhibit the effects of endogenous heparan sulfate proteoglycan.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：移植・再生、循環器・高血圧、細胞外マトリックス、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

重症心不全の最終治療の一つとして、脳死心臓移植が本邦においても、絶対数は少ないながら確実に拡がりつつある。移植後の長期予後を規定する因子のひとつとして、慢性拒絶反応による移植心の冠動脈硬化病変(CAV)が挙げられるが、多くの場合、病変がびまん

性でありカテーテルインターベンションや冠動脈バイパス手術などの冠血行再建術の適応とはならない。CAVの原因としては、ドナー特異的抗体、T細胞、NK細胞などが関わる液性免疫、細胞性免疫による複雑な拒絶反応が考えられ、その結果として脂質の沈着を伴うびまん性の内膜肥厚を特徴とする病変

が形成される。

しかし、最新の抗体療法を含む免疫抑制剤のプロトコールにおいてもこの慢性期のCAVは抑制できず、世界的にもドナー不足が大きな問題である以上、再移植も現実的ではない。我々もこれまでに、ラット心移植モデルにおいてACE阻害薬(Enalapril)やAngiotensin II受容体阻害薬(L-158809)により慢性期のCAVが有意に抑制されることを報告して来たが(Nakame., et al. *Eur Surg Res.* 2001)、完全に制御するには至っておらず、CAVに対する新たな予防法、治療法の開発が必要とされている。

動脈硬化や血管障害後の内膜肥厚においては血管平滑筋により合成分泌される細胞外マトリックスがその構成要素として注目されているが、CAVにおいても詳細な剖検例の病理学的検討から、脂質とともに主に2種類のプロテオグリカンが大量に血管壁に沈着していることが報告されている(Lin H., et al. *J Heart Lung Transplant.* 1996)。特に、小分子プロテオグリカンのひとつであるBiglycanはCAVの内膜肥厚層に多く沈着し、さらにVersicanは内膜層と中膜において血管平滑筋細胞周囲と泡沫細胞周囲に多く沈着し、この両者がびまん性の血管壁肥厚の主たる構成要素と考えられている。また、これらのプロテオグリカンを合成分泌する主体として血管平滑筋細胞が注目され、その増殖、遊走、合成を促進する主たるサイトカインとしてTGF- $\beta$ がCAVの病態に深く関与していることも報告されている(Dong C., et al. *J Heart Lung Transplant.* 2002)。

別の小分子プロテオグリカンであるDecorinは、コラーゲン分子の生合成を制御するとともに、TGF- $\beta$ の作用を抑制し、組織の線維化を抑制する作用が報告されている。また、ラットの頸動脈バルーン障害モデル

(PTCA再狭窄のモデル)において、Decorinを過剰発現させることによりVersicanの新生内膜への沈着が抑えられ、内膜肥厚が抑制されることも報告されている(Fischer JW., et al. *Circ Res.* 2000)。さらにCAVの病理標本での検討においては、Decorinは新生内膜や中膜層には存在せず、主に外膜に分布していた。これは前述の二つのプロテオグリカンと相反する分布であり、CAV新生内膜においてDecorinは抑制されている可能性が示唆された。

そこで、我々はDecorinを移植心冠動脈平滑筋細胞に発現させることで、TGF- $\beta$ の作用を抑制し、血管平滑筋細胞の活性化を抑え、過剰な細胞外マトリックスプロテオグリカンの合成及び沈着を制御し、最終的にCAVにおける内膜肥厚を抑制できるのではないかという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

心臓移植の長期成績の改善を最終目標に、同種移植後のびまん性冠動脈硬化病変(Cardiac Allograft Vasculopathy: 以下CAV)に対する細胞外マトリックスプロテオグリカンDecorinの内膜肥厚抑制効果を検討し、CAVの新しい予防治療法の開発を目指す。本研究では3年間の研究期間内に、ラット同種心移植モデルにおいてアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いて移植心の冠動脈平滑筋細胞にDecorin遺伝子を導入し、冠動脈壁に移植後長期間にわたりDecorinを過剰発現させ、TGF- $\beta$ の作用を抑制することで血管平滑筋細胞の活性化を抑えるとともに、冠動脈壁細胞外マトリックス構成の適正化を図ることで、慢性期における移植心冠動脈内膜肥厚を抑制できるかを検討する。

## 3. 研究の方法

当初計画では、ラット同種心臓移植モデルを用い、慢性拒絶モデルを作成し、移植心の拍動期間をグラフト生着期間として評価するとともに、移植後1ヶ月および3ヶ月での移植心の病理組織学的評価を行い、CAVの程度を検討し、冠動脈へのDecorinの遺伝子導入は、ドナーラットからグラフトを摘出する際にアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いて行う予定であった。

しかし、平成21年春から夏にかけての新型インフルエンザの世界的流行にともない研究用のウイルスベクターの輸入に時間がかかったこと、および平成23年3月の東日本大震災による実験室の停電により凍結保管していたウイルスベクターが溶解してしまい、使用不可能となってしまったことから、抜本的な研究計画の変更を余儀なくされた。

そこで、移植後冠動脈病変における血管内膜肥厚の主因である細胞外マトリックスの主体であるプロテオグリカンの制御を検証するために、血管新生に深く関わっているとされるヘパラン硫酸プロテオグリカンの阻害を目的として、ヘパリンの特異的阻害剤である硫酸プロタミンを投与し、その効果を検証することとした。

まず、生体内で硫酸プロタミンによる内因性ヘパラン硫酸プロテオグリカンの阻害作用を検証し、血管の発生に対する影響を検討した。生体において肺血管は、出生後数週間を経て血管の成熟が進行するが、その過程にヘパラン硫酸プロテオグリカンが深く関わっているとされ、その過程は移植後の冠動脈病変(弥漫性の内膜肥厚)と類似しているため、肺血管成熟がおこっている兔新生仔モデルを用い実験を行った。

#### 実験モデル

生後3日の新生仔家兔数匹とその母家兔

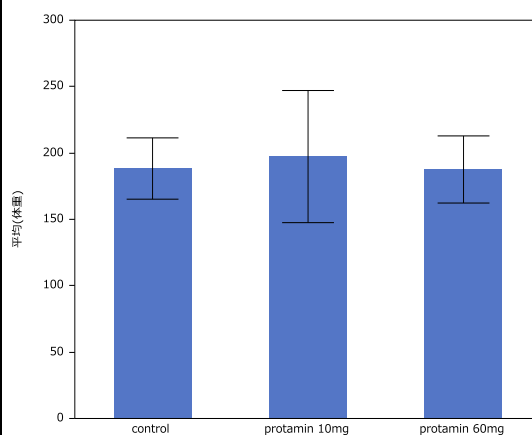
を同一の飼育籠で飼育し、新生仔に対して、朝晩の1日二回、2週間の期間、皮下にプロタミン(10、60 mg/kg)を連日注射した。コントロール群には、同量の生理食塩水を注射した。生後、15日目に、全身麻酔下に気管切開を行い、挿管、人工呼吸器下に置き、肺動脈圧、大動脈圧を測定したのちに犠牲死させ、肺を摘出した。右肺はホルマリン固定を行い、左肺は凍結固定とし、HE染色ならびに抗VEGF抗体染色にて病理学的検討及び免疫組織学的検討を行った。

15日目の体重を計測、病理学的検査にて肺血管/肺胞数比、肺動脈壁厚を計測し、免疫学的検査からリン酸化VEGFR、FGFをWestern blottingにて行った。

#### 4. 研究成果

新生仔家兔合計21匹(母家兔3匹)を用いて、プロタミン10mg群7匹、プロタミン60mg群7匹、対照群(生食投与群)7匹に分け実験を行った。

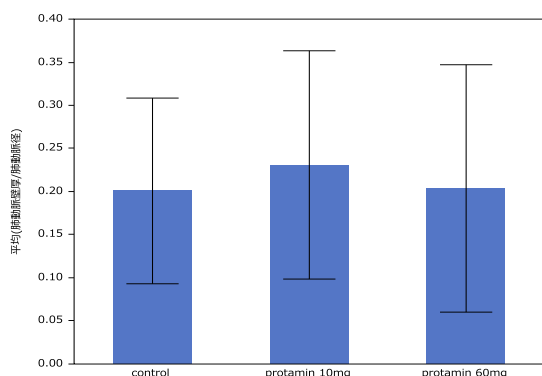
全例15日まで生存した。15日目の各群の平均体重は、プロタミン10mg群:  $197.3 \pm 49.8$  g、プロタミン60mg群:  $187.6 \pm 25.3$  g、対照群:  $188.3 \pm 23.1$  g であり、群間に有意な差はなく均等に成長した。



【15日目の各群の平均体重】

肺血管壁の主要細胞外マトリックスであるプ

ロテオグリカンの評価のため、15日目の肺動脈の壁の厚みを組織学的に評価した。肺動脈径で補正した値（平均肺動脈壁厚／肺動脈径）は、プロタミン10mg群：0.23±0.13、プロタミン60mg群：0.20±0.14、対照群：0.20±0.11であり、この解析では群間に有意な差を認めなかった。



【15日目の各群の平均肺動脈壁厚／肺動脈径】

抗リン酸化 VEGF-R 抗体による免疫組織学的検討では、肺動脈に一致して染色が見られ、肺動脈での VEGF レセプターのリン酸化（即ち活性化）が起こっていることが確認された。



【15日目の抗リン酸化 VEGF-R 抗体染色】

現在、抗リン酸化 VEGF-R 抗体を用いた Western blot にて VEGF レセプターの活性化

の程度を定量的に検証中である。

#### 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0件）

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

川本 俊輔 (KAWAMOTO SHUNSUKE)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20400244

##### (2) 研究分担者

田林 暁一 (TABAYASHI KOICHI)

東北大学・大学院医学系研究科・名誉教授

研究者番号：90142942

井口 篤志 (IGUCHI ATSUSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：90222851

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：