

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591873

研究課題名(和文) PPARs をターゲットとした血管内膜肥厚抑制

研究課題名(英文) The effect of PPARalpha agonist fibrate on the intimal hyperplasia of autologous jugular vein grafts

研究代表者

杉本 昌之 (SUGIMOTO, MASAYUKI)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：00447814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円

研究成果の概要(和文)：血管内膜肥厚による再狭窄は、遠隔成績向上の障害となっている。本研究では PPAR agonist である fibrate の内膜肥厚抑制効果を検討する。一方で、DPP-4 阻害薬の内膜肥厚抑制効果についても検討した。

【PPAR の agonist である fibrate の内膜肥厚抑制効果】ウサギモデルの作成、薬剤投与まで試みたが fibrate の内膜肥厚抑制効果までの結果は得られなかった。

【他の薬剤の内膜肥厚抑制効果】DPP-4 阻害薬(Vilda)は、GLP-1 依存性および非依存性の抗動脈硬化作用を有する。Vilda は GLP-1 濃度を上昇させ、血糖非依存的にウサギ自家静脈グラフトの内膜肥厚を抑制した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to examine the effect of drugs on intimal hyperplasia. We did not receive the effect of PPAR agonist fibrate, however, dipeptidyl peptidase 4 inhibitors, which are widely used in patients with type 2 diabetes mellitus, inhibit the intimal hyperplasia of autologous jugular vein grafts. The rabbits were randomly divided into vildagliptin (a potent dipeptidyl peptidase 4 inhibitor) group and control group. Results: Under fasting conditions, vildagliptin increased the plasma GLP-1 concentration, without affecting plasma glucose. Acetylcholine induced endothelium-dependent relaxation only in the vildagliptin group. Intimal hyperplasia was significantly less in the vildagliptin group than in the controls. Conclusions: Vildagliptin increased the plasma GLP-1 concentration. It also enhanced acetylcholine-induced $[Ca^{2+}]_i$ -independent endothelial nitric oxide release and reduced vein graft intimal hyperplasia, independently of any glycemic control action.

研究分野：血管外科学

キーワード：自家静脈グラフト 血管 内膜肥厚 PPARs

1. 研究開始当初の背景

閉塞性動脈硬化症 (ASO) 症例は、高齢化や食生活の欧米化により、増加の一途をたどっている。手術手技、治療用カテーテル、人工血管材質そして薬剤の進歩により、血管内治療 (経皮的血管形成・ステント留置術) や外科的バイパス手術の早期治療成績は、著しく向上しているものの、血管壁内膜肥厚に起因する術後の再狭窄は、遠隔成績向上の障害となっている。本研究は、血行再建術後に生じる血管内膜肥厚に対する有効な制御手法を開発することであり、長期的には臨床的に問題となる静脈グラフト晚期閉塞、血管内治療 (経皮的血管形成・ステント留置術) 後の再狭窄の予防・長期開存成績の向上へと寄与することを最終目標として設定している。

2. 研究の目的

(1) PPAR の agonist である fibrate の内膜肥厚抑制効果

我々は先に核内レセプターである peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR) のうち PPAR agonist の pioglitazone が、ウサギ静脈グラフトモデルにおいて内膜肥厚を有意に抑制することを示した。本研究では PPARs の中でも血管壁に強く発現する PPAR の agonist である fibrate の内膜肥厚抑制効果を各種動物モデルで比較する。同時に分子生物学的手法を用いて、内膜肥厚に関連する各種分子の血管壁での経時的活性・発現レベルへの効果の検証を行うことを目指す。

(2) 他の薬剤の内膜肥厚抑制効果

他のいくつかの薬剤の静脈グラフト内膜肥厚抑制効果を検討する。その中で、DPP-4 阻害薬は血糖低下作用だけでなく、GLP-1 依存性および非依存性の抗動脈硬化作用を有することが報告されている。しかしながら、DPP-4 阻害薬の静脈グラフトに対する内膜肥厚抑制効果は明らかにされていない。今回静脈グラフト内膜肥厚に対する DPP-4 阻害薬ビルダグリプチン (Vilda) の効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) ウサギを用い、薬物投与群と非投与群にわけ外頸静脈を総頸動脈に端々吻合した。術後 4 週間目の内膜肥厚を検討した。

(2) ウサギは Vilda 投与群 (V 群) と非投与群 (C 群) の 2 群に分けた。Vilda は飲水投与にて手術 1 週間前からグラフト採取まで投与した。外頸静脈を総頸動脈に端々吻合した。術後 2 週間目のグラフト標本のアポトーシス (TUNEL 染色) と細胞増殖 (Ki-67 染色) はパラフィン切片にて検討した。術後 4 週間目の内膜肥厚・免疫染色 (MMP-2, MMP-9, TIMP-2, Collagen) は凍結切片にて検討した。また、4 週間目のグラフト標本の中央部 (約 1 mm) をリング標本として使用し、アセチルコリンによる内皮依存性弛緩反応を検討した。またグラフト標本中央部

にて Fura2 を用い、アセチルコリンによる内皮での Ca²⁺ 上昇を測定した。術後 4 週間目で血液を採取し、血糖・HbA1c・脂質系・インシュリン・GLP-1 を測定した。

4. 研究成果

(1) PPAR の agonist である fibrate の内膜肥厚抑制効果

ウサギモデルの作成、薬剤投与まで試みたが PPAR の agonist である fibrate の内膜肥厚抑制効果までの結果は得られなかった。

(2) 他の薬剤の内膜肥厚抑制効果

他のいくつかの薬剤の静脈グラフト内膜肥厚抑制効果を検討した。その中で、DPP-4 阻害薬の効果について検討した。DPP-4 阻害薬は血糖低下作用だけでなく、GLP-1 依存性および非依存性の抗動脈硬化作用を有することが報告されている。しかしながら DPP-4 阻害薬の静脈グラフトに対する内膜肥厚抑制効果は明らかにされていない。今回静脈グラフト内膜肥厚に対する DPP-4 阻害薬 Vildagliptin の効果を検討した。

方法：日本白色種のオスのウサギを Vildagliptin 群と Control 群に分けた。Vildagliptin 群では飲水投与にてビルダグリプチンを手術 1 週間前からグラフト採取まで投与した。静脈グラフトの作成は右外頸静脈を約 2.0 cm 採取し、reversed graft にして右総頸動脈に端々吻合にてバイパスを行った。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、内膜肥厚が著明となる poor run off モデルにて実験を施行した。

採血はバイパス後 28 日目に行い、血糖・総コレステロール・中性脂肪・遊離脂肪酸は酵素法で測定し、HDL・LDL は直接法で測定した。インシュリン・GLP-1 は ELIZA キットで測定した。バイパス術後 14 日目の標本で Ki-67 染色・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。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の平均値を Ki-67 index・TUNEL index とした。バイパス術後 28 日目の標本では内膜肥厚の評価を行うとともに、Masson Trichrome 染色で内膜/中膜内のコラーゲン占有率を評価した。細胞外マトリックスを分解する MMP-2, MMP-9 と、MMP を阻害する内因性インヒビターである TIMP-2 を免疫染色にて比較した。

4 週間目のグラフト標本の中央部約 1 mm をリング標本として、Krebs 液を満たしたオーガンチャンパーにセットし収縮弛緩反応を検討した。アセチルコリン (ACh) による濃度依存性弛緩反応を検討するため、PGF2 で前収縮させた後、ACh を投与した。一部の標本では内皮を除去し実験を行った。また内皮由来の NO を検討するため、NO 合成酵素阻害薬である L-NNA 存在下でも同様に実験を行った。グラフトの血管内皮細胞の Ca の変化を確認するため、グラフト標本を Fura2-AM 入り Krebs 液に 4 時間インキュベートし、

F340/F380 比を平均値で測定した。
 結果：生化学検査では、血糖・HbA1C・インシュリンでは変化はなかったが、Vildagliptin 群で GLP-1 の上昇を認めた。脂質系では両群に有意差はなかった (Table 1)。

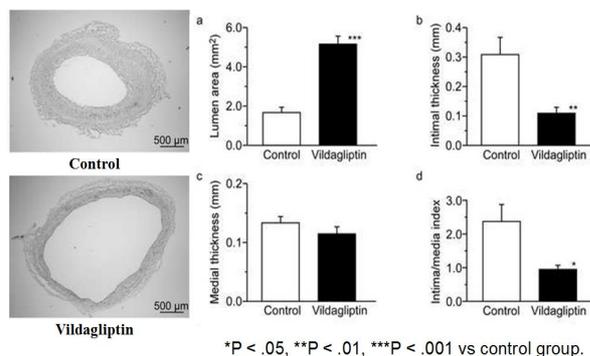
Table 1 : 生化学的検査

	Control group (n = 6)	Vildagliptin group (n = 5)
Body weight, kg	2.80 ± 0.05	2.75 ± 0.05
HbA1c, %	2.88 ± 0.08	2.68 ± 0.10
Glucose, mg/dL	135.8 ± 5.9	136.8 ± 3.6
Insulin, μU/mL	5.80 ± 1.20	6.96 ± 1.23
GLP-1, pmol/L	5.13 ± 0.57	7.31 ± 0.63*
Triglyceride, mg/dL	55.8 ± 14.4	53.4 ± 10.9
Free fatty acid, mEq/L	279.3 ± 27.3	243.8 ± 15.3
Cholesterol, mg/dL		
Total	38.5 ± 5.1	27.6 ± 5.4
HDL	21.3 ± 1.6	15.4 ± 2.9
LDL	11.7 ± 3.4	7.2 ± 1.8

*P < .05 vs Control group

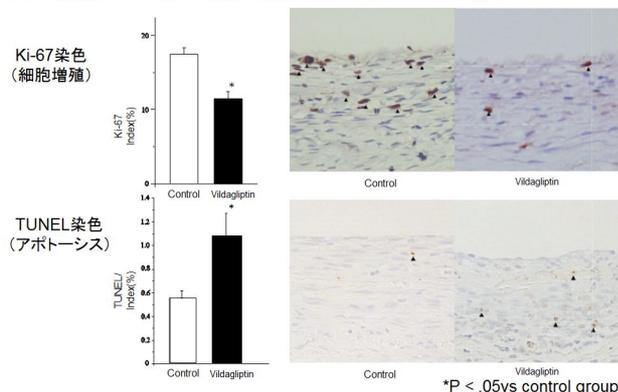
HE 染色では中膜の厚さに差はなかったが、内膜は Vildagliptin で薄く Vildagliptin 投与にて内膜肥厚をは有意に抑制されていた。また内腔も Vildagliptin 群は有意に拡張していた (図 1)。

図1: 静脈グラフトの形態変化におけるビルダグリプチンの効果 (術後28日目)



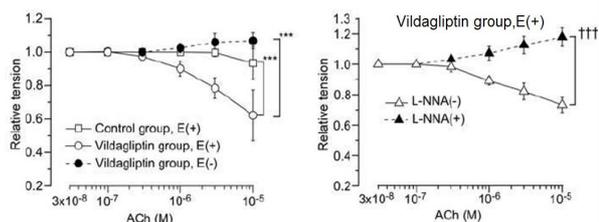
静脈グラフトの新生内膜の細胞増殖・アポトーシスについて、Ki67 染色では Vildagliptin 群が低く、TUNEL 染色では Vildagliptin 群が高値でした。新生内膜では Vildagliptin にて細胞増殖の抑制とアポトーシスの亢進が認められた (図 2)。

図2: 静脈グラフト新生内膜の細胞増殖・アポトーシスの評価



ACh による内皮依存性弛緩弛緩反応は、Control 群に比べ、Vildagliptin 群で有意に大きい内皮依存性の弛緩反応を認めた。Vildagliptin 群の内皮ありの標本では L-NNA 存在下では弛緩が抑制しており、弛緩反応は内皮由来の NO による弛緩反応と考えられた (図 3)。

図3: AChによる内皮依存性弛緩弛緩反応



グラフトの内皮細胞の Ca 濃度を測定すると、Base の Ca 濃度はかわらずまた弛緩反応を認めた ACh 3μM 投与下でも Ca の上昇は認めず Ca 非依存性の NO 産生が考えられた。マッソントリクローム染色では内膜・中膜でのコラーゲンの占有率は Vildagliptin 群で有意に低かった。免疫染色では TIMP-2、MMP では主に内皮細胞に散在性にみられたが、両群で有意な差はなかった。一方、MMP-2 は新生内膜で散在にみられ、Vildagliptin で少なく、蛍光免疫染色でも光度は Vildagliptin で低かった。

まとめ: Vildagliptin はウサギ自家静脈グラフトの新生内膜において平滑筋細胞の増殖活性を抑制しアポトーシスを促進することで、内膜肥厚を抑制した。またその機序として、内皮細胞での Ca²⁺非依存性の NO 産生増加によるものが示唆された。また Vildagliptin は MMP-2 を抑制し Collagen の発現を抑制することで、血管平滑筋の弛緩を促進させると考えられた。

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 8 件)

1. Koyama A, Komori K, Otsuka R, Kajikuri J, Itoh T:

Dipeptidyl-peptidase 4 inhibitor reduces intimal hyperplasia in rabbit autologous jugular vein graft under poor distal runoff.

J Vasc Surg. 査読有[in press],2015.
doi: 10.1016/j.jvs.2014.12.048.

2. Sugimoto M, Miyachi H, Morimae H, Kodama A, Narita H, Banno H, Yamamoto K, Komori K:

The fate of ischemic limbs in patients with Buerger's disease based on our 30-year experience: does smoking have a definitive impact on the late loss of limbs?

- Surg Today, 査読有 45(4):466-470, 2015
doi: 10.1007/s00595-014-0904-6.
3. Takahashi N, Shibata R, Ouchi N, Sugimoto M, Murohara T, Komori K:
Metformin stimulates ischemia-induced revascularization through an eNOS dependent pathway in the ischemic hindlimb mice model
Journal of Vascular Surgery 査読有 61(2):489-496, 2015
doi: 10.1016/j.jvs.2013.09.061.
 4. Kodama A, Sugimoto M, Kuma S, Okazaki J, Mii S, Komori K:
Clinical Outcomes After Infrainguinal Bypass Grafting for Critical Limb Ischemia in Patients with Dialysis-dependent End-stage Renal Failure.
European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 査読有 48:695-702, 2014
doi: 10.1016/j.ejvs.2014.08.022.
 5. Miyachi H, Mii S, Enomoto A, Murakumo Y, Kato T, Asai N, Komori K, Takahashi M:
Role of Girdin in intimal hyperplasia in vein grafts and efficacy of atelocollagen-mediated application of small interfering RNA for vein graft failure.
J Vasc Surg 査読有 60(2):479-489, 2014
doi: 10.1016/j.jvs.2013.06.080.
 6. Tamai H, Kobayashi M, Takeshita K, Kodama A, Banno H, Narita H, Yamamoto K, Komori K:
Possible involvement of Notch signaling in the pathogenesis of Buerger's disease.
Surg Today 査読有 44(2):307-13, 2014
doi: 10.1007/s00595-013-0566-9.
 7. Sugimoto M, Komori K:
Mycotic aneurysm of the tibioperoneal trunk which precipitated acute compartment syndrome: report of a case.
Surg Today 査読有 42(10):1001-4, 2012
doi: 10.1007/s00595-012-0175-z.
 8. Maekawa T, Komori K, Kajikuri J, Itoh T:
Characteristics of the actions by which 5-hydroxytryptamine affects electrical and mechanical activities in rabbit jugular vein graft.
British Journal of Pharmacology 査読有 166(4), 1419-32, 2012
doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01867.x.
- [学会発表](計 14 件)
1. Komori K
A novel therapeutic approach against intimal hyperplasia through suppression of girdin
The 15th Congress of Asian Society for Vascular Surgery, September 7, 2014
Hong Kong (China)
 2. 古森公浩, 田畑光紀, 徳永晴策, 小山明男, 宮地紘樹, 高橋範子, 森前博文, 杉本昌之, 児玉章朗, 成田裕司, 山本清人
重症虚血肢鼠径靱帯以下バイパス後救肢率および予後因子の検討
第 114 回日本外科学会定期学術総会
2014 年 4 月 3 日, 国立京都国際会(京都府京都市)
 3. 児玉章朗, 田畑光紀, 徳永晴策, 小山明男, 宮地紘樹, 高橋範子, 渡辺芳雄, 杉本昌之, 成田裕司, 山本清人, 古森公浩
重症虚血肢膝下病変に対する初回血行再建術の成績
第 44 回 日本心臓血管外科学会学術総会
2014 年 2 月 20 日, 鶴屋ホール(熊本県熊本市)
 4. Sugimoto M, Tabata M, Tokunaga S, Miyachi H, Takahashi N, Watanabe Y, Morimae H, Kodama A, Narita H, Yamamoto K, Komori K
Fate of Ischemic Limbs in Buerger's Disease:30-Year-Experience in a Single Centre
14th Congress of Asian Society for Vascular
October 28, 2013, Istanbul (Turkey)
 5. 児玉章朗, 徳永晴策, 田畑光紀, 小山明男, 宮地紘樹, 高橋範子, 渡辺芳雄, 森前博文, 杉本昌之, 成田裕司, 山本清人, 古森公浩
重症虚血肢鼠径靱帯以下バイパスの成績および予後因子の検討
第 54 回日本脈管学会総会 2013 年 10 月 11 日, ステーションコンファレンス東京(東京都千代田区)
 6. 古森公浩
末梢動脈疾患の診療
第 4 回脈管専門医教育セッション
第 54 回日本脈管学会総会 2013 年 10 月 10 日, ステーションコンファレンス東京(東京都千代田区)
 7. 児玉章朗, 徳永晴策, 初田葵, 小山明男, 宮地紘樹, 高橋範子, 渡辺芳雄, 杉本昌之, 井原努, 成田裕司, 山本清人, 古森公浩
重症虚血肢に対する血行再建の短期および中期成績
第 41 回日本血管外科学会学術総会 2013 年 5 月 30 日, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)
 8. 児玉章朗, 徳永晴策, 初田 葵, 小山明男, 宮地紘樹, 高橋範子, 渡辺芳雄, 杉本昌之,

井原 努、成田裕司、山本清人、古森公造
重症虚血肢に対する鼠径靭帯以下バイパスの成績
第113回日本外科学会定期学術総会 2013年4月11日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

9. 杉本昌之、初田 葵、徳永晴策、小山明男、宮地紘樹、高橋範子、渡辺芳雄、井原 努、児玉章朗、成田裕司、山本清人、古森公造
バイパス患者における重症虚血肢の遠隔期予後の検討
第113回日本外科学会定期学術総会 2013年4月11日～13日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

10. Miyachi H, Komori K
Atelocollagen-Delivered Small Interring RNA Targeting Girdin Attenuates Intimal Hyperplasia in Vein Grafts in vivo
American Heart Association Scientific Sessions 2012 November 4, Los Angeles Convention Center L.A.(USA)

11. Takahashi N, Komori K
Metformin Stimulates Ischemia-Induced Revascularization through an AMPK/eNOS-Dependent Pathway
American Heart Association Scientific Sessions 2012 November 7, Los Angeles Convention Center L.A.(USA)

12. 児玉章朗、徳永晴策、初田葵、小山明男、宮地紘樹、高橋範子、渡辺芳雄、杉本昌之、井原努、成田裕司、坂野比呂志、山本清人、古森公造
浅大腿動脈血管内治療患者中期成績に関する予後因子の検討
第53回日本脈管学会総会2012年10月11日、ステーションコンファレンス東京(東京都千代田区)

13. 児玉章朗、宮地紘樹、前川卓史、玉井宏明、高橋範子、渡辺芳雄、森前博文、藤田広峰、井原 努、成田裕司、坂野比呂志、小林昌義、山本清人、古森公造
間歇性跛行肢の大腿 - 膝窩動脈領域血行再建の成績 - 血管内治療とバイパス -
第42回日本心臓血管外科学会学術総会2012年4月18日、秋田キャッスルホテル(秋田県秋田市)

14. 古森公造
重症虚血肢に対する集学的治療
第112回日本外科学会定期学術総会2012年4月14日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

〔その他〕
ホームページ等

1. 名古屋大学医学部・大学院医学系研究科
血管外科

<http://www.vasc Surg.jp>

2. 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/6391/6429/kekangekagaku>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 昌之 (SUGIMOTO MASAYUKI)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号: 00447814

(2) 研究分担者

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

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

児玉 章朗 (KODAMA AKIO)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号: 10528748