

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791370

研究課題名(和文) 移植後動脈硬化進展におけるムスカリン受容体の役割

研究課題名(英文) Role of muscarinic acetylcholine receptor in the development of transplant arteriosclerosis

研究代表者

松本 祐直 (Matsumoto, Yuji)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：80397380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ムスカリン性アセチルコリン受容体(mAChR)の移植後動脈硬化進展への関与を検討した。まず初めに、マウス異所性心臓移植モデルを用いて、mAChRの移植心生着率への影響を調べた。結果、MHC完全不一致のドナー・レシピエントを用いた心移植後の心生着率には、mAChRの関与はないことが示唆された。また、同じドナー・レシピエントの組み合わせを用いて血管移植モデル作製し、移植後動脈硬化進展について調べたところ、mAChR欠損の影響は認められなかった。しかしながら、マイナー抗原の異なるドナー・レシピエントの組み合わせで検討したところ、mAChR欠損マウスにおいて有意な差が認められた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) in the development of transplant arteriosclerosis. Fully major histocompatibility complex-mismatched donor hearts were transplanted into mAChR-KO recipient mice. There were no differences in heart graft survival between the wild-type and mAChR-KO recipients. Using the same strain combination, orthotopic carotid artery allotransplantation was performed. There was no difference in the development of transplant arteriosclerosis between the groups. However, when a minor histocompatibility antigen-mismatched strain combination was used, the development of transplant arteriosclerosis was significantly reduced in the mAChR-KO recipients. These results suggest that mAChR may play an important role in the development of transplant arteriosclerosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：移植後動脈硬化 慢性拒絶 ムスカリン性ACh受容体

1. 研究開始当初の背景

移植された臓器において、リンパ球などを介したレシピエントの免疫反応（拒絶反応）によりドナーの血管内皮が傷害されると、様々なサイトカイン・ケモカインが産生される。慢性期においては、平滑筋様細胞が増殖・遊走することにより新生内膜を形成（移植後動脈硬化）し、血管閉塞による移植臓器の機能不全をきたすことが臨床での大きな問題となっており、移植患者の予後を制限する。神経伝達物質として広く知られているアセチルコリン (ACh) とムスカリン性 ACh 受容体 (muscarinic acetylcholine receptor, mAChR) は、リンパ球などにも存在し、刺激による ACh 産生促進や mAChR 発現増強が報告されている。以上のことから、mAChR の移植後動脈硬化進展への関与が予想された。

2. 研究の目的

本研究では、mAChR 欠損 (mAChR-KO) マウスを用いて心臓あるいは血管移植モデルを作製し、mAChR の移植後動脈硬化進展への役割を検討した。

3. 研究の方法

移植モデルの作製

実験動物には、レシピエントとして mAChR-KO マウス (C57BL/6、H-2b) あるいは野生型マウス (mAChR-WT、C57BL/6、H-2b) を用いた。ドナーには、レシピエントと MHC (major histocompatibility complex、主要組織適合遺伝子複合体) の異なる BALB/c マウス (H-2d) あるいは C3H/He (H-2k) を用いた。このドナーとレシピエントの組み合わせは MHC が完全に不一致であるため、非常に強い拒絶反応を引き起こす（移植心の生存期間は約 1 週間）。また、マイナー抗原 (minor histocompatibility antigen, mHA) の異なるドナーとして、129SvjX1 (129X1、H-2b) を用いた。ペントバルビタール麻酔下にて、心臓移植は異所性に（図 1）頸動脈移植は同所性に行った。Isograft（同系移植）には C57BL/6 マウス (H-2b) を用いた。

組織学的解析

経時的な組織学的変化を評価するために、移植から一定期間経過後に移植片の切片を作製した。ペントバルビタール麻酔下にて、レシピエントの左心室から生理食塩水、次いで 4% パラホルムアルデヒドで全身を灌流固定した後、移植片を摘出し凍結切片を作製した。切片をヘマトキシリン・エオジン染色し、血管横断面の組織像を（蛍光）顕微鏡および画像解析装置を用いて、中膜および新生内膜層の厚さを定量評価した。

統計解析

データは mean ± SD で表示した。統計解析には、unpaired student's t-test または one-way analysis of variance (ANOVA) を用い、p < 0.05

を統計学的に有意差ありと判定した。

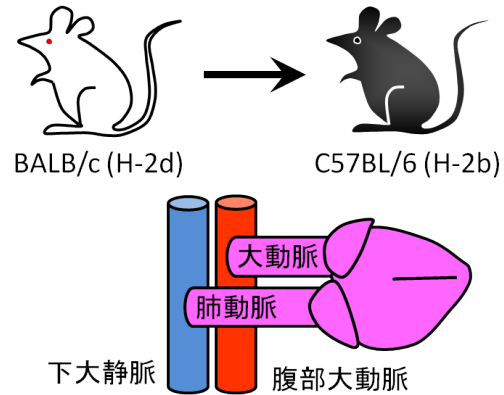


図1. マウス異所性心移植モデル. ドナーマウスから摘出した心臓の大動脈および肺動脈を、レシピエントマウスの腹部大動脈および下大静脈に連続縫合により吻合する。

4. 研究成果

心移植片の生着率を図 2 に示す。心移植はドナーに BALB/c マウス、レシピエントに野生型 C57BL/6 マウス (WT) あるいは mAChR-KO マウス (C57BL/6 系統) を用いて実施した。Isograft (Iso) は 3 例全てにおいて 56 日 (8 週間) 以上の生着が認められた。しかしながら、野生型レシピエントマウスと mAChR-KO マウス (レシピエント) の移植心生着率はおよそ 8 日と有意な変化は認められなかった。

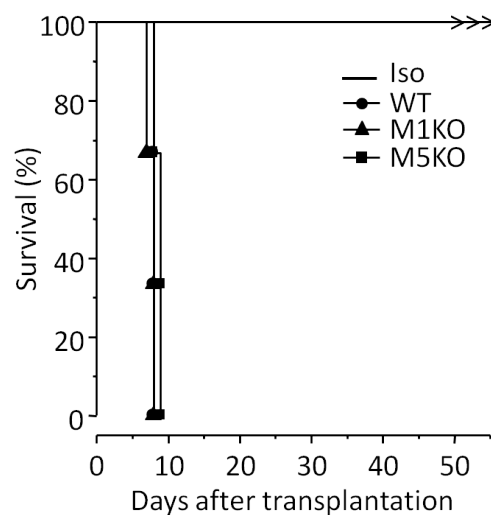


図2. 異所性心移植片の生着率. 心移植はドナーにBALB/cマウス、レシピエントに野生型C57BL/6マウスあるいはmAChR-KOマウス(C57BL/6系統)を用いて実施した。(>)は56日(8週間)以上生存した移植心を示す. 各群n=3.

次いで、ドナーを C3H/He マウス (H-2k) を変えて心移植を行い、生着率を比較した場合も、野生型レシピエントマウスと比べて、マウス (レシピエント) における移植心の生着率は変化しなかった (全群において移植心の生存期間は 8 日であった)。以上のことから、MHC 完全不一致のドナー・レシピエントを用いた心移植モデルでは、mAChR の関与はないことが示唆された。

次に血管移植モデルを用いて、移植後動脈硬化進展における mAChR の影響を調べた。頸動脈移植は、ドナーに C3H/He マウス、レシピエントに野生型 C57BL/6 マウスあるいは mAChR-KO マウス (C57BL/6 系統) を用いて実施した。頸動脈移植 8 週間後の移植後動脈硬化進展 (管腔閉塞率 [%] で表す) を図 3 に示す。野生型 (WT) マウスと比べて、mAChR-KO レシピエントマウスの管腔閉塞率に有意な変化は認められなかった。

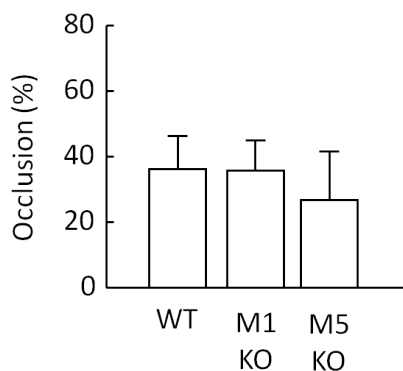


図3. 頸動脈移植8週間後の移植後動脈硬化. 頸動脈移植は同所性にドナーとしてC3H/Heマウス、レシピエントとして野生型マウスあるいはmAChR-KOマウスを用いて行った. 管腔の閉塞率は以下の式にて算出した: $\text{luminal occlusion (\%)} = \frac{\text{intimal area}}{(\text{lumen area} + \text{intimal area})} \times 100$. n = 9-10.

次いで、ドナーを 129SvjX1 (129X1, H-2b) マウスに変えて、頸動脈移植を実施した。頸動脈移植 8 週間後の移植後動脈硬化の典型画像を図 4 に示す。野生型 (WT) マウスの頸動脈移植片において、明らかな内膜肥厚 (移植後動脈硬化) がみとめられた。一方、mAChR-KO マウスの頸動脈移植片においては、ほとんど内膜肥厚は観察されなかった。

図 4 の画像を基に、頸動脈移植 8 週間後の移植後動脈硬化進展 (管腔閉塞率 [%]) を定量した結果を図 5 に示す。野生型 (WT) マウスと比べて、mAChR-KO レシピエントマウスの管腔閉塞率は、有意に減少した。

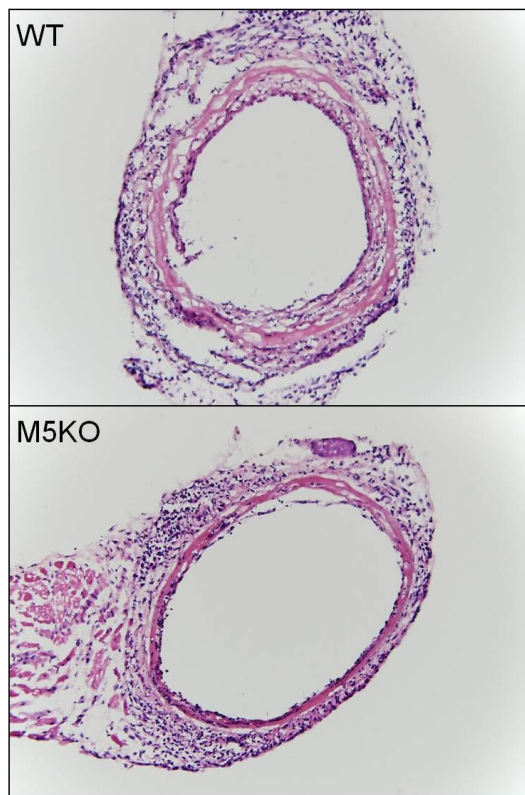


図4. 頸動脈移植8週間後の移植後動脈硬化の典型画像. 上パネルは野生型レシピエントマウス、下パネルは mAChR-KOレシピエントマウスより摘出した頸動脈移植片である. 頸動脈移植片はヘマトキシリン・エオジンにて染色した.

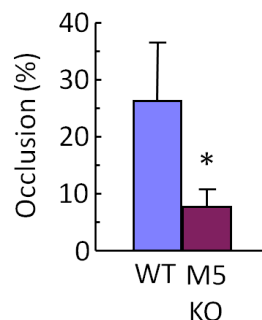


図5. 頸動脈移植8週間後の移植後動脈硬化. 頸動脈移植は同所性にドナーとして129X1マウス、レシピエントとして野生型マウスあるいはmAChR-KOマウスを用いて行った. 管腔の閉塞率は以下の式にて算出した: $\text{luminal occlusion (\%)} = \frac{\text{intimal area}}{(\text{lumen area} + \text{intimal area})} \times 100$. 各群n = 5, *p < 0.05 vs WT.

以上のことから、Minor histocompatibility antigen の異なるドナー・レシピエントの組み合わせにおいては、mAChR の関与が認められた。今後、メカニズムの詳細について検討

を進める予定である。

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)

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：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 祐直 (MATSUMOTO YUJI)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：80397380