

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460655

研究課題名(和文) 内皮由来膜過分極因子を標的とした血管内膜肥厚抑制のための探索研究

研究課題名(英文) Roles of endothelium-derived hyperpolarizing factor to reduce intimal hyperplasia

研究代表者

伊藤 猛雄 (ITO, Takeo)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：70159888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Poor distal runoff 兎自家静脈グラフトでは内膜が著しく肥厚し、内皮由来一酸化窒素(EDNO)および内皮由来膜過分極因子(EDHF)の機能が障害された。コレステロール吸収阻害薬エゼチミブとDPP-4阻害薬ビルダグリプチンはEDNOの機能を改善し、内膜肥厚を抑制した。しかしながら、これらの薬物は静脈グラフトのEDHFの機能障害を改善しなかった。兎自家頸動脈グラフトではEDNOの機能が亢進し、内膜肥厚はほとんど認められなかった。動脈グラフトで、EDHFの機能はわずかに抑制された。これらの結果は、自家グラフト血管での内膜肥厚抑制にEDNOが重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Significant intimal hyperplasia was formed with loss of functions of both endothelium-derived nitric oxide (EDNO) and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in rabbit autologous jugular vein graft under poor distal runoff. Ezetimibe (a selective cholesterol transport inhibitor) and vildagliptin (a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor) each in part recovered the function of EDNO (but not EDHF) and reduced intimal hyperplasia. In contrast, in rabbit autogenous carotid artery graft model, receptor-mediated, endothelium-dependent relaxation was enhanced by increased function of EDNO (but not of EDHF). The intimal thickening was minimal, suggesting that better patency of autogenous arterial graft is considered when compared with that of vein graft in aortocoronary revascularization. These results suggest that upregulation of the EDNO function could be beneficial in reducing intimal hyperplasia in both artery graft and vein graft.

研究分野：循環薬理学

 キーワード：内皮由来膜過分極因子 内膜肥厚 静脈グラフト 動脈グラフト 血管内皮機能障害 アセチルコリン
一酸化窒素 Ca活性化K⁺チャネル

1. 研究開始当初の背景

内皮細胞は一酸化窒素 (EDNO)、プロスタサイクリン (PGI₂) と内皮由来膜過分極因子 (EDHF) を生成・遊離することにより、血管のホメオスタシス維持のため多彩な機能を発揮している。しかしながら、これまで EDNO が強力な抗動脈硬化作用により内膜肥厚を抑制することは明らかにされてきたが、内膜肥厚に対する EDHF の役割は不明であった。自家動脈・静脈グラフトにおける内膜肥厚と EDHF の機能変化との関係、特に、内膜肥厚調節における EDHF の役割を明らかにし、その機能を回復させる薬物の探索は、自家動脈・静脈グラフト病態の新たな治療戦略を考えていく上で重要である。

高脂肪食や炭水化物の過剰摂取による動脈硬化に起因する閉塞性動脈硬化症の患者が増加している。これらの疾患に対する外科手術、経皮的冠動脈形成術の進展や薬剤の開発は、ステントを用いた血管内治療やバイパス術の早期治療成績を著しく向上させた。しかしながら、依然として、血管壁の内膜肥厚に起因する再狭窄は晩期グラフト血管の成績向上のための大きな障害となっている。このことより、血管内膜肥厚発生の要因を明らかにすることは、閉塞性動脈硬化症の治療法を確立するために重要な問題である。

血管、とりわけ、静脈の内皮由来弛緩因子の詳細な生理および病態生理的役割は未だ不明である。最近我々は、ウサギ外頸静脈 (静脈グラフトモデルで頻繁に使用されている血管) におけるアセチルコリン (ACh) による内皮依存性弛緩機序の詳細について検討 (Br J Pharmacol, 2011, 2012) し、(1) ACh は内皮細胞からの EDNO と EDHF の生成・遊離により血管を弛緩させる、また、(2) その弛緩強度は、これまでの想定と異なり、動脈と同程度に強力である、さらに、(3) 低濃度 ACh は内皮細胞の [Ca²⁺]_i を上昇させることなく (また、内皮細胞と平滑筋細胞の膜電位を変化させることなく) EDNO 依存性に血管を強力に弛緩させる、(4) 内皮細胞の NO 生成を阻害した条件下で、高濃度 ACh は内皮細胞 [Ca²⁺]_i 上昇によって活性化される Ca²⁺ 活性化 K⁺チャネル [小型コンダクタンスの Ca²⁺ 活性化 K⁺チャネル (KCa2.3, SKCa) と中間型コンダクタンスの Ca²⁺ 活性化 K⁺チャネル (KCa3.1, IKCa)] および電位依存性 K⁺チャネル (K_{Vi}) を介した膜過分極により、血管を弛緩させることなど、を明らかにした。これらの結果は、正常静脈での内皮細胞刺激が [Ca²⁺]_i-非依存性機序 ([Ca²⁺]_i を増加させることなく) により内皮細胞の NO 合成酵素 (eNOS) を活性化させ (eNOS の Ser1177 の

リン酸化に起因する機序を想定)、L-アルギニンを原料とした NO 生成亢進により弛緩を発生している可能性を示唆する。一方、内皮細胞での NO 生成が抑制された条件下 (実験的には NO 合成阻害薬投与下、また、病的状態では活性酸素増加による BH₄ 減少によって発生する eNOS uncoupling の状態) で、高濃度 ACh は内皮細胞の [Ca²⁺]_i を増加させ、KCa2.3, KCa3.1 および K_{Vi} の活性化を介して内皮細胞を過分極させる。この内皮細胞の過分極はギャップ結合を介して平滑筋細胞を過分極させ血管を弛緩させる (EDHF による血管弛緩)。これらの結果より、外頸静脈では EDNO が主要な弛緩因子として機能しているが、この EDNO の機能が減弱した病的条件下では、内皮細胞刺激によって増加した [Ca²⁺]_i が KCa2.3, KCa3.1 および K_{Vi} を活性化させ、2 次的なディフェンス機構として血管収縮発生を抑制している可能性が考えられた。しかしながら、これらの静脈特異的な内皮依存性弛緩因子の機能と、静脈グラフト内膜肥厚抑制との関係は明らかではない。

我々は、ヒトの閉塞性動脈硬化症に相関するウサギの異常血流モデル (外頸静脈を総頸動脈に移植し作成したウサギの自家静脈 poor-runoff グラフトモデル) を用い、以下のような知見を得ている (J Vasc Surg, 2009, 2012; Br J Pharmacol, 2012) : (1) 低いシェアストレス条件下で作成した静脈グラフト血管では、内膜が著明に肥厚し、(2) EDNO の産生が著しく低下するとともに、(3) 内皮依存性弛緩反応が著しく減弱する (J Vasc Surg, 2009, 2012)。一方、(4) 血小板凝集阻害薬であるセロトニン 2A (5-HT_{2A}) 受容体阻害薬サルボグレラートは、ACh によるグラフト血管での EDNO 依存性弛緩反応を部分的に回復させる (J Vasc Surg, 2009, 2012)。さらに、(5) eNOS 遺伝子の導入は内膜肥厚抑制効果をもたらす (Komori et al., J Vasc Surg, 1998; Surgery 2002)。このように、EDNO の機能低下はグラフト静脈の内膜肥厚と密接に関連していると考えられている。しかしながら、もうひとつの重要な内皮由来血管弛緩因子である EDHF の機能変化と内膜肥厚との関係は明らかでない。また、静脈グラフトに比較し、動脈グラフトの内皮機能は比較的保持されていると報告されているが、その機能保持と EDNO ならびに EDHF の機能変化との関係は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、動脈硬化に起因する内膜肥厚の成因を明らかにすることにより、閉塞性動脈硬化症の治療法を確立するための知見を提供することである。本研究では、(1)

自家静脈グラフトにおける内膜肥厚と EDHF の機能変化との関係、(2) コレステロール吸収阻害薬エゼチミブが、①グラフト血管の EDHF の機能を回復させるか否か、②もしそうだとすると、その機能の回復とエゼチミブによる内膜肥厚抑制作用との関連性、さらに、(3) インスリン分泌促進作用と血管機能改善効果をあわせもつ糖尿病治療薬である DPP-4 阻害薬 (GLP-1 分解酵素阻害薬) が、①静脈グラフトの内膜肥厚を抑制するか否か、②EDNO や EDHF の機能を改善するか否か、③内膜肥厚抑制とこれらの弛緩因子の機能改善との関連性、について明らかにする。さらに、これらの結果の統合的判断により、静脈グラフトの内膜肥厚抑制のための新たな治療戦略を検討することを目的とする。また、(4) 静脈グラフトに比較し、動脈グラフトにおける内皮機能が保持される機序と EDNO ならびに EDHF の機能変化との関連性についても明らかにする。

3. 研究の方法

ウサギ (日本白色種、雄、体重 2.5~3.0kg) を用いて自家静脈グラフトモデルを作成した。右外頸静脈を採取し右総頸動脈に端々吻合を行った。右内頸動脈と右外頸動脈 3 分枝のうち 2 分枝を結紮し、poor-runoff モデルを作成した (閉塞性動脈硬化症の臨床例に類似したモデル)。コントロール群と薬物投与群にランダムに分け、薬物は混餌投与とした。コントロール群には通常食を投与した。

また、自家動脈グラフトモデルは、麻酔下で右総頸動脈を採取し、ヘパリンを含有した無菌生理食塩水中で血液を除去した後、再び、摘出部位へ動脈をもどし、端々吻合した。

各種薬剤は手術 1 週間前より経口投与を開始した。手術後 2 週目の標本を作成し、Ki-67 染色、TUNEL 染色を行った。また、手術後 4 週目に標本を摘出し、以下の項目を検討した：(1) 凍結標本での内膜肥厚の測定、(2) 機械的及び電気的特性の変化の測定、(3) 内皮細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の測定、(4) ホモジナイズ標本を用いたウエスタンブロット法による KCa2.3, KCa3.1 と $K_{V1.1}$ の発現量変化の測定など。

実験方法のリスト

(1) In situ 条件下の内皮細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 測定

測定は蛍光倒立顕微鏡上にセットした摘出血管標本の内皮細胞に Fura 2 を負荷し、340 nm と 380 nm の紫外線で励起された 510 nm の蛍光を ratio metric に測定することにより行った (J Vasc Surg, 2012)。種々の濃度の ACh (受容体活性化による内

皮細胞 $[Ca^{2+}]_i$ 増加のため) と Ca^{2+} イオノフォア A23187 (受容体を介さない内皮細胞 $[Ca^{2+}]_i$ 増加のため) を投与し、内皮細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 濃度変化を測定した。

(2) 平滑筋細胞と内皮細胞の膜電位測定

内皮を温存した静脈グラフト血管で、微小電極を平滑筋細胞に刺入し、ACh と A23187 投与によって発生する膜電位変化を記録するとともに、これらの電位変化に対する KCa3.1 チャネル選択的阻害薬 TRAM 34 と KCa2.3 阻害薬 apamin の効果を検討した (平滑筋細胞における内皮依存性膜電位変化の測定)。必要があれば、微小電極を内皮細胞に刺入し、ACh と A23187 投与によって発生する膜電位変化を測定した (内皮細胞の電位変化の測定)。

(3) 内皮依存性弛緩反応の測定

EDHF による弛緩反応は、NO 合成酵素阻害薬であるニトロアルギニンとサイクロオキシゲナーゼ阻害薬であるジクロフェナック共存下でプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) により発生させた収縮中での ACh と A23187 による弛緩反応を測定することにより行った。EDHF の反応である確認は、この弛緩反応に対する charybdotoxin + apamin もしくは TRAM 34 + apamin の効果を検討することにより行った。 (Br J Pharmacol, 2012)。

(4) KCa2.3, KCa3.1 と $K_{V1.1}$ の発現量

KCa2.3, KCa3.1 と $K_{V1.1}$ の発現量はウエスタンブロット法と免疫組織学的方法にて検討した。

① グラフト血管平滑筋細胞における内皮依存性膜電位変化

グラフト血管での ACh と A23187 による内皮依存性の平滑筋細胞の膜電位変化を検討した。同様な検討を、エゼチミブやビルダグリブチンを慢性投与したウサギより得られた静脈グラフト血管を用いて行い、これらの薬物によるグラフト平滑筋細胞の内皮依存性膜電位変化を検討した。

② グラフト血管での内皮依存性弛緩反応

$PGF_{2\alpha}$ 収縮中の ACh と A23187 による弛緩反応を内皮温存および内皮除去標本で検討した。また、同様な検討を、エゼチミブやビルダグリブチンを慢性投与したウサギより得られたグラフト血管で行い、内皮依存性弛緩反応におけるこれらの薬物の効果を検討した。薬物により改善した内皮依存性弛緩反応における EDHF の機能変化に関する検討は、これらの弛緩反応に対する KCa チャネル阻害薬 (charybdotoxin + apamin や TRAM-34 + apamin) の効果を検討することにより実施した。

③ 組織学および生化学的検討

ウエスタンブロット法により上記蛋白質〔実験方法リスト(4)〕の発現量変化を検討した。また、エゼチミブまたはビルダグリプチン投与による内膜肥厚の変化、Ki-67 や TUNEL 染色の変化についても検討した。さらに、これらの薬物による血漿中の総コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロールの変化について検討した。

④ EDHF の機能変化と内膜肥厚

機能的研究〔①、②〕と組織学的・生化学的研究③にて得られた結果を統合的に検討し、エゼチミブやビルダグリプチンによる内膜肥厚抑制における EDHF の役割について検討した。

4. 研究成果

正常外頸静脈の内皮依存性弛緩反応と内皮依存性の平滑筋細胞過分極反応

正常ウサギの内皮温存外頸静脈において、内皮細胞アゴニストである ACh は濃度依存性に血管を弛緩させ、その反応は内皮除去により完全に消失した。NO 合成阻害薬ニトロアルギニン (L-NNA) は、内皮温存標本での ACh による弛緩反応を右へシフトさせるとともに、その最大弛緩反応を抑制した。L-NNA 存在下で、apamin (SKCa 阻害薬) + charybdotoxin (IKCa, BKCa および K_{V1} 阻害薬) は ACh による弛緩反応を完全に抑制した。

内皮を温存したウサギ正常外頸静脈の平滑筋細胞の膜電位は \sim -50 mV であり、ACh は濃度依存性に平滑筋細胞を過分極させた。内皮除去外頸静脈の平滑筋細胞の膜電位も \sim -50 mV であり、ACh はこの膜電位に影響を与えなかった。これらの結果より、ACh は内皮依存性に平滑筋細胞を過分極させることが明らかとなった。ACh による過分極反応は、L-NNA によって影響を受けなかったが、apamin+charybdotoxin でブロックされた。また、apamin 存在下で、TRAM 34 (選択的 IKCa 阻害薬) は ACh の過分極を部分的に抑制し、残余の過分極反応は margatoxin ($K_{V1.3}$ 阻害薬) でブロックされた。SKCa, IKCa および $K_{V1.3}$ チャンネルは内皮細胞に発現していた。これらの結果は、正常ウサギ外頸静脈において、ACh は内皮由来 NO と SKCa+IKCa+ $K_{V1.3}$ channels の活性化により血管を弛緩させることを示唆する。

Poor-runoff 静脈グラフトの内皮依存性弛緩反応と内皮依存性の平滑筋細胞過分極反応

内皮を温存した poor-runoff 静脈グラフト血管において、内皮細胞アゴニスト ACh は、内皮細胞の $[Ca^{2+}]_i$ および平滑筋細胞の膜電位に影響を与えなかった。一方、 Ca^{2+} -イオノフォア A23187 は内皮細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を上昇さ

せるとともに、平滑筋細胞を脱分極させた。この脱分極はニフルミックアシッド (Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャンネル阻害薬) によって抑制された。このことより、A23187 による平滑筋細胞の脱分極は、平滑筋細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇による Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャンネルの活性化によるものと考えられた。また、ニフルミックアシッド存在下でも、ACh や A23187 は平滑筋細胞を過分極させなかった。これらの結果より、静脈グラフト血管では平滑筋細胞と内皮細胞の間の電氣的カップリングが障害されている可能性が考えられた。

静脈グラフトの内膜肥厚と内皮機能障害に対するエゼチミブの効果

Poor-runoff ウサギ自家静脈グラフトで発生する内膜肥厚に対するコレステロール吸収阻害薬エゼチミブの効果を検討した。エゼチミブは、(1) $PGF_{2\alpha}$ 収縮中の ACh による内皮依存性弛緩反応を部分的に回復させるとともに、(2) ACh による内皮細胞 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を部分的に改善した。一方、(3) エゼチミブを投与したウサギから得たグラフト血管平滑筋細胞において、ACh は平滑筋細胞の膜電位に影響を与えなかった (エゼチミブは EDHF の機能障害を改善しない)。(4) 組織学および生化学的検討において、エゼチミブは内膜肥厚を抑制した。また、エゼチミブは Ki-67 index の発現量を抑制 (細胞壁細胞の増殖の抑制) するとともに TUNEL index を増加 (細胞壁細胞のアポトーシスの促進) した。さらに、(5) エゼチミブは血漿中の総コレステロールと LDL コレステロールを減少した。これらの結果より、エゼチミブは、LDL コレステロール低下作用により、静脈グラフト血管内皮細胞のアゴニストによる $[Ca^{2+}]_i$ 増加機構を回復させ、その結果として内皮細胞での NO 生成を増加 \Rightarrow EDNO の機能を亢進させ、内膜肥厚を抑制する可能性が考えられた。

静脈グラフトの内膜肥厚と内皮機能障害に対するビルダグリプチンの投与効果

Poor-runoff 自家静脈グラフト血管における内膜肥厚と内皮由来弛緩因子の機能変化に対する DPP-4 阻害薬ビルダグリプチンの効果を検討した。ビルダグリプチンは、血漿中の GLP-1 濃度を増加させたが、血糖値に影響を与えなかった。ビルダグリプチンは、グラフト血管の管腔を拡大させ、内膜肥厚を抑制した。さらに、ビルダグリプチンは静脈グラフト血管での ACh による EDNO 依存性弛緩反応を発現させた。しかし、ビルダグリプチンは静脈グラフト血管内皮細胞の ACh による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応を回復させなかった。また、ビルダグリプチン投与動物から得た静脈グラフト血管において、ACh は平滑筋細胞の膜

電位を変化させなかった。これらの結果より、DPP-4 阻害薬ビルダグリプチンの慢性投与は、アゴニストによる EDNO の遊離・放出機能を改善させるが、一方、EDHF の機能障害に有意な改善効果をもたらさない可能性が明らかとなった。

動脈グラフトの内膜肥厚と内皮機能変化

外科手術によって発生する自家動脈グラフト血管における内膜肥厚と EDNO および EDHF の機能変化について、ウサギ動物モデルを作成し(実験方法参照)検討した。動脈グラフト血管では、コントロール血管(正常総頸動脈血管)と比較し、ACh による内皮依存性弛緩反応が有意に増大し、血管吻合によって発生する内膜肥厚は僅かであった。動脈グラフト血管におけるサイクロオキシゲナーゼ阻害薬ジクロフェナック存在下での ACh による内皮依存性弛緩反応は、コントロール血管と比較し、EDNO-依存性弛緩反応が増加し、逆に、EDHF-依存性弛緩反応は減少した。後者の反応の変化の詳細は、(1)動脈グラフト血管内皮細胞での ACh による内皮細胞 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応が減少するとともに、(2)平滑筋細胞の内皮依存性過分極反応が減少した。一方、コントロール血管と比較して、(3) Ca^{2+} イオノフォアである A23187 による内皮細胞 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と平滑筋細胞の内皮依存性過分極反応に有意な変化は認められなかった。以上の結果より、動脈グラフト血管での EDHF の機能障害は、アゴニストによる内皮細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 増加機序の障害に起因した内皮細胞-平滑筋細胞間の電気的カップリングの異常によるものと考えられた。このことより、動脈グラフト血管では、内皮細胞での $[Ca^{2+}]_i$ -非依存性 NO 生成の増加により、EDHF の機能障害をカバーするとともに自家動脈グラフトの内膜肥厚を最小化している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Tabata K, Komori K, Otsuka R, Kajikuri J, Itoh T. Enhancement of Nitric Oxide Production Is Responsible for Minimal Intimal Hyperplasia of Autogenous Rabbit Arterial Grafts. *Circ J*, 査読有. In press.
DOI: 10.1253/circj.CJ-17-0034.
- ② 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*, 63(5), 2016, 1360-70, 査読有.
DOI: 10.1016/j.jvs.2014.12.048.

[学会発表] (計6件)

- ① ウサギ正常頸動脈と自家動脈グラフトの内皮依存性弛緩反応——酸化窒素(NO)と内皮由来過分極因子(EDHF)に注目して——田畑光紀、秋田直宏、藤井孝之、山本規夫、徳永晴策、小山明男、前川卓史、児玉章朗、成田裕司、坂野比呂志、伊藤猛雄、古森公浩. 第116回日本外科学会定期学術集会、大阪国際会議場(大阪府大阪市)、2016年4月14日~16日.
- ② ウサギ自家動脈グラフトと静脈グラフトの内皮機能変化. 梶栗潤子、田端光紀、大塚亮、柴山靖、古森公浩、伊藤猛雄. 第89回日本薬理学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、2016年3月9日~11日.
- ③ 静脈グラフトに対するビルダグリプチンの効果. 小山明男、徳永晴策、田畑光紀、前川卓史、児玉章朗、坂野比呂志、成田裕司、山本清人、伊藤猛雄、古森公浩. 第115回日本外科学会定期学術集会、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)、2015年4月16日~18日.
- ④ ウサギ静脈グラフト血管の内皮依存性弛緩反応に対するビルダグリプチンの作用. 梶栗潤子、小山明男、大塚亮、古森公浩、伊藤猛雄. 第88回日本薬理学会年会、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)、2015年3月18日~20日.
- ⑤ 静脈グラフトと内皮機能. 伊藤猛雄、梶栗潤子、古森公浩. 第88回日本薬理学会年会、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)、2015年3月18日~20日.
- ⑥ DPP-4 阻害薬ビルダグリプチンはウサギ静脈グラフトの内皮機能を改善する. 伊藤猛雄、小山明男、梶栗潤子、大塚亮、古森公浩. 第44回日本心臓血管作動物質学会、高松センタービル(香川県高松市)、2015年2月6日~7日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 猛雄 (ITO, Takeo)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号: 70159888

(2) 研究分担者

梶栗 潤子 (KAJIKURI, Junko)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号: 10444986

(3) 研究協力者

大塚 亮 (OTSUKA, Ryo)