

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：13802
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2009～2010
課題番号：21791247
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

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以下の結果を得た。ボイデンチャンバー法にてカルバコール（コリン作動薬）刺激による細胞遊走を比較検討したところ、野生型マウスの細胞に比して、mAChR 欠損マウスの細胞において、有意な遊走の減少が認められた。以上の結果より、mAChR 欠損マウスにおいて、移植後動脈硬化進展が抑制される可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) in the development of transplant arteriosclerosis. Mononuclear leukocytes were isolated from bone-marrow of mAChR deficient mice and wild-type (WT) mice. Cell migration was examined using a Boyden chamber system. Carbachol-induced leukocyte migration was significantly reduced in the cells harvested from mAChR-deficient mice. These results suggest that mAChR-mediated leukocyte migration may play an important role in the development of transplant arteriosclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,600,000	480,000	2,080,000
22年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

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、炎症細胞、遊走

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 (KO) マウスを用いて 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

野生型 (WT) マウスまたは M1、M5 mAChR 欠損マウスの骨髄 (大腿骨・脛骨・上腕骨) より Lympholyte (Cedarlane[®]) を用いて単核白血球のみを分離採取した。DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 液にて培養 (37°C、5% CO₂) し実験を行った。

細胞の遊走はボイデンチャンバー (Neuroprobe[®]) 法にて評価した。アゴニストとしてカルバコール (コリン作動薬) を用い、各濃度で 2 時間刺激した。その後ギムザ染色を行い、各ウェルあたりの遊走した細胞をランダムに 5 つのフィールドにてカウントし平均値を $n = 1$ とした。両群ともに無刺激 (コントロール) 群を 1 としたときの相対値で比較検討した。

データは、 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 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。

4. 研究成果

カルバコール刺激後の遊走した細胞 (紫色) の典型的な画像を図 1 および図 2 に示す。カルバコール刺激により WT 群 (図 1B) では多くの細胞の遊走が確認されたが、M1KO 群では遊走細胞の数が減少した (図 2B)。また、無刺激 (コントロール) の場合、WT、M1KO 両群共に細胞の遊走はほとんど起こらなかった (図 1A, 図 2A)。

上記結果を基に遊走した細胞数を計測したところ、WT 群、M1KO 群ともに 10^{-5}M 以上の濃度で無刺激 (コントロール) 群に比して有意な遊走亢進が認められた (図 3)。しかしながら、M1KO 群においては、 10^{-6}M および 10^{-5}M で WT 群に比して有意に遊走が減少した (図 3)。

WT 群と M5KO 群の遊走細胞画像を図 4 および図 5 に示す。カルバコール刺激により WT 群 (図 4B) では多くの細胞の遊走が確認されたが、M5KO 群では遊走細胞数が減少した (図 5B)。また、無刺激 (コントロール) の場合、WT、M5KO 両群共に細胞の遊走はほとんど起こらなかった (図 4A, 5A)。

また、上記結果を基に細胞数を計測したところ、WT 群では 10^{-5}M 以上の濃度で、M5KO 群では 10^{-4}M において無刺激 (コントロール) 群に比して有意な遊走亢進が認められた (図

A. WT, control



B. WT, 10 μM Carbachol

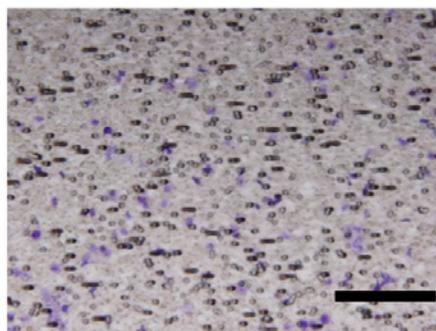
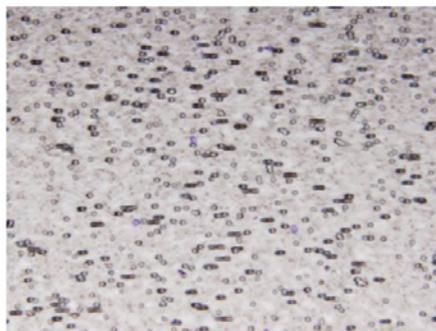


図1. カルバコール刺激後の細胞遊走画像. Scale bar = 50 μm for all images

A. M1KO, control



B. M1KO, 10 μM Carbachol

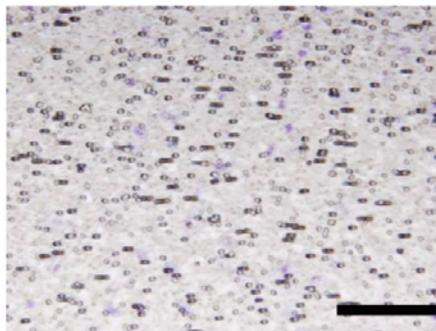


図2. カルバコール刺激後の細胞遊走画像. Scale bar = 50 μm for all images

6)。しかしながら、M5KO群においては、 10^{-5} MでWT群に比して有意に遊走が減少した(図6)。

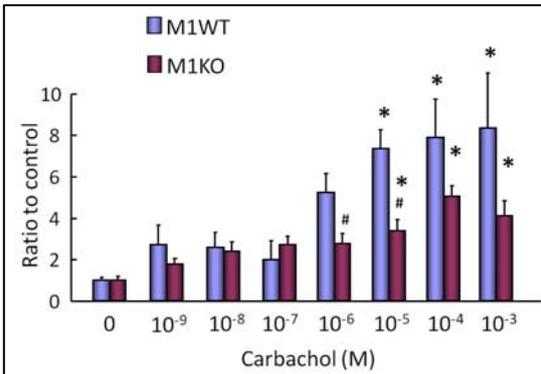
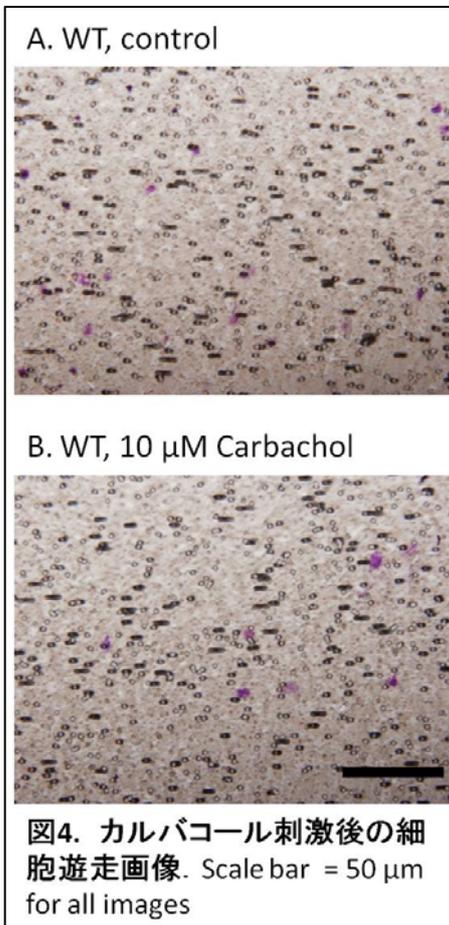


図3. カルバコール刺激後の遊走細胞数の比較 (WT vs M1KO). n = 6 per group. mean ± SEM.



単球やリンパ球の遊走は免疫・炎症反応に大きく関与することから、M1KO または M5KO マウスを用いた移植モデルにおいて移植後動脈硬化進展が抑制される可能性が示唆された。今後、心臓・血管移植モデルを用いて in vivo における mAChR の役割を検討する予定である。

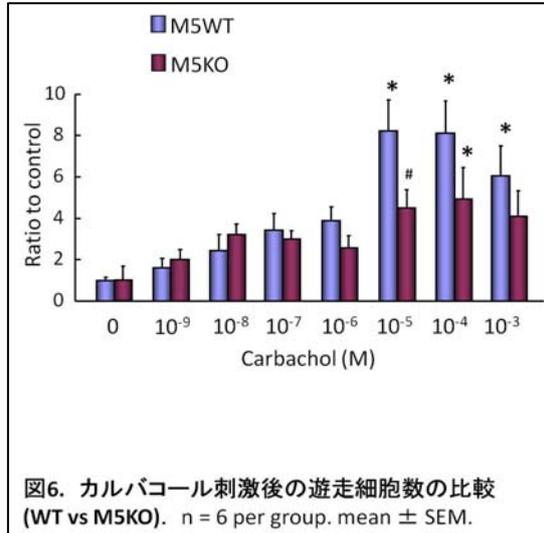
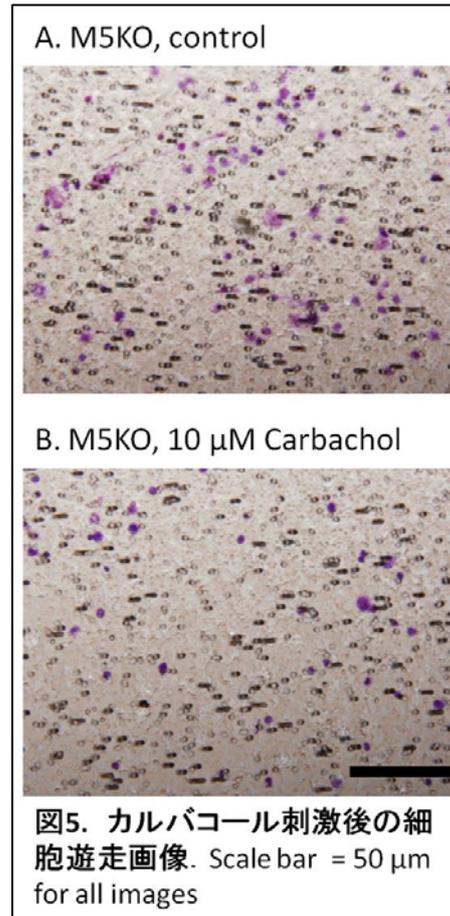


図6. カルバコール刺激後の遊走細胞数の比較 (WT vs M5KO). n = 6 per group. mean ± SEM.

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)

[学会発表] (計2件)

Kosuke Harada, Yuji Matsumoto, Kazuo Umemura. Muscarinic acetylcholine receptor-mediated leukocyte migration. 第84回日本薬理学会年会. 2011年3月22~24日.

パシフィコ横浜.

Kosuke Harada, Yuji Matsumoto, Kazuo
Umemura. M1 and M5 muscarinic acetylcholine
receptor-mediated leukocyte migration. 第85回
日本薬理学会年会. 2012年3月14~16日

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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者