

令和 4 年 5 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K10795

研究課題名(和文) EDHFによる内膜肥厚の制御に関する探索研究

研究課題名(英文) Exploratory research for regulatory mechanism underlying vascular neointimal hyperplasia by EDHF

研究代表者

伊藤 猛雄 (Itoh, Takeo)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：70159888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：冠動脈バイパス術において、静脈グラフトと比較して動脈グラフトは良好な開存率を示すが、その詳細なメカニズムは不明である。

本研究では、異常低血流条件下での動脈グラフトのリモデリングに対する外科手術の影響を検討するための新規ウサギ総頸動脈グラフトモデルを開発し、動脈グラフトの内皮由来血管弛緩因子(EDNO)および内皮由来過分極因子(EDHF)の機能変化と内膜肥厚の関係を検討した。結論として、異常低血流下の動脈グラフトは、異常低血流下の静脈グラフトとは異なり、EDNOとEDHFの両因子の機能を保持することにより内膜肥厚を最小に調節している可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

冠動脈、脳動脈や末梢動脈の虚血性疾患において、血流改善のため採取された動脈や静脈を使用したバイパス術がしばしば施行される。この手術では、術後の内膜肥厚による血管閉塞が問題となる。血管内皮細胞はシェアストレス刺激などにより、内皮由来血管弛緩因子(EDNO)や内皮由来過分極因子(EDHF)などの血管弛緩因子を合成・遊離することにより血管の内膜肥厚や狭小化を抑制する。本研究は、低血流環境下において、静脈グラフトに比較して動脈グラフトがより多くのEDNOとEDHFを合成・遊離することにより内膜肥厚を抑制している可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In terms of use for coronary artery bypass, the patency of artery grafts (such as internal mammary and radial artery grafts) is superior to that of a saphenous vein graft. However, the mechanism underlying this superiority in patency remains to be clarified.

We developed a rabbit model of common carotid artery grafts under poor runoff conditions to examine the effects of surgical operation on the function of endothelium-derived nitric oxide (EDNO) and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in relaxation and vascular remodeling. In such grafts, receptor-activated endothelium-dependent relaxation remained more than 50% and no apparent intimal hyperplasia was present. In contrast with those of rabbit vein grafts in which the functions of EDNO and EDHF are completely lost and display severe intimal hyperplasia. It is suggested that the preserved function of EDNO and EDHF in arterial grafts could be responsible for minimizing intimal hyperplasia in the vascular wall.

研究分野：血管内皮機能、リハビリテーション医学

キーワード：内皮依存性膜過分極因子(EDHF) 動脈グラフト 異常低血流 内膜肥厚 血管内皮機能 内皮由来弛緩因子(EDNO) 一酸化窒素(nitric oxide, NO) Ca²⁺活性化K⁺チャネル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

冠動脈バイパス術において、動脈グラフトは静脈グラフトより良好な開存率を示す。しかしながら、その相違をもたらす詳細なメカニズムは不明である。血管内皮細胞は、シエアストレスやアゴニスト刺激により内皮由来血管弛緩因子 (EDNO, 一酸化窒素、NO) と内皮由来過分極因子 (EDHF) を生成・遊離し、内膜肥厚を抑制する。EDHF の本体として、内皮細胞刺激によって発生する内皮細胞の過分極が myoendothelial gap-junction の電氣的カップリングを介して平滑筋細胞を過分極させる機序が考えられている。

これまで我々は、異常低血流下のウサギ静脈グラフトでは、EDNO と EDHF の機能がほぼ完全に消失し、顕著な内膜肥厚が発生することを報告している (Itoh et al., 2012)。最近我々は、外科手術に起因する内皮依存性弛緩因子の機能変化の観察を可能とする新規ウサギ総頸動脈グラフトモデルを考案し報告した (Tabata K et al., 2017)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規ウサギ総頸動脈グラフトモデルを用い、低血流条件下での血管のリモデリングにおける EDNO および EDHF の機能変化と内膜肥厚の関係を検討することである。

3. 研究の方法

雄の日本白色種ウサギ (2.5-3.0kg) を使用した。全身麻酔下で頸部を切開し、2.5cm の長さの右総頸動脈を摘出した。内腔をヘパリン化生理食塩水で洗浄後、元の部位に戻し、端々吻合を行うことにより正常血流の非結紮総頸動脈グラフト (nonoccluded graft) モデルを作成した。また、低血流総頸動脈グラフト (poor runoff graft) モデルは、非結紮総頸動脈グラフトモデルの外頸動脈の末梢の1分枝のみを温存し他の分枝を結紮することにより作成した。

術後 28 日目に、両モデルのグラフト血流量、平均血圧および脈拍を測定した。摘出グラフトの血管壁の厚さおよび血管内腔径は Elastica van Gieson 染色により測定した。グラフトの内皮機能は、NO 合成阻害薬であるニトロアルギニン (N-nitro-L-arginine, L-NNA) の非存在および存在下におけるアセチルコリン (ACh) による内皮依存性弛緩反応により評価した。EDHF の機能は、内皮細胞の受容体刺激剤 (アゴニスト) である ACh と Substance-P、および非受容体刺激剤である Ca^{2+} -イオノフォア A23187 による内皮依存性の平滑筋細胞の過分極反応により評価した。

4. 研究成果

(1) 実験結果

nonoccluded graft モデルウサギと poor runoff graft モデルウサギの平均血圧は、それぞれ 74.6 ± 5.1 mmHg と 76.8 ± 11.7 mmHg ($n=5$, $P=0.710$) であった。また脈拍は、それぞれ 130 ± 14 bpm と 148 ± 39 bpm ($n=5$, $P=0.355$) であった。

Nonoccluded graft と poor runoff graft の血流は、それぞれ 24.2 ± 3.0 mL/min と 2.8 ± 1.8 mL/min であり、poor runoff graft の血流は有意に小さかった ($n=5$, $P<0.001$)。グラフトの血管内腔径は、poor runoff graft で 0.29 ± 0.09 mm² であり、nonoccluded graft で 0.56 ± 0.28 mm² であった (poor runoff graft で有意に小さい; $n=7$, $P<0.05$)。両グラフトでは顕著な内膜肥厚が認められず、またグラフト中膜の厚さならびに細胞数に有意な差は認められなかった。

ACh による内皮依存性弛緩反応は、L-NNA 非存在および存在下ともに、nonoccluded graft に比較して poor runoff graft で有意に低下した (図 1)。

ACh ($0.3-10$ μ M) は濃度依存性に平滑筋細胞を過分極した。この過分極反応は、内皮細胞 Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル阻害薬であるシャリブドトキシンとアパミンの併用で消失した。ACh による過分極は、nonoccluded graft に比較して poor runoff graft で有意に小さかった (図 2)。ACh (10 μ M) および Substance-P (0.2 μ M) による平滑筋細胞の過分極は、nonoccluded graft に比較して、poor runoff graft で有意に小さかった。一方、カルシウムイオノフォア A23187 (1 μ M) による平滑筋細胞の過分極は両グラフト間で差を認めなかった (図 3B)。

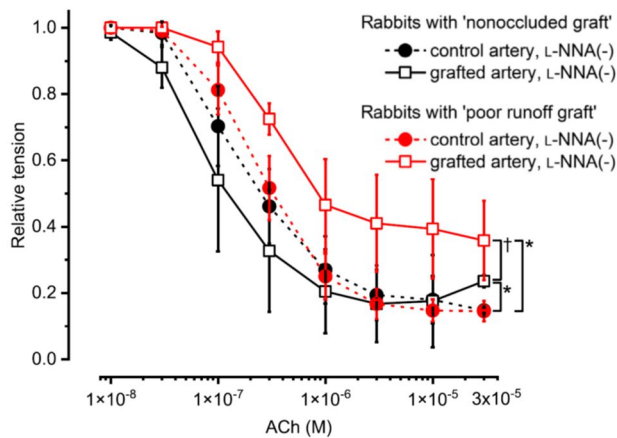


図1 . ACh による内皮依存性弛緩反応 (Sakakibara et al. 2022 より引用)

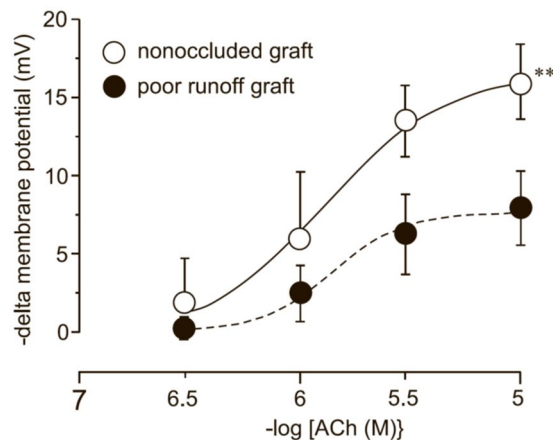


図2 . ACh による平滑筋細胞の過分極 (Sakakibara et al. 2022 より引用)

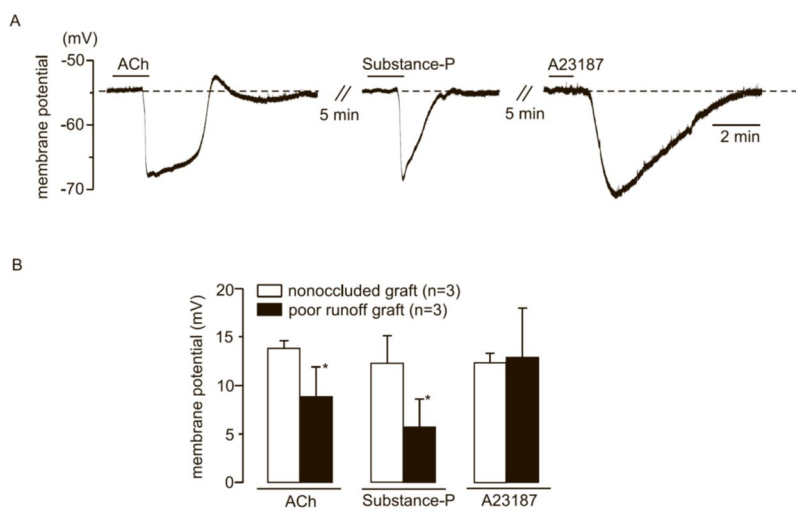


図3 . ACh(10 μ M), Substance-P (0.2 μ M)と A23187 (1 μ M)による平滑筋細胞の過分極 (同一標本による連続反応) (Sakakibara et al. 2022 より引用)

(2) 考察

本研究において、正常血流動脈グラフトに比較して異常低血流動脈グラフトでは、受容器活性化による EDNO と EDHF の機能がともに半減した。しかしながら、両グラフトでは明らかな内膜肥厚形成が認められなかった。これらの結果は、異常低血流動脈グラフトに残存する EDNO と EDHF の機能が内膜肥厚を抑制するのに十分である可能性を示唆する。

正常血流動脈グラフトと比較して異常低血流動脈グラフトでは、内皮細胞刺激剤である ACh による弛緩反応が NO 合成阻害薬の存在および非存在下でともに減弱した。このことより、異常低血流動脈グラフトでは、受容器活性化による内皮細胞からの NO の合成・遊離が減弱すると考えられた。また、正常血流動脈グラフトと比較して異常低血流動脈グラフトにおいて内皮細胞の受容器アゴニストである ACh および Substance-P による内皮依存性の平滑筋細胞の過分極反応が減少 (アゴニスト刺激による EDHF 機能の低下) した。一方、内皮細胞の非受容器活性化剤であるカルシウムイオノフォア A23187 による平滑筋細胞の過分極反応は正常血流動脈グラフトと異常低血流動脈グラフト間で差が認められなかった (図 3B)。これらの結果より、異常低血流動脈グラフトでは受容器活性化による内皮細胞の Ca^{2+} 動員機構が選択的に障害され、EDHF の機能障害を発生している可能性が示唆された。

ウサギ異常低血流動脈静脈グラフトモデルでは、EDNO と EDHF の反応がともに消失し、高度な内膜肥厚が発生することが報告されている (Itoh et al., 2012 など)。驚いたことに本研究のウサギ異常低血流動脈グラフトでは、正常血流動脈グラフトと同様、内膜肥厚を発生しなかった。これらの結果より、正常血流動脈グラフトに比較して異常低血流動脈グラフトでは EDNO と EDHF の機能は半減するが、残存している EDNO と EDHF が内膜肥厚を抑制するのに十分な活性を保持している可能性が示唆された。冠動脈バイパス術において、静脈グラフトと比較し動脈グラフトは良好な開存率を有する。本研究結果は、動脈グラフトは静脈グラフトに比べてより多くの EDNO や EDHF の活性を残存することにより内膜肥厚を抑制し、良好な開存率をもたらしている可能性を

示唆した。

(3) 結論

異常低血流ウサギ総頸動脈グラフトモデルを開発し、血管リモデリングにおける EDNO と EDHF の機能に対する外科手術の影響を検討した。異常低血流動脈グラフトでは、受容器活性化による内皮細胞の Ca^{2+} 動員機構が障害されることによって EDNO と EDHF の機能が半減したが、明らかな内膜肥厚は認められなかった。これらの結果は、EDNO と EDHF の機能が完全に消失し著明な内膜肥厚を発生したウサギ異常低血流静脈グラフトモデルの場合と対照的であった。本研究結果は、異常低血流動脈グラフトにおいて残存する EDNO と EDHF が内膜肥厚を抑制し、グラフト開存率の向上に重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

<引用文献>

1. Itoh T, Maekawa T, Shibayama Y. Characteristics of ACh-induced hyperpolarization and relaxation in rabbit jugular vein. *Br J Pharmacol*. 2012;167:682-696.
2. 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*. 2017;81:1222-1230.
3. Sakakibara M, Kodama A, Komori K, Itoh T. Reduced function of endothelial nitric oxide and hyperpolarization in artery grafts with poor runoff. *J Surg Res*. 2022;270:2-11.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masashi Sakakibara, Akio Kodama, Kimihiro Komori, and Takeo Itoh.	4. 巻 270
2. 論文標題 Reduced function of endothelial nitric oxide and hyperpolarization in artery grafts with poor runoff	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Surg Res	6. 最初と最後の頁 2-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jss.2021.08.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大塚亮, 田畑光紀, 古森公浩, 伊藤猛雄
2. 発表標題 ウサギ自家動脈グラフトの内皮依存性弛緩反応におけるTRPV4活性化薬と阻害薬の効果
3. 学会等名 第61回 日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	古森 公浩 (Komori Kimihiro)		
研究協力者	榊原 昌志 (Sakakibara Masashi)		
研究協力者	大塚 亮 (Otsuka Ryo)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------