

平成21年5月25日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790916

研究課題名（和文） 移植後動脈硬化進展におけるADP受容体（P2Y12）の役割

研究課題名（英文） Role of ADP receptor (P2Y12) 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：ADP受容体の一つであるP2Y12受容体欠損マウスを用いて、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。野生型に比して、P2Y12受容体欠損レシピエントマウスにおいて（1）頸動脈移植片の血管腔狭窄率の減少（2）移植片新生内膜におけるCD45陽性白血球数およびsmooth muscle alpha-actin陽性細胞数の減少（3）移植後動脈硬化進展に関与する細胞（炎症細胞など）の動員を促すケモカインMCP-1（Monocyte Chemotactic Protein-1）レベルの低下。以上の結果より、移植後動脈硬化進展にはP2Y12受容体が関与しており、MCP-1レベルの変化を伴うことが明らかとなった。今後、培養細胞を用いてADP、MCP-1の相互作用などのメカニズム解析を進める予定である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,500,000	0	1,500,000
20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	510,000	3,710,000

研究分野：医師薬学

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、ADP受容体（P2Y12）、炎症、smooth muscle alpha-actin、ケモカイン（MCP-1）

1. 研究開始当初の背景

移植された血管において、レシピエントの免疫反応によりドナーの内皮が傷害されると、血小板の活性化、更なる炎症細胞の浸潤、様々なサイトカインの産生がみとめられる。その後、産生されたサイトカインが平滑筋様細胞の内皮下への遊走・増殖を促し、新生内膜を形成（移植後動脈硬化）→血管閉塞による臓器機能不全を来すとされている。

ADP (adenosine diphosphate) 受容体の一つであるP2Y12は血小板凝集に関与することがよく知られている。血小板は炎症にも関与するという報告から、P2Y12受容体が移植後動脈硬化進展に関与することが予想された。

2. 研究の目的

本研究では、P2Y12受容体欠損（KO）マウスと同じ系統の野生型（WT）マウスを用いて、

以下のことを比較検討した。移植後動脈硬化巣における、(1) 肥厚面積、(2) 細胞成分(平滑筋様細胞、炎症細胞など)、(3) 循環血中のサイトカインの検出。

3. 研究の方法

(1) 血管移植モデルの作製: 実験動物には、BALB/c マウスをドナー, KO または WT マウス (共に C57BL/6×129/Sv) をレシピエントとして用いた。ペントバルビタール麻酔下にて頸動脈移植を同所性に行った。

(2) 移植片の組織学的解析: 組織学的変化を評価するために、移植 8 週間後に移植片の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、(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。また、各切片の免疫組織学的染色を行い、移植後動脈硬化巣における細胞成分を同定・定量評価した。

(3) 血漿中のケモカイン MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) の検出: 移植 8 週間後にペントバルビタール麻酔下にてレシピエントの下大静脈より採血した後、クエン酸ナトリウムと混和した。上清を遠心分離しサンプルとした。血漿中の MCP-1 は RayBiotech 社のサイトカインアレイキットを用いて測定した。

4. 研究成果

移植 8 週間後の頸動脈移植片の血管狭窄率を測定したところ、WT レシピエント群に比して、KO レシピエント群において、血管狭窄率の有意な低下を認めた (図 1)。また、移植 8 週間後、頸動脈移植片の細胞成分を免疫染色により検討したところ、白血球のマーカーである CD45 陽性細胞数 (図 2)、および、平滑筋様細胞のマーカーである SMA (Smooth Muscle α -Actin) 陽性細胞数 (図 3) が KO レシピエント群において有意に低下した。さらに移植 8 週間後、血漿中の MCP-1 レベルを測定したところ、KO 群において有意な低下を示した (図 4)。

以上の結果より、P2Y₁₂ 受容体欠損レシピエントマウスにおける移植後動脈硬化進展抑制は、MCP-1 レベルの低下により、炎症細胞や平滑筋様細胞の移植片への動員が抑制されたためであると考えられる。今後、培養細胞を用いて ADP, MCP-1 の相互作用などのメカニズム解析を進める予定である。

P2Y₁₂ 受容体拮抗薬であるクロピドグレルは、臓器移植後の血栓形成抑制のために用いられることがある。今回得られた結果から、P2Y₁₂ 受容体は、従来から広く知られている血小板凝集だけでなく、移植後動脈硬化進展にも関与することが示唆された。従って、本受容体の拮抗薬は、臨床において、血栓予防だけでなく、移植後動脈硬化進展の治療薬と

しても使用可能となるかもしれない。

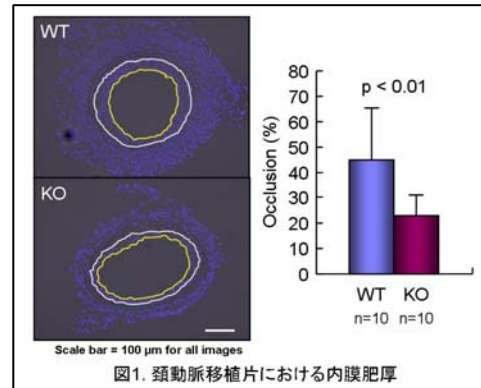


図1. 頸動脈移植片における内膜肥厚

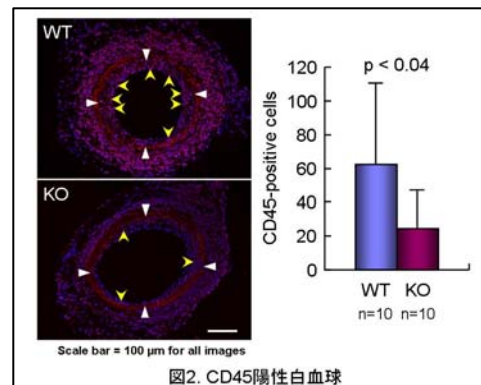


図2. CD45陽性白血球

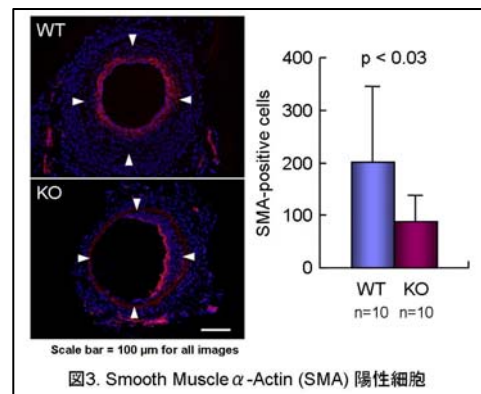


図3. Smooth Muscle α -Actin (SMA) 陽性細胞

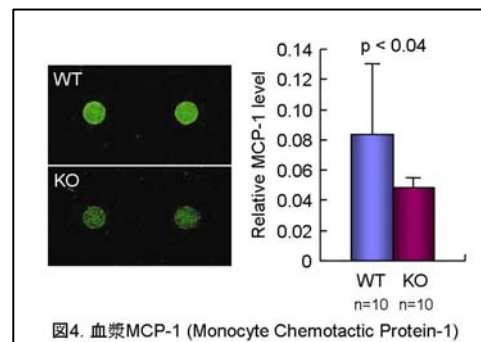


図4. 血漿MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1)

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 1 件)

Yuji MATSUMOTO, Kazuo UMEMURA.
Reduced Development of Transplant
Arteriosclerosis in ADP Receptor
P2Y12-Deficient Recipient Mice. Transplantation,
査読有, 86(2S), 2008, 193.

〔学会発表〕(計 2 件)

Yuji MATSUMOTO. Reduced Development of
Transplant Arteriosclerosis in ADP Receptor
P2Y12-Deficient Recipient Mice. XXII
International Congress of The Transplantation
Society. 2008年8月13日.シドニー, オース
トラリア.

松本祐直. ADP受容体P2Y12欠損レシピエン
トマウスにおける頸動脈移植後の動脈硬化
進展縮小. 第82回日本薬理学会年会. 2009
年3月17日. パシフィコ横浜.

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