

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07398

研究課題名(和文) プラーク安定化の指標となる平滑筋成熟は、薬剤溶出ステント留置後内膜にも認めるか？

研究課題名(英文) Does smooth muscle maturation, an indicator of plaque stabilization, also appear in the intima after drug-eluting stent placement?

研究代表者

倉田 厚 (Kurata, Atsushi)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：10302689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は動脈内膜平滑筋の中間的分化がプラーク安定化の指標となることを提言してきた。今回、特にsirolimusを用いた薬剤溶出ステントによりステント再狭窄が減少する理由として、動脈内膜平滑筋の中間的分化が関わるかを検討した。h-caldesmonやcalponinの発現亢進、またFAPの発現低下を中間的分化の指標とした。ステント施行後剖検例20例の免疫組織化学的検索、またヒト冠動脈平滑筋培養細胞への薬剤添加実験いずれにしても、sirolimusには平滑筋を分化させる作用があることが判明した。平滑筋の中間的分化が、冠動脈プラーク安定化とステント再狭窄予防の両者に共通した因子であることを提言したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋梗塞等の動脈硬化性疾患の大部分はプラークの破綻から生じる。破綻しにくい安定プラークは、脂質コアが小さく、脂質コアを覆う、平滑筋を主成分とする線維性被膜が増大している。一方、ステント挿入後の議論では、平滑筋の増生がステント再狭窄に関わる悪玉とされている。このように平滑筋の量ではプラーク安定化とステント挿入後予後で矛盾した結果となる。が、本研究でsirolimus溶出ステントにて平滑筋が分化したことは、動脈内膜平滑筋の中間的分化がプラーク安定化の指標となるというこれまでの我々の提言と併せて、動脈内膜平滑筋の中間的分化が、冠動脈プラーク安定化とステント再狭窄予防の両者に共通した因子と提言できる。

研究成果の概要(英文)：We have proposed that intermediate differentiation of arterial intimal smooth muscle cells (SMCs) is an indicator of plaque stabilization. In the present study, we investigated whether intermediate differentiation of intimal SMCs is involved in the reduction of stent restenosis, especially with sirolimus drug-eluting stents. Increased h-caldesmon and calponin expression along with decreased FAP expression were used as indicators of intermediate differentiation. Immunohistochemical analysis of 20 post-stent autopsies and the addition of the drugs to cultured human coronary artery SMCs both revealed that sirolimus has a differentiating effect on SMCs. We propose that intermediate SMC differentiation is a common factor in both coronary plaque stabilization and prevention of stent restenosis.

研究分野：血管病理学

キーワード：動脈硬化 冠動脈ステント 平滑筋 免疫組織化学 h-caldesmon calponin FAP sirolimus

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患は世界的にも死因の約 1/3 を占め、その大部分は動脈硬化性プラーク(粥腫)の破綻から生じる心筋梗塞や脳梗塞である。プラーク破綻の主因は、プラークの不安定性であり、脂質コアの増大と、脂質コアを覆う線維性被膜の菲薄化が指標とされる(Falk et al. *Circulation* 1995)。しかし、なぜ脂質コアが増大して線維性被膜が菲薄化するかについては解明されていない。プラーク不安定化の原因として、脂質コアを構成するマクロファージからの matrix metalloproteinase 分泌等に注目が集まっているが、因果関係を証明したものはない(Finn et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010)。一方で、プラーク不安定化に関して、線維性被膜の主成分である内膜平滑筋に着目した研究はほとんどない。

一般に血管中膜には α -smooth muscle actin(α -SMA)に加え、desmin や smoothelin などの収縮関連の平滑筋マーカーが陽性で、成熟した収縮型平滑筋と呼ばれる。一方、内膜平滑筋は α -SMA を除く平滑筋マーカーは陰性な未分化状態であるとされ、代わりに酵素等を合成・分泌するとして合成(分泌)型平滑筋と呼ばれる。

ところで、研究代表者らは平滑筋系腫瘍の研究を端緒に(Horita, Kurata et al. *Int J Gynecol Pathol*. 2011)、わが国で開発された収縮関連蛋白の h-caldesmon (Sobue et al. *J Cell Biochem* 1988) が血管平滑筋分化の中間的段階から発現するという知見を得た。それを元に、剖検例の冠動脈を検索したところ、安定プラークと考えられる非心筋梗塞例では α -SMA 陽性となる内膜平滑筋細胞の約半数において h-caldesmon が発現しているものの、不安定プラークと考えられる心筋梗塞例では平滑筋細胞における h-caldesmon 発現率が有意に低下していることを見出した(Horita, Kurata et al. *Cardiovasc Pathol*. 2015)。内頸動脈剥離術検体においても、同検体内の h-caldesmon/ α -SMA 比率が低下して平滑筋が未熟であるほど、同剥離術後 5 年以内に、対側の内頸動脈狭窄症や急性冠症候群などの動脈硬化性疾患による手術を受ける比率が高いことを後ろ向きコホート研究にて見出した(Hashimoto, Kurata et al. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015)。

一方、虚血性心疾患の治療の経皮的冠動脈形成術では、従来型の Bare Metal Stent(BMS) に比して、抗がん剤等を添付した薬剤溶出ステント Drug Eluting Stent(DES)により再狭窄率が著減することが知られ、その理由は平滑筋増殖抑制によると考えられているが、それら平滑筋の質(分化度)に関しては研究されていない。

2. 研究の目的

上述したように、プラークの安定・不安定化の議論では、主成分が平滑筋である線維性被膜の増大は善玉(プラーク安定化に関わる)と見なされている。一方、ステント再狭窄の議論では、平滑筋の増生が悪玉(ステント再狭窄に関わる)とされている。これは奇異なことである。すなわち、動脈内膜の平滑筋の増加が、動脈硬化自体では善玉である一方、動脈硬化悪化を防ぐために施行したステントの予後では悪玉とされている。こうした矛盾は、内膜平滑筋の数に着目するからであって、その質に着目していないからであろうと考えた。

現状、動脈内膜の平滑筋は一様に未分化な合成(分泌)型平滑筋と見なされているが、そうではなく多様であり中間的分化が生じること、中間的分化を呈することは h-caldesmon 発現率で評価でき、中間的分化を呈する平滑筋は安定プラークの指標となることを応募者らは世界に先がけて提唱してきた。であるならば、冠動脈ステント再狭窄の議論においても、薬剤溶出ステント、特に sirolimus 溶出ステントで予後が良くなる(再狭窄率が低下する)理由に、内膜平滑筋の質すなわ中間的分化に関わるのではないかと考えた。

3. 研究の方法

東京医大および東京女子医大での倫理委員会の承認を得て(承認番号:T2020-0087 および#2022-0133)、両院で剖検となり、冠動脈にステントが挿入され、挿入後 4 年以上経過して内膜増殖が認められたと考えられる症例について、BMS 7 例と DES 13 例(うち sirolimus が用いられた例(SES) 10 例と paclitaxel が用いられた例(PES) 3 例)を選定した。各々の症例において、ステント部、非ステント部の冠動脈を切り出し、内膜にて α -SMA 陽性となる平滑筋の h-caldesmon、calponin、FAP の各陽性率を同一視野にて算出した。

加えて、ヒト冠動脈平滑筋培養細胞(CC-2583, Lonza)に、DES の薬剤の paclitaxel および sirolimus を添加した。培養細胞の長径の延長、ウエスタン・ブロッティングでの calponin 発現の亢進と FAP 発現の低下を分化の指標とした。

4. 研究成果

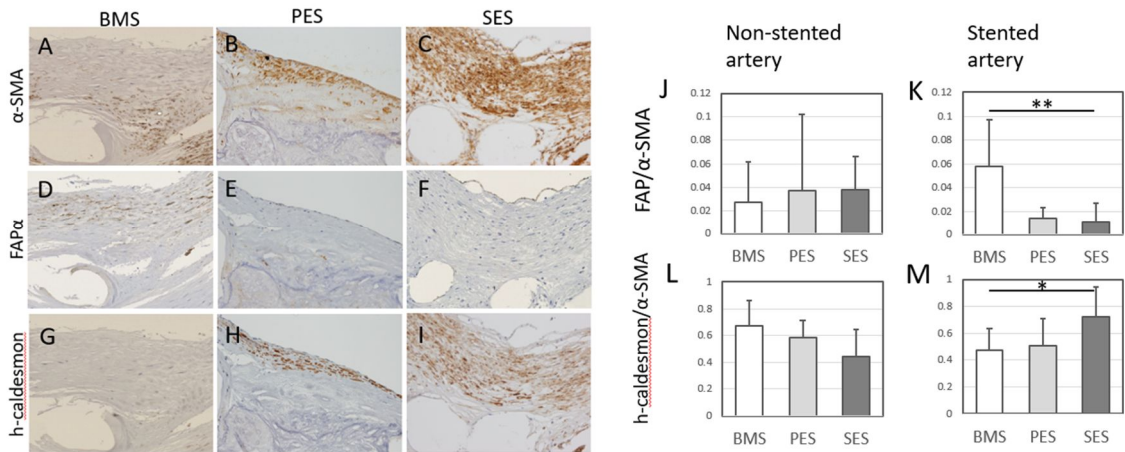
剖検例冠動脈の SES 例では、BMS 例や PES 例に比して、内膜における α -SMA 陽性となる平滑筋のうち、h-caldesmon および calponin 陽性率増加を指標とする平滑筋分化度の有意な上昇、FAP 陽性率増加を指標とする平滑筋脱分化度の有意な低下がみられた。これらの結果、SES により内膜平滑筋は、増殖抑制のみならず分化成熟がもたらされることが示唆された。

ヒト冠動脈平滑筋培養細胞への paclitaxel および sirolimus 添加実験の結果、平滑筋培養細胞は paclitaxel 添加では長径が延長せず calponin/ α -SMA 発現比率は増えずに FAP/ α -SMA 発現比率が増加したことで、分化しない(むしろ脱分化した)ことがわかった。一方、sirolimus 添加では長径が延長し calponin/ α -SMA 発現比率が上昇し FAP/ α -SMA 発現比率が低下したことから、分化したことを見出した。

これらから、DES の薬剤 sirolimus には平滑筋を分化させる作用があることが、剖検例の免疫組織化学的結果により vivo にて、また培養細胞実験により vitro にて、判明した。これらは、SES 例が PES 例に比して再狭窄率を有意に低下させるという、メタ分析結果の理由ともなる (Schömig A, et al. J Am Coll Cardiol 2007)。我々は本研究から、h-caldesmon や calponin の発現亢進、また FAP の発現低下を指標とする動脈内膜の平滑筋の中間的分化が、冠動脈プラーク安定化とステント再狭窄予防の両者に共通した因子であることを提言したい。

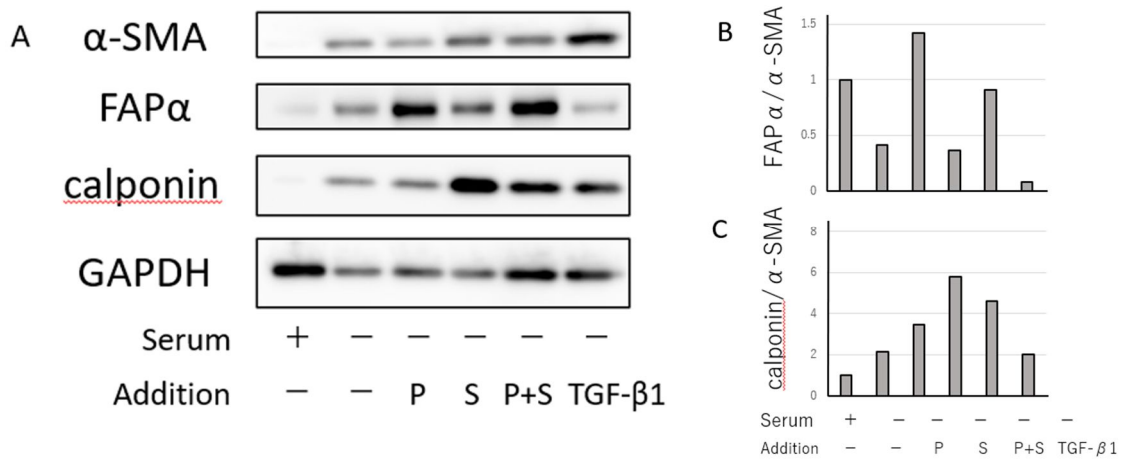
本研究の成果は、Cardiovascular Pathology 誌に受理された (Kurata A, et al. (in press))。

BMS (n=7), PES (n=3), SES (n=10) ステント検体の免疫組織化学的検索の結果



sirolimus 溶出ステント (SES) では α -SMA 陽性の平滑筋が FAP 発現低下、h-caldesmon 発現亢進を示す。

ヒト冠動脈平滑筋培養細胞への paclitaxel(P), sirolimus(S), 分化誘導剤 TGF- β 1 添加結果



Serum 除去にて α -SMA 陽性の平滑筋が FAP 発現低下、calponin 発現亢進からなる分化を示すが、sirolimus 投与によりさらなる分化を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件(うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件)

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Kurata Atsushi, Takanashi Masakatsu, Ohno Shin-ichiro, Fujita Koji, Kuroda Masahiko | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Cisplatin induces differentiation in teratomas derived from pluripotent stem cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Regenerative Therapy | 6. 最初と最後の頁 117 ~ 126 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2021.05.005 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yamada Yuko, Kurata Atsushi, Fujita Koji, Kuroda Masahiko | 4. 巻 100 |
| 2. 論文標題 Fascin as a useful marker for cancer-associated fibroblasts in invasive lung adenocarcinoma | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Medicine | 6. 最初と最後の頁 e27162 ~ e27162 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000027162 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Jigjidkhorloo NarangereI, Kanekura Kohsuke, Matsubayashi Jun, Akahane Daigo, Fujita Koji, Oikawa Keiki, Kurata Atsushi, Takanashi Masakatsu, Endou Hitoshi, Nagao Toshitaka, Gotoh Akihiko, Norov Oyundelger, Kuroda Masahiko | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Expression of L-type amino acid transporter 1 is a poor prognostic factor for Non-Hodgkin's Lymphoma | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 21638 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-00811-8 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Isobe M, Amano K, Arimura Y, Ishizu A, Ito S, Kaname S, Kobayashi S, . . . Kurata A (28th of 50) . . . , on behalf of the JCS Joint Working Group | 4. 巻 84 |
| 2. 論文標題 JCS 2017 Guideline on Management of Vasculitis Syndrome Digest Version | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Circulation Journal | 6. 最初と最後の頁 299 ~ 359 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-19-0773 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kurata Atsushi | 4. 巻 476 |
| 2. 論文標題 Strategy for postmortem diagnosis of myocardial infarction | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Virchows Archiv | 6. 最初と最後の頁 177 ~ 178 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-019-02665-y | 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 - |

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Kurata Atsushi, Harada Yuichiro, Fujita Koji, Ohno Shin-ichiro, Takanashi Masakatsu, Yoshizawa Saeko, Nagashima Yoji, Nagao Toshitaka, Yamaguchi Junichi, Kuroda Masahiko | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 Smooth muscle differentiation of coronary intima in autopsy tissues after sirolimus-eluting stent implantation | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Cardiovascular Pathology | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 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12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 倉田 厚、原田 裕一郎、藤田 浩司、大野 慎一郎、高梨 正勝、長尾 俊孝、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 剖検例冠動脈のDES留置後内膜と、培養平滑筋細胞にrapamycin添加後の、平滑筋分化 |
| 3. 学会等名 第111回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山田 侑子、倉田 厚、高橋 達彦、藤田 浩司、高木 央、荻原 優衣、高江洲 央、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 Trousseau症候群剖検例における血栓形成機序の免疫組織学的解析 |
| 3. 学会等名 第27回日本血管病理研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 倉田 厚、原田 裕一郎、藤田 浩司、大野 慎一郎、高梨 正勝、長尾 俊孝、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 剖検例冠動脈のDES留置後内膜と、培養平滑筋細胞にrapamycin添加後の、平滑筋分化 |
| 3. 学会等名 第111回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山田 侑子、倉田 厚、高橋 達彦、藤田 浩司、高木 央、荻原 優衣、高江洲 央、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 Trousseau症候群剖検例における血栓形成機序の免疫組織学的解析 |
| 3. 学会等名 第27回日本血管病理研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高木央、高橋達彦、荻原優衣、高江洲央、山田侑子、藤田浩司、倉田厚、黒田雅彦 |
| 2. 発表標題 Trousseau症候群の血栓形成に関する剖検例での免疫組織学的検討 |
| 3. 学会等名 第110回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 倉田 厚、高梨 正勝、藤田 浩司、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 シスプラチンによるマウス多能性幹細胞由来未熟奇形腫の分化誘導 |
| 3. 学会等名 第110回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Atsushi Kurata, Masakatsu Takanashi, Shin-ichiro Ohno, Masahiko Kuroda |
| 2. 発表標題 Cisplatin induces differentiation in pluripotent stem cell-derived immature teratoma |
| 3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高橋 達彦, 山田 侑子, 倉田 厚, 藤田 浩司, 高木 央, 荻原 優衣, 高江洲 央, 黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 Trousseau症候群の血栓形成に関する剖検例での免疫組織学的検討 |
| 3. 学会等名 第188回東京医科大学医学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 倉田 厚、原田 裕一郎、藤田 浩司、大野 慎一郎、高梨 正勝、長尾 俊孝、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 剖検例のDES留置後内膜、また培養平滑筋細胞にrapamycin添加後の、Calponin発現の上昇 |
| 3. 学会等名 第26回日本血管病理研究会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 倉田 厚、高梨 正勝、藤田 浩司、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 マウスES/iPS細胞由来テラトーマの抗がん剤による分化誘導（ピノコーマ）とその免疫組織化学的検証 |
| 3. 学会等名 第109回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 植松優希、山本みな美、紺澤咲乃、藤田絢哉、天海智博、倉田 厚、黒田雅彦、東 伸昭、高橋勝彦 |
| 2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝のPin1に麹菌発酵由来多糖類が及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第140年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 倉田 厚、大野 慎一郎、藤田 浩司、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 冠動脈ステント挿入後の内膜平滑筋の成熟度に関する薬剤溶出ステントと従来型ステントの比較 |
| 3. 学会等名 第25回日本血管病理研究会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計2件

| | |
|-----------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 北川 昌伸、仁木 利郎、小田 義直 | 4. 発行年 2023年 |
| 2. 出版社 医学書院 | 5. 総ページ数 856 |
| 3. 書名 標準病理学 第7版 | |

| | |
|-------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 保科克行、今井 靖、加藤雅明、南野哲男 | 4. 発行年 2023年 |
| 2. 出版社 Gakken | 5. 総ページ数 356 |
| 3. 書名 循環器診療コンプリート 血管疾患 | |

〔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 分 担 者 | 黒田 雅彦 (Kuroda Masahiko) (80251304) | 東京医科大学・医学部・主任教授 (32645) | |
| 研究 分 担 者 | 大野 慎一郎 (Ohno Shin-ichiro) (90513680) | 東京医科大学・医学部・講師 (32645) | |

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 |
|---------|---------|