

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月6日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591625

研究課題名（和文） 静脈グラフト内膜肥厚発生機序の解明

研究課題名（英文） The mechanism of intimal hyperplasia in vein graft

研究代表者

内田 恒 (UCHIDA HISASHI)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：60301991

【背景】慢性透析患者の動静脈シャント吻合部内膜肥厚は、急速な平滑筋細胞や細胞外蛋白成分の内腔への集積で重要な閉塞原因となっている。【方法と結果】動静脈シャント吻合部内膜肥厚により術後閉塞した14例の内膜肥厚組織を採取し、平滑筋細胞増殖能と移動能の判定のためPCNA、MMPsと平滑筋細胞遊走能を測定した。組織MMP2レベルは早期閉塞例で有意に上昇しMMP2依存性の平滑筋細胞遊走を認めたが、細胞増殖能と閉塞期間に相関を認めなかった。この臨床結果確認のためマウス動静脈シャントモデルを新たに作成しMMP2+/+マウスと比較してMMP2-/-マウスで有意に内膜病変形成が少ないことを証明した。またSMCを低酸素にして培養しタンパク、遺伝子レベルで評価するとIntegrinとMMP-2の発現が関連していることが示唆された。【結語】吻合部内膜肥厚による早期動静脈シャント閉塞は、MMP-2活性化による平滑筋細胞遊走が関与している。

研究成果の概要（英文）：

**Objectives:** Many investigators have demonstrated that MMPs are important in smooth muscle cell (SMC) migration *ex vivo* and in neointimal hyperplasia (NH) lesion formation in animal model of injury. This study aim to demonstrate that MMP-2 have a critical role in the early NH lesion formation after arteriovenous (AV) access creation. **Methods and Results:** To determine MMP-2 is critical to early NH lesion formation after AV access creation, we created an AV fistula in mice by anastomosing the common carotid artery to the external jugular vein in an end-to-side fashion. After 3 weeks, MMP-2<sup>-/-</sup> mice have significantly less anastomotic NH lesion formation compared to the wild-type MMP-2<sup>+/+</sup> mice confirming that MMP-2 activity is indeed critical to early neointimal hyperplasia in the setting of AV fistulae. And there is significant increase in the tissue levels of pro-MMP-2 and activated MMP-2 based on the gelatin-substrate zymography. Also we found MMP-2<sup>-/-</sup> mice had no MMP-2 activity following AV fistula creation. These MMP-2<sup>-/-</sup> mice did not have compensatory increase in the expression of MMP-9. We also demonstrated that like the human counterpart, the mouse NH lesion is predominantly SMCs (SM specific  $\alpha$ -actin immunostaining) with minimal number of macrophages (Mac-3 immunostaining). *In vitro*, integrin  $\alpha_v$ ,  $\beta_3$ , and MMP-2 was up-regulated in SMC, when the cells were cultured under hypoxic conditions. It was seemed to have some relations between these molecules at its expressions. **Conclusions:** Early primary AV access failure due to anastomotic neointimal hyperplasia is associated with increased MMP-2-dependent SMC migration. This association is confirmed with the AV fistula mouse model, which demonstrated a significantly less anastomotic neointimal lesion formation in MMP-2<sup>-/-</sup> mice as compared to MMP-2<sup>+/+</sup> mice.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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： 血管平滑筋細胞、MMP-2、内膜肥厚、低酸素、インテグリン

### 1. 研究開始当初の背景

閉塞性血管病変に対して自家静脈グラフトを用いたバイパス術が施行されるが、グラフト閉塞の主因である内膜肥厚発生機序は未だに解明されておらず、内膜肥厚発生メカニズムの一因とされる血管平滑筋細胞の遊走と増殖の抑制がグラフト開存率の大きな向上につながる可能性がある。血管平滑筋細胞の遊走には細胞接着分子と接着を解離する分解酵素の相互調節が必要であり、細胞外マトリクスの分解過程は関連細胞から分泌されるマトリクスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase; MMP)の関与が知られている。血管平滑筋細胞の遊走、増殖においてはゼラチナーゼであるMMP2, MMP9 が関与することが示唆され、特にMMP2は恒常型に分類され線維芽細胞で産生される。また動脈における内皮障害の際に発生する内膜肥厚形成には骨髄由来細胞の関与が証明されているが、このメカニズムがグラフト狭窄、閉塞にも影響を与えているか否かは不明である。

### 2. 研究の目的

本研究は内膜肥厚におけるMMP2の役割と内膜肥厚過程における骨髄由来細胞の関与の有無を明らかにし、さらにMMP-2発現を調節する因子とその機序を解明することを目的とした。

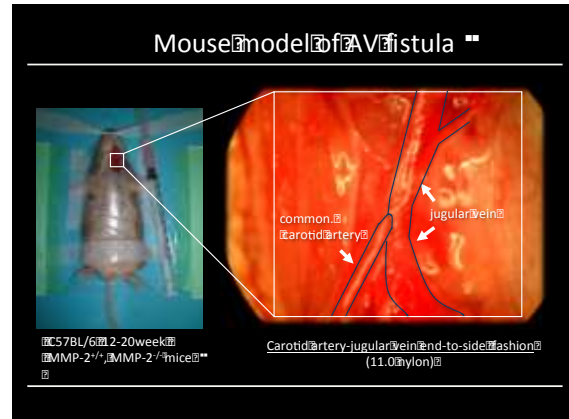
### 3. 研究の方法

(1) 内膜肥厚におけるMMP-2の役割と骨髄由来細胞の関与について

#### ① マウスシャントモデル

12-20週齢、オスのWild type C57B1/6(MMP2<sup>wild</sup>)とMMP2ノックアウトC57B1/6(MMP2<sup>-/-</sup>)、各15匹でシャントモデルを作製した。ケタミン(80mg/kg)、サイラジン(5mg/kg)腹腔内投与による麻酔下で左頸動脈と頸静脈を11-0ナイロンで端側吻合し動静脈シャントを作製した。吻合口長は約0.7mmで遮断解除後血流を確認している。術後3週目で犠牲死させ、手術部位の血管を摘出した。

図. マウスシャントモデルの作製



#### ② 病理組織学的解析

頸動静脈吻合部組織を4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後摘出し、パラフィン包埋した。これを図1に示すように100 $\mu$ m毎に5 $\mu$ mで薄切し、吻合部全体の標本を作製した。染色はヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、Verhoeff-van Gieson elastic (VvG)染色と以下一次抗体による免疫染色を行った。 $\alpha$ -actin, Mac-3染色による一次抗体反応後ビオチン-ストレプトアビジンにて標識し、DAB基質で発色させた。内膜肥厚病変定量は100 $\mu$ m毎に切り出した各々の吻合部近傍断面の内膜肥厚面積を画像計測ソフト(Olympus Microsuite software; Soft Imaging Systems, Tokyo, Japan)により計測し、各断面の内膜肥厚面積を全て加算し、内膜肥厚体積を算出した。

#### ③ ゼラチンザイモグラム

吻合部組織片を液体窒素で十分に冷却したのち、ホモジナイザーで粉砕し、Lysis buffer(1.0mol/L NaCl, 2.0mol/L urea, 0.1% Brij-35, 50mmol/L Tris-HCl(0.1%EDTA含有))とプロテアーゼインヒビター(Sigma-Aldrich)を加えタンパクを抽出した。5000-MW cutoff membraneを用い10,000G, 1時間, 4 $^{\circ}$ C遠心分離後、タンパク濃度を測定し10 $\mu$ gを1%gelatin含有12% polyacrylamide gelsに溶解しSDS-PAGEで電気泳動した。ゲルをTriton X-100で洗浄しSDSを除去した。さらに消化緩衝液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5, 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol/L ZnCl<sub>2</sub>)で37 $^{\circ}$ C, 16時間処理した。溶解されたゲルを0.5% Coomassie blue 染色し、

Bio-Rad GS 700 imaging densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA) で定量的に解析した。

#### ④ 骨髄移植マウスシャントモデル

6-9 週齢 C57Bl/6 の Green Fluorescence Protein (GFP) トランスジェニックマウスと Wild type マウスに cesium9.5Gy を全身照射した。6-10 週齢のドナーとなる GFP トランスジェニックマウスの大腿骨髄細胞 ( $5 \times 10^6$  個 / 0.3-0.5ml) を採取し、照射後 6 時間にイソフルレン麻酔下に経眼窩周囲腔に注入した。GFP マウスから GFP マウスに骨髄移植した群 (BMT<sup>GFP→GFP</sup>) と GFP マウスから Wild type マウスに骨髄移植した群 (BMT<sup>GFP→Wild</sup>) を各 5 匹準備し、骨髄移植後 6 週目に前述のように動静脈シャントを作製した。

#### ⑤ 統計解析

数値は平均±標準誤差で示した、統計解析は多群間比較を ANOVA followed by Tukey's test で、2 群間比較を Student's t test で行った。P<0.05 を統計学的有意とした。

#### II. MMP-2 発現メカニズムの解明

血管平滑筋細胞を低酸素状態におき、低酸素培養細胞を回収し RNA を抽出し cDNA 化した後、real time PCR にて HIF-1 $\alpha$ ,  $\beta$  integrin, MMP2 の発現を経時的に計測した。低酸素培養細胞を回収しタンパクを抽出し、Western Blot, ELISA にて HIF-1 $\alpha$ , integrin, MMP2 の発現を経時的に計測した。

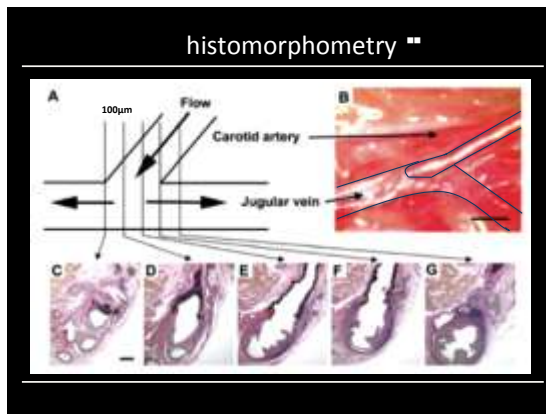
#### 4. 研究成果

##### (1) 内膜肥厚における MMP-2 の役割と骨髄由来細胞の関与について

##### ① Wild type マウスにおけるシャント内膜肥厚

シャント作成 3 週間目での検討では、吻合部静脈の側壁を中心に細胞成分を主体とした著大な内膜肥厚を認めた。

図. 各吻合部と内膜肥厚 (VvG 染色)



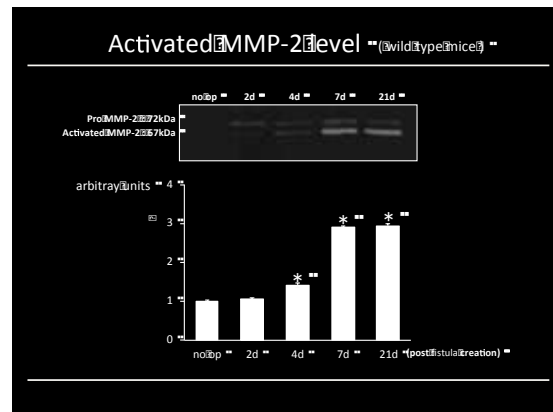
吻合部を含む組織切片を免疫染色にて検討したところ、 $\alpha$ -actin 陽性細胞を内膜肥厚組織内に多数認めたが、Mac-3 陽性細胞は少なかった。

図. 骨髄由来細胞と吻合部



ゼラチンザイモグラムにより吻合部組織中の潜在型 MMP2 と活性型 MMP2 の発現を経時的に検討したところ、術後 4 日目, 7 日目, 21 日目に活性型 MMP2 の有意な上昇を認めた (p<0.05, no operation;  $1.00 \pm 0.019$ , 4day;  $1.40 \pm 0.056$ , 7day;  $2.92 \pm 0.028$ , 14day;  $2.94 \pm 0.046$ , relative to no operation).

図. 吻合部での MMP-2 の活性化



以上の検討から Wild type マウスでは動静脈吻合にて静脈に内膜肥厚が発生し、同部で MMP2 の発現が上昇することが確認された。さらに内膜肥厚組織の構成成分は血管平滑筋細胞が主体となっており、マクロファージの浸潤は少ないことが明らかとなった。

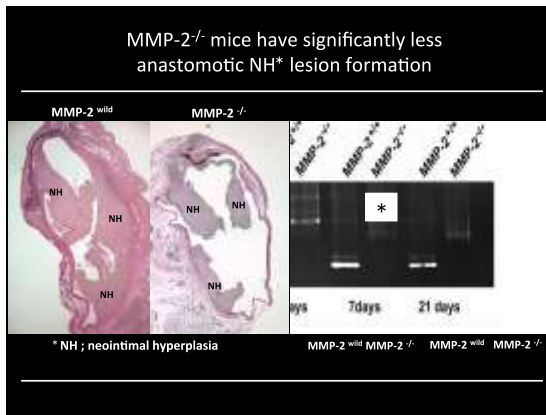
##### ② MMP2 発現と内膜肥厚形成

MMP2<sup>wild</sup> および MMP2<sup>-/-</sup> マウスの吻合部組織での MMP2 と MMP9 の発現を経時的に検討した。

MMP2 は前述のように MMP2<sup>wild</sup> で術後 7 日目, 21 日目に発現の増加を認めるが MMP2<sup>-/-</sup> マウスでは当然全く発現はなかった. また MMP9 の発現は MMP2<sup>wild</sup> マウス, MMP2<sup>-/-</sup> マウスともにほとんど変化を認めなかった.

病理組織学上 MMP2<sup>-/-</sup> マウスでは MMP2<sup>wild</sup> マウスと比較して著明に内膜肥厚形成が少なかった.

図. MMP2<sup>-/-</sup> マウスの病理所見



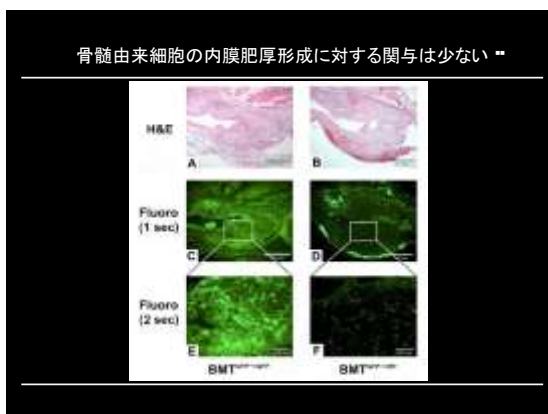
画像をさらに詳細に解析したところ, 内膜肥厚部体積 (図 3D,  $p < 0.05$ , MMP2<sup>wild</sup>;  $0.22 \pm 0.06$ , MMP2<sup>-/-</sup>;  $0.15 \pm 0.04$ ,  $\text{mm}^3$ ), 血管内腔狭小化率 (図 3E,  $p < 0.05$ , MMP2<sup>wild</sup>;  $37 \pm 8$ , MMP2<sup>-/-</sup>;  $24 \pm 5$ , %) とともに有意に MMP2<sup>-/-</sup> マウスが低値であった.

以上の検討からシャント吻合部の内膜肥厚形成に MMP2 が直接的に関与していることが示唆された.

### ③ シャント内膜肥厚への骨髄由来細胞の関与

骨髄移植マウスにシャントを作製し術後 3 週目に吻合部を検討した. BMT<sup>GFP→GFP</sup>, BMT<sup>GFP→Wild</sup> とともに非骨髄移植マウスと同様の内膜肥厚を形成していた. さらに同部を蛍光顕微鏡で観察したところ, BMT<sup>GFP→GFP</sup> マウスでは内膜肥厚内に強く蛍光細胞を認めたが (図 4C, E), BMT<sup>GFP→Wild</sup> マウスではほとんど蛍光細胞を認めなかった.

図. 骨髄移植マウスでの検討



以上の検討から骨髄由来細胞が肥厚内膜内にはほとんど存在しないことが明らかとなり, シャント内膜肥厚形成に骨髄由来細胞が明らかな関与はしていないことが示唆された.

### (2) MMP-2 発現メカニズムの解明

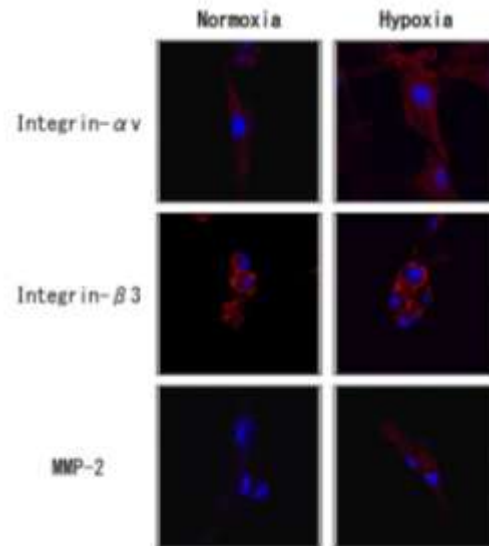
#### ① 低酸素状態でのヒト血管平滑筋細胞の

#### Integrin と MMP-2 の変化

一般に血管内膜肥厚過程では肥厚内膜局所は低酸素になっていることが知られている. そこでヒト血管平滑筋細胞 (SMC) を低酸素培養し免疫染色を施行した.

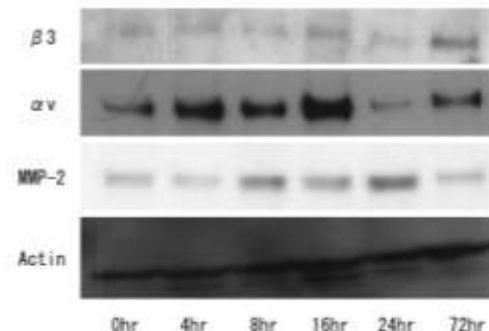
血管内膜で発現するとされる Integrin  $\alpha v$ ,  $\beta 3$ , および MMP-2 はそれぞれ 24 時間の低酸素で発現が更新することがわかった.

図. Integrin および MMP-2 の染色所見



またタンパクレベルの変化を見るため Western Blot を施行したが, こちらも同様に誘導され, さらに経時的に変化していたが, 現在再現性について追試をしている.

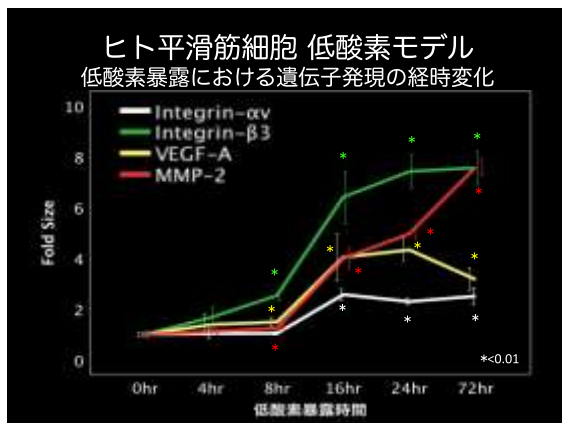
図. Integrin, MMP-2 のタンパク発現



② 低酸素下の各遺伝子の経時的变化  
 遺伝子レベルでの発現の変化を見るため、SMCを低酸素化で培養し経時的に回収、tRNAを抽出し、real time PCRで評価した。

前述のタンパクレベルと同様に低酸素下でIntegrin  $\alpha v$ ,  $\beta 3$ , MMP-2ともに遺伝子発現レベルでも上昇していた。さらにIntegrinでは $\beta 3$ のほうが $\alpha v$ よりも上昇が大きかった。またMMP-2の発現は低酸素で非常に大幅に上昇しており、Integrin  $\beta 3$ にやや遅れて発現していることが明らかとなった。この系についても再現性について追試験を試行中である。

図. 低酸素下の各遺伝子の経時的变化



これらの結果から Integrin の発現と MMP-2 の発現は関連性が示唆され、さらに Integrin, 特に  $\beta 3$  が MMP-2 の発現を誘導している可能性が示唆された。

#### 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 3 件)

1. Overview—わが国における末梢動脈疾患血行再建術 Heart View vol.4,41-46 2011. 内田恒、笹嶋唯博
2. ハイブリッド手術室の有用性を血管外科の視点から検証する 月刊 新医療 vol.442,99-101,2011 内田 恒
3. 血管平滑筋細胞を主体とする動静脈シャント吻合部内膜肥厚形成とマトリクスメタプロテアーゼ 2 発現の関与 北海道医学雑誌 vol87,115-120,2012 内田 恒

[学会発表] (計 10 件)

1. 2009. 5 月名古屋 第 37 回日本血管外科学会総会(シンポジウム) TASC 分類から見た鼠径靭帯以下への血行再建
2. 2009. 10 月東京 第 50 回日本脈管学会総会

(パネルディスカッション) TASC C, D 病変に対する治療方針

3. 2010. 2 月神戸 第 2 回 PASM The use of spliced vein bypass for infrapopliteal bypass

4. 2010. 3 月京都 第 74 回日本循環器学会総会(シンポジウム) Arguments of “Open First” procedure for critical limb ischemia

5. 2010. 5 月名古屋 第 38 回日本血管外科学会総会(シンポジウム) 頸動脈狭窄病変に対する治療戦略

6. 2011. 3 月浦安 第 41 回日本心臓血管外科学会(シンポジウム) 遠隔成績を考慮した間歇性跛行肢の治療選択

7. 2011. 3 月浦安 第 41 回日本心臓血管外科学会ランチョンセミナー講演 ハイブリッドORの現状と将来

8. 2011. 4 月沖縄 第 38 回日本血管外科学会総会(シンポジウム) 大腿動脈以下末梢動脈病変に対する治療戦略

9. 2011. 10 月岐阜 第 51 回日本脈管学会総会(ポスター) EVAR 93 例の初期-中期成績 (IFU vs IFU 外症例)

10. 2011. 9 月台北 12<sup>th</sup> ASVS(アジア血管外科学会) (oral presentation) “ANASTOMOTIC NEOINTIMAL HYPERPLASIA AS RELATED TO ARTERIOVENOUS ACCESS IS ASSOCIATED WITH MMP-2 DEPENDENT SMOOTH MUSCLE CELL MOTILITY”

[図書] (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

内田 恒 (Uchida Hisashi)  
 旭川医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：60301991

##### (2) 研究分担者

齊藤 幸裕 (Saito Yukihiro)  
 旭川医科大学・医学部・特任助教  
 研究者番号：80540583

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：