

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893053

研究課題名(和文) 抗炎症性脂質メディエーターを用いた血管疾患の新たな治療戦略の検討

研究課題名(英文) The novel strategy to treat atherosclerotic disease using anti-inflammatory lipid mediators

研究代表者

宮原 拓也 (MIYAHARA, TAKUYA)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20704943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：動物モデルを用いた内膜肥厚形成における抗炎症性脂質メディエーターの役割に関する検討を行った。ラット頸動脈のバルーン擦過モデルを作製し、擦過直後と2日後にレゾルビンD1 1 $\mu$ gを静注する群と、生食を静注する群をコントロール群として、擦過14日後の内膜肥厚の比較検討を新生内膜/中膜の面積比(NI/M比)を用いて評価した。現在、コントロール群5匹とレゾルビンD1投与群6匹の検体を採取して比較を行い、NI/M比はコントロール群とレゾルビンD1投与群で各々 $1.22 \pm 0.26$ 、 $0.85 \pm 0.14$  (p値=0.031)で、レゾルビンD1投与群の方がコントロール群に比較して内膜肥厚の形成が有意に抑制された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effect of anti-inflammatory lipid mediators on the intimal hyperplasia, we used a balloon injury model of the rat carotid artery. Resolvin D1 or protectin D was administered to the rat by iv-injection at two time points, just after injury and 2 days after injury, and normal saline (0.1% ethanol) was also injected as a control vehicle in the control group. We sacrificed the rat two weeks after injury and compared the intimal hyperplasia between the treated group and the control group. We used intima/media ratio (I/M ratio) to examine the intimal hyperplasia. The intimal hyperplasia was significantly attenuated in the treated vessels as compared to control vessels (control group (n=5), NI/M ratio= $1.22 \pm 0.26$  vs. Resolvin D1 group (n=6), NI/M ratio= $0.85 \pm 0.14$ , p=0.031). We are repeating these experiments using the additional animal models and also statistically comparing the intimal hyperplasia between two groups.

研究分野：血管外科

キーワード：抗炎症性脂質メディエーター 内膜肥厚 動脈硬化

## 1. 研究開始当初の背景

近年の報告では、動脈硬化性疾患と炎症反応との関係が注目されており、バイパス術後の吻合部狭窄やステント留置後の再狭窄においても様々なシグナル伝達やサイトカインを介する炎症反応が重要な役割を果たしていることが示唆される。従来、炎症反応は受動的に消退していくものと考えられていたが、この炎症反応の収束が能動的な過程であることが近年明らかになってきた。現在、能動的な炎症の収束反応に関与している抗炎症性の脂質メディエーターとして主に4つのものが見つかっており、必須脂肪酸である $\omega$ -6不飽和脂肪酸であるアラキドン酸から産生されるリポキシン、同じく $\omega$ -3不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)から産生されるレゾルビン、プロテクチン、およびマレシンがある。

炎症反応に着目して血管の内膜肥厚の抑制を検討した報告は多いが、炎症の能動的な収束作用をもつ脂質メディエーターに着目して血管疾患を検討した報告は少ない。その点で、動脈硬化、動脈瘤、或いは血管炎などの血管疾患の新たな治療戦略が開ける可能性がある。血管障害後の炎症反応に関する最近の報告で、レゾルビンD2の投与により血管平滑筋細胞の細胞増殖や遊走、白血球接着、炎症に関わる細胞接着因子やサイトカインの発現、活性酸素の産生などが抑制され、その結果として血管障害モデルにおける内膜肥厚の抑制効果があることが確認された(Miyahara T et al, FASEB J.2013;23)。

脂質メディエーターの抗炎症性作用に関するこれまでの報告では、腹膜炎、腸炎、敗血症、肺炎、炎症性疼痛などの動物モデルを用いて検討したものはあるが、血管疾患に対しての報告は少ない。また、免疫抑制剤や抗腫瘍薬を用いた内膜肥厚抑制の報告は多いが、それらには細胞毒性や再内皮化の遅延などの問題が残されている。その中で本研究における脂質メディエーターは細胞毒性や再内皮化遅延が少ない薬剤である可能性が考えられ、ステント留置後再狭窄や吻合部内膜肥厚に対する新たな治療戦略となることが期待される。

## 2. 研究の目的

血管の閉塞性疾患である動脈硬化性疾患においては、それら形成過程において炎症反応が主要な役割を果たしていると考えられており、本研究では、炎症反応の収束過程において抗炎症性脂質メディエーターの役割に着目した。

本研究では、動物モデルを用いた血管障害後の内膜肥厚形成過程において、炎症反応の収束がもたらす効果に関して検討する。レゾルビンD1やプロテクチンDなどの抗炎症性脂質メディエーターが血管障害後の炎症反応を収束させ、その結果として内膜肥厚が抑制されるかを検討し、さらにその過程において抗炎症性脂質メディエーターがどのような役割を果たしているかを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

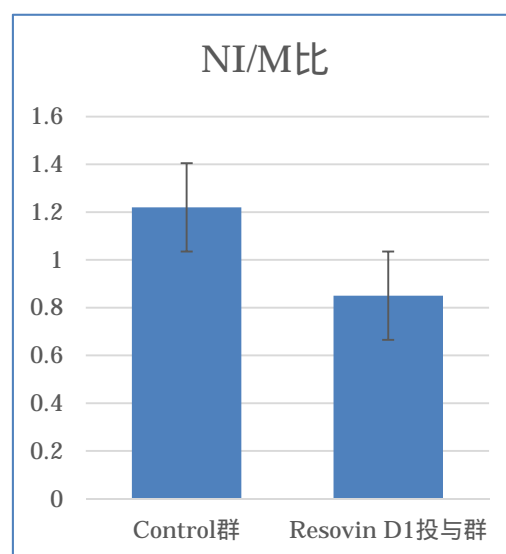
(1) 内膜肥厚モデルとしてはラット頸動脈のバルーン擦過モデルを用いている。350g ~ 550g 程度の雄のラットに対してケタミン・キシラジン腹腔内投与による麻醉下にラットの頸動脈を露出し、バルーンカテーテルで総頸動脈を擦過して血管内皮細胞を剥離すると、頸動脈の内壁に主に血管平滑筋細胞で構成される新生内膜が形成される。擦過直後と2日後に外側尾静脈よりレゾルビン D1 1 $\mu$ g を静注する群と、そのコントロール群として生食(0.1%エタノール)を静注する群を対照として内膜肥厚の比較を行っている。擦過14日後に灌流固定後に頸動脈の標本を採取し染色を行い、内膜肥厚の形成の評価は新生内膜/中膜の面積比(NI/M比)を用いて評価をしている。急性期の評価としては、擦過後3日目の新鮮凍結切片を用いて病理学的に細胞増殖、白血球の浸潤を評価し、また組織標本を用いて炎症性サイトカインや細胞接着因子の発現などを評価する。

(2) 細胞培養を用いて抗炎症性脂質メディエーターの細胞に対する影響も検討している。現在ラット大動脈の平滑筋細胞の培養を行っており、レゾルビン D1 やプロテクチンDを投与した培地と投与していないコントロールの培地で細胞増殖、細胞遊走、活性酸素や炎症性サイトカインの産生などの比較検討を行う。

#### 4. 研究成果

(1) まずラット頸動脈擦過モデルが安定して作製できるようになっている。現在、治療群6匹とコントロール群5匹の検体を

採取して比較を行っており、NI/M比はコントロール群とレゾルビン D1 投与群で各々  $1.22 \pm 0.26$ 、 $0.85 \pm 0.14$  (p 値=0.031) で、レゾルビン D1 投与群の方がコントロール群に比較して内膜面積が有意に抑制された。また中膜面積に関して治療群とコントロール群で差はみられていない。従って、新生内膜形成の指標となる新生内膜/中膜の面積比(NI/M比)は治療群において抑制された。同じ抗炎症性メディエーターであるプロテクチンDについても同様の投与方法で検討を開始している。



(2) 培養細胞を用いた実験に関しては、現在ラット大動脈の平滑筋細胞の凍結保存の条件が難しく、当初-80 で保存していたが細胞が安定して保存できないため、今後はすべて液体窒素にて凍結保存とする予定である。凍結保存法が安定した段階で、レゾルビン D1 やプロテクチンDを投与した培地と投与していないコントロールの培地で細胞増殖などの比較検討をこれから行う予定である。

<引用文献>

Miyahara T et al, D-series resolvin attenuates vascular smooth muscle cell activation and neointimal hyperplasia following vascular injury. .FASEB J.2013;27(6):2220-32.

5. 主な発表論文等

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮原 拓也 (MIYAHARA, Takuya)

東京大学医学部附属病院・助教

研究者番号：20704943

(2) 研究協力者

牧野 能久 (MAKINO, Yoshihisa)

東京大学・血管外科・大学院生