

プロスタグランディン E₁による
自家静脈グラフト内膜肥厚の抑制効果に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】冠動脈疾患や下肢閉塞性動脈硬化症などの小血管径の血行再建においては、自家静脈グラフトは優れたグラフト素材であり、広く汎用されている。しかしその内膜肥厚による晩期閉塞は遠隔期治療成績向上の妨げの一因となっている。その際のグラフト壁では細胞増殖、細胞死、細胞遊走および細胞外マトリックスの産生、分解をきたすような血管構築の変化、いわゆる血管リモデリングが起きるといわれている。

プロスタグランディン E₁ (PGE₁) は末梢血管拡張作用による血流維持効果に加え、さらに最近では内膜肥厚の抑制効果が示唆されており、血管平滑筋細胞の遊走、増殖抑制が関与していると考えられている。

血管平滑筋細胞 (vascular smooth muscle cells : VSMC) は血管収縮を担い、動脈硬化の発症や血管内カテーテル治療後の再狭窄病変の新生内膜形成時など、血管に異常が起こったときには、VSMC は正常時と異なる性質、すなわち VSMC は与えられた環境によって異なるフェノタイプを示す。これは形質転換と呼ばれ、自家静脈グラフトにおいても平滑筋細胞の形質転換に伴いプロスタノイド受容体の発現が変化することが予想される。

本研究では、大動物実験モデルを用いて自家静脈移植モデルを作成し、PGE₁ の内膜肥厚に対する抑制効果を検討した。

【方法】これまでに自家静脈グラフトや人工血管などの動物実験モデルとして頻用されているビーグル犬(体重 9-10kg)を 12 匹使用した。

両側外頸静脈をグラフトとして採取した。その後両側頸動脈グラフト置換し、実験モデルを作製。薬剤投与 (PGE₁ 0.5 μ g/kg/min) には動物実験用浸透圧ポンプを使用した。グラフト移植後 1 週目(PGE₁ 1w, n=6)および 4 週目 PGE₁ 4w, n=6)、また、対照群として同様のグラフト移植を行なった PGE₁ 非投与群を術後 1 週目(Control 1w, n=6) と 4 週目(Control 4w, n=6)について検討を行った。病理組織学的検討として、内膜および中膜肥厚の計測評価を Hematoxylin-Eosin 染色標本にて、MCID Image Analysis System(Imaging research inc., Ontario, Canada)を用いて行った。また免疫染色にて、PCNA 陽性細胞の割合を計測。a-actin, desmin 免疫染色陽性、陰性領域の割合を測定した。データは平均値 \pm 標準偏差で示し、2 群間の比較は t 検定を行った。p<0.05 をもって統計学的有意差と判定した。

【結果】グラフトの開存率は、コントロール群 (Control 1w, Control 4w) および薬剤

投与群 (PGE₁ 1w, PGE₁ 4w) とともに開存率は 100%であった。

PGE₁ 投与群では、1 週間目(PGE₁ 1w)および4 週間目(PGE₁ 4w)では各コントロール群の Control 1w, Control 4w と比較して有意に低値であり、内膜、中膜肥厚抑制効果を認めた(305.42±63.52 vs 366.01±52.31;P<0.0001) (381.79±31.55 vs 628.09±60.85;p<0.0001)。

PCNA 免疫染色は、両群に対し静脈グラフト移植前、移植後 1 週間目、4 週間目の静脈グラフト標本に対して施行した。PGE₁ 投与群では、移植後 1 週間目での PCNA 陽性細胞数が有意に減少した(8.02±1.91 vs 3.56±1.11;p<0.0001)。移植後 4 週間目における両群間に有意差は認められなかった。

移植手術後 1 週間の PGE₁ 投与群とコントロール群の a-actin, desmin 免疫染色による陽性、陰性領域を比較した場合、有意差は認めなかったものの、PGE₁ 投与群での内膜、中膜領域での a-actin(-), desmin(-)領域が少ない傾向が見られた。

【考察】臨床的に大伏在静脈は冠動脈バイパス術や、末梢血管等の血管径の細い部位へのバイパス素材として最も汎用され、近年グラフト開存率の向上を認めるものの、5 年経過で約 30%の閉塞を認めると報告されている。その原因の主たるものは内膜肥厚によるものと考えられ、そのメカニズムとして、これまでもさまざまな報告がされている。血管内膜障害に対する炎症性反応や extracellular matrix のリモデリング、平滑筋細胞の migration や hyperplasia, hypertrophy などが中膜層や新生内膜層で、移植後 1 から 4 週間、あるいはそれ以上の経過を経て起こるといわれている。内膜、中膜肥厚が形成される過程として、第 1 にグラフト移植を行った 1 週間までの早期に、平滑筋細胞の proliferation が中膜層にて発生し、中膜での細胞数の増加が肥厚をもたらす。第 2 に平滑筋細胞の中膜から内膜への migration が 1-4 週間内に発生する。さらに急速に内膜、中膜肥厚を引き起こすものの細胞数の更なる増加は認めず、cell migration, hypertrophy, extracellular matrix の産生などの結果、むしろ細胞密度は減少する。最後のプロセスでは 4-39 週の間には、緩慢に平滑筋細胞が増殖し、内膜、中膜肥厚が緩慢に進行する。しかし細胞数の増加はなく、細胞密度の変化は認めないとされている。

PGE₁ を臨床的に投与し、バイパスグラフトにおける内膜、中膜肥厚抑制効果を期待する場合、自家静脈バイパス移植術後初期の 1-4 週間の PGE₁ 投与は、上記第 1 から第 2 プロセスにあたり、この段階で PGE₁ 投与によって内膜、中膜肥厚を抑制することで、長期グラフト開存率の開存を期待することができると考えられる。今回イヌ動物実験モデルにおいて、周術期の PGE₁ 投与にて、バイパス移植された自家静脈における内膜、中膜肥厚が有意に抑制された。

また、血管平滑筋細胞 (VSMC) は伸長や短縮することで血管の収縮を担っているが、血管に異常が起こったとき、例えば動脈硬化の発症や血管内カテーテル治療後の再狭窄病変の新生内膜形成時には、VSMC は正常時と異なる性質を示し、環境によって異なるフェノタイプを示すことから、VSMC の形質転換と呼ばれている。自家静脈グラフトにおいても平滑筋細胞の形質転換に伴いプロスタノイド受容体の発現が変化することが予想され、PGE₁ が differentiated VSMCs から dedifferentiated VSMCs への細胞形質転換に作用している可能性があるかと推測される。

【結語】イヌを用いた自家静脈移植モデルにおいて、PGE₁ 静脈内持続投与にてバイパス移植された自家静脈の内膜、中膜肥厚が有意に抑制され、また PCNA 免疫染色において細胞増殖の抑制が確認された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 加 藤 絃 之
副 査 教 授 北 島 顕

学 位 論 文 題 名

プロスタグランدينE₁による

自家静脈グラフト内膜肥厚の抑制効果に関する研究

本研究の目的は、大動物実験モデルを用いて自家静脈移植モデルを作成し、PGE₁の内膜肥厚に対する抑制効果の検討、およびその作用機転から臨床応用への展望をはかることである。

ビーグル犬を用い、外頸静脈グラフトによる頸動脈グラフト置換した実験モデルを用いた。薬剤投与 (PGE₁ 0.5 μ g/kg/min) には動物実験用浸透圧ポンプを使用し、グラフト移植後 1 週目(PGE₁ 1w)および 4 週目(PGE₁ 4w)に犠牲死させ、以下の検討を行った。同様のグラフト移植を行なった PGE₁ 非投与群を対照群とした。病理組織学的検討は内膜および中膜肥厚の計測評価を Hematoxylin-Eosin 染色標本にて、MCID Image Analysis System(Imaging research inc., Ontario, Canada)を用いて行った。また免疫染色にて PCNA 陽性細胞の割合を計測。 α -actin, desmin 免疫染色陽性、陰性領域の割合を測定した。データは平均値 \pm 標準偏差で示し、2 群間の比較は t 検定を行った。p<0.05 をもって統計学的有意差と判定した。

グラフト開存率は、コントロール群 (Control 1w, Control 4w) および薬剤投与群 (PGE₁ 1w, PGE₁ 4w) とともに 100%であった。PGE₁ 投与群では、1 週間目(PGE₁ 1w) および 4 週目(PGE₁ 4w)では各コントロール群と比較して有意に低値を示し、内膜、中膜肥厚抑制効果が認められた (305.42 \pm 63.52 vs 366.01 \pm 52.31;P<0.0001) (381.79 \pm 31.55 vs 628.09 \pm 60.85;p<0.0001)。PCNA 免疫染色では、PGE₁ 投与群では、移植後 1 週間目での PCNA 陽性細胞数が有意に減少した (8.02 \pm 1.91 vs 3.56 \pm 1.11;p<0.0001)。移植後 4 週間目における両群間に有意差は認められなかった。移植手術後 1 週間の免疫染色では、PGE₁ 投与群で内膜、中膜領域で α -actin(-), desmin(-)領域が少ない傾向が見られたが統計学的に有意差は認めなかった。

自家静脈グラフト移植後遠隔期の狭窄および閉塞の主たる原因は内膜肥厚によるものと考えられ、そのメカニズムには移植後 1 から 4 週間以上の経過を経て起こる血管内膜障害に対する炎症性反応や extracellular matrix のリモデリング、平滑筋細胞の migration や hyperplasia, hypertrophy などが関係する。その過程は、移植後 1 週間までの早期に中膜層に発生した平滑筋細胞の proliferation による細胞数の増加による肥厚、第 2 に 1-4 週間内に発生する平滑筋細胞の中膜から内膜へ

の migration がおこる。しかし、急速に内膜、中膜肥厚を引き起こすものの細胞数は増加せず、cell migration, hypertrophy, extracellular matrix の産生などの結果、むしろ細胞密度は減少する。4-39 週間の最後のプロセスでは、緩慢に平滑筋細胞が増殖し内膜、中膜肥厚が緩慢に進行するが細胞数の増加はなく、細胞密度の変化はないとされている。PGE₁ を臨床的に投与し、バイパスグラフトにおける内膜、中膜肥厚抑制効果を期待する場合、自家静脈バイパス移植術後初期の 1-4 週間の PGE₁ 投与は、上記第 1 から第 2 プロセスにあたり、この段階で PGE₁ 投与によって内膜、中膜肥厚を抑制することで、長期グラフト開存率の向上を期待することができると考えられる。今回イヌ動物実験モデルにおいて、周術期の PGE₁ 投与にて、バイパス移植された自家静脈における内膜、中膜肥厚が有意に抑制された。血管平滑筋細胞 (VSMC) は伸長や短縮することで血管の収縮を担っているが、動脈硬化の発症や血管内カテーテル治療後の再狭窄病変の新生内膜形成時等、血管に異常が起こったとき形質転換することが知られている。自家静脈グラフトにおいても平滑筋細胞の形質転換に伴いプロスタノイド受容体の発現が変化することが予想され、PGE₁ が differentiated VSMCs から dedifferentiated VSMCs への細胞形質転換に作用していることが推測されている。本実験で得られたように PGE₁ 静脈内持続投与によって自家静脈移植グラフトの内膜、中膜肥厚抑制効果がみられ、PCNA 免疫染色において細胞増殖の抑制が確認された。これらの事実は PGE₁ が血管平滑筋の細胞形質転換に作用し、PGE₁ 投与はバイパス移植後 1-4 週間が有効と考察された。

公開発表に際して、副査の加藤教授から、今回の実験に想定される臨床上の病態とイヌ実験モデルの妥当性、北島教授から、バイパスグラフト素材として動脈と自家静脈グラフトにおける内膜肥厚病態の違い、主査の安田教授より本実験の臨床応用への可能性について等の質問があった。これらの質問に対し、申請者は自らの実験結果や、この分野に関する文献などを引用し、誠実にかつ概ね妥当な回答をなし得た。

この研究は、PGE₁ 投与によりバイパス移植された自家静脈の内膜および中膜肥厚の抑制と細胞増殖抑制をもたらすことを確認し、血管リモデリングにおける平滑筋細胞の形質転換メカニズムにおける PGE₁ の果たす役割解明に貢献し、自家静脈グラフトを用いたバイパス手術成績向上に寄与しうるものと評価される。審査員一同は、申請者の学識に合わせて、関連領域研究と臨床成績の進展に成果があることを評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに資格を有するものと判定した。