

Impact of Perindopril for Decreasing Intimal/Medial Cell Proliferation in an Animal Model

(Perindopril による犬静脈グラフトにおける新生内膜過形成の抑制)

学位論文内容の要旨

目的

腎臓におけるレニン生産機序とは異なり、局所あるいは組織 renin-angiotensin システム (RAS) は、多くの末梢動脈および静脈に存在し、内膜損傷後の増殖反応の制御に必要不可欠な役割を演ずる。組織 RAS は、静脈グラフトにおいて修飾を受け、内膜過形成に関与していると考えられている。本研究の目的は、イヌ頸動脈への自家静脈移植モデルを用い、長時間作用性の ACE 阻害薬 (ACEI) である perindopril による内膜・中膜過形成の予防効果明らかにすることにある。

材料と方法

実験は 10kg 前後のビーグル成犬 14 匹を使用し、perindopril (P) 群 (8 匹) と対照 (C) 群 (6 匹) に分け、両側総頸動脈を切除し同側外頸静脈を用いて置換した。perindopril 群は、術前 1 週間より術後を通じて 0.3mg/kg/day の perindopril を投与し、術後第 1、4 週に各々 4 匹ずつ静脈グラフトを摘出した。対照群も同様に 3 匹ずつ静脈グラフトを摘出した。正常頸静脈標本は対照群の 3 匹のイヌから採取した。各イヌからそれぞれ 2 個の標本を採取した。従って摘出標本は P 群 16 個、C 群では 12 個、正常静脈標本は 6 個採取した。摘出標本はホルマリンで 48-72 時間固定後、HE 染色し、内膜・中膜の厚さを計測した。さらに内膜・中膜における proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 陽性細胞、TUNEL 法によるアポトーシス陽性細胞の検討も行った。P 群 (術後第 1、4 週)、C 群 (術後第 1、4 週)、正常静脈群の 5 群間で統計処理を行い比較検討した。

結果

実験動物に死亡や重篤な合併症はなく、全て計画通りに犠牲死させえた。術後第 1、4 週の内膜・中膜厚は、perindopril 群で各々 $251.39 \pm 52.99 \mu\text{m}$ 、 $292.55 \pm 35.98 \mu\text{m}$ で、対照群の $366.01 \pm 63.52 \mu\text{m}$ 、 $628.09 \pm 31.55 \mu\text{m}$ と比較し有意に薄かった。正常頸静脈にはわ

ずかな細胞増殖を認めるのみであった。術後第1,4週のPCNA陽性細胞の率はperindopril群で各々 9.50 ± 3.46 、 14.50 ± 2.07 で、対照群の 24.83 ± 3.65 、 35.50 ± 3.08 と比較し有意に少なかった。正常頸静脈の内膜・中膜にはTUNEL陽性細胞は検出されなかった。術後第1週に、TUNEL陽性細胞は対照群と比較しperindopril群で有意に増加し(57.50 ± 15.14 対 26 ± 30.80)、この差は術後第4週でも有意だった(72.12 ± 42.69 対 36.66 ± 23.46)。

考察およびまとめ

本研究は、perindoprilによるACEの慢性的な抑制が移植静脈グラフトの内膜・中膜過形成を有意に抑制することを示した。今回使用されたperindopril使用量(0.3mg/kg/日)は人間における使用量と同等である。Cilazaprilやcaptoprilでは同様の効果を得るのに10mg/kgを要し、perindoprilは新生内膜増殖抑制効果が最も強力であるといえる。しかし、ネズミ、ウサギ、モルモットやヒヒでは同様の結果は得られず、cilazaprilを用いた臨床試験ではむしろ逆の結果が得られた(MERCATORとMARCATOR)。今回の実験結果と臨床研究で違いの生ずる理由は、薬物の開始時期、ターゲットポイントの相違にあると思われる。Angiotensin II生成経路には動物種による違いがあり、われわれは本研究において犬のモデルを選んだ。ネズミ血管組織は唯一のangiotensin II生成酵素としてACEを含むのに対し、人間、猿とイヌの血管組織はACEに加えてchymaseを含むからである。薬物投与時期に関しては、最大効果を得るには損傷1週間前に開始すべきとされ、われわれも術前1週間より投与を開始し、術後も投与を続けた。ACEは血管内皮に主に存在し、そこがACEsが局所RASを抑制する主な標的となっており、perindoprilは効果的に血管壁を通して、内皮や外膜においてACEを抑制する。ウサギでは、血圧を十分下げ、血漿中ACE活性を完全に抑制する最大限可能な量のcilazaprilは内皮損傷への血管反応を予防しなかった。しかしネズミでは新生内膜形成予防に必要なcilazapril量は降圧に必要な量よりも多かった。これらに比べ、0.3mg/kg/dayのperindoprilはわれわれの犬モデルにおいて血管損傷後の内膜・中膜増殖を有意に抑制し、毒性も示さなかった。Angiotensin IIによって誘導される新生内膜過形成のメカニズムは平滑筋細胞において調べられてきた。Angiotensin IIが誘発する発ガン前駆遺伝子であるc-fos、c-junとc-mycや、内因性発育因子である血小板由来成長因子、線維芽細胞発育因子、transforming growth factor- β などがangiotensin II由来の新生内膜過形成に関与していると示唆されている。従って、ACEの抑制が新生内膜過形成の抑制に関与した事実より、perindoprilが異なる血管層におけるangiotensin Iからangiotensin IIへの転換をブロックすることにより、angiotensin IIによる新生内膜増殖とマトリックス・タンパク質合成を抑制し、損傷への血管反応を抑制すると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 吉 岡 充 弘
副 査 教 授 筒 井 裕 之

学 位 論 文 題 名

Impact of Perindopril for Decreasing Intimal/Medial Cell Proliferation in an Animal Model

(Perindopril による犬静脈グラフトにおける新生内膜過形成の抑制)

局所あるいは組織 renin-angiotensin システム (RAS) は、多くの末梢動脈および静脈に存在し、内膜損傷後の増殖反応の制御に必要な不可欠な役割を演ずる。組織 RAS は、静脈グラフトにおいて修飾を受け、内膜過形成に関与していると考えられている。本研究の目的は、イヌ頸動脈への自家静脈移植モデルを用い、長時間作用性の ACE 阻害薬 (ACEI) である perindopril による内膜・中膜過形成の予防効果明らかにすることにある。10kg 前後のビーグル成犬を使用し、perindopril (P) 群と対照 (C) 群に分け、両側総頸動脈を切除し同側外頸静脈を用いて置換した。perindopril 群は、術前 1 週間より術後を通じて 0.3mg/kg/day の perindopril を投与し、術後第 1、4 週に各々 4 匹ずつ静脈グラフトを摘出した。対照群も同様に 3 匹ずつ静脈グラフトを摘出した。正常頸静脈標本は対照群の 3 匹のイヌから採取した。各イヌからそれぞれ 2 個の標本を採取した。従って摘出標本は P 群 16 個、C 群では 12 個、正常静脈標本は 6 個採取した。摘出標本はホルマリンで 48-72 時間固定後、HE 染色し、内膜・中膜の厚さを計測した。さらに内膜・中膜における proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 陽性細胞、TUNEL 法によるアポトーシス陽性細胞の検討も行った。P 群、C 群、正常静脈群の 5 群間で統計処理を行い比較検討した。実験動物に死亡や重篤な合併症はなく、全て計画通りに犠牲死させた。術後第 1、4 週の内膜・中膜厚は、perindopril 群で各々 $251.39 \pm 52.99 \mu\text{m}$ 、 $292.55 \pm 35.98 \mu\text{m}$ で、対照群の $366.01 \pm 63.52 \mu\text{m}$ 、 $628.09 \pm 31.55 \mu\text{m}$ と比較し有意に薄かった。正常頸静脈にはわずかな細胞増殖を認めるのみであった。術後第 1、4 週の PCNA 陽性細胞の率は perindopril 群で各々 9.50 ± 3.46 、 14.50 ± 2.07 で、対照群の 24.83 ± 3.65 、 35.50 ± 3.08 と比較し有意に少なかった。正常頸静脈の内膜・中膜には TUNEL 陽性細胞は検出されなかった。術後第 1 週に、TUNEL 陽性細胞は対照群と比較し perindopril 群で術後第 4 週まで有意に増加していた。

本研究は、perindopril による ACE の慢性的な抑制が移植静脈グラフトの内膜・中膜過形成を抑制することを示した。今回使用された perindopril 使用量は人間における使用量と同等である。

Cilazapril や captopril では同様の効果を得るのに 10mg/kg を要し、perindopril は新生内膜増殖抑制効果が最も強力であるといえる。しかし、ネズミ、ウサギ、モルモットやヒヒでは同様の結果は得られず、cilazapril を用いた臨床治験ではむしろ逆の結果が得られた (MERCATOR と MARCATOR)。今回の実験結果と臨床研究で違いの生ずる理由は、薬物の開始時期、ターゲットポイントの相違にあると思われる。Angiotensin II 生成経路には動物種による違いがあり、われわれは本研究において犬のモデルを選んだ。ネズミ血管組織は唯一の angiotensin II 生成酵素として ACE を含むのに対し、人間、猿とイヌの血管組織は ACE に加えて chymase を含むからである。薬物投与時期に関しては、最大効果を得るには損傷 1 週間前に開始すべきとされ、われわれも術前 1 週間より投与を開始し、術後も投与を続けた。ACE は血管内皮に主に存在し、そこが ACEIs が局所 RAS を抑制する主な標的となっており、perindopril は効果的に血管壁を通して、内皮や外膜において ACE を抑制する。ウサギでは、血圧を十分下げ、血漿中 ACE 活性を完全に抑制する最大限可能な量の cilazapril は内皮損傷への血管反応を予防しなかった。しかしネズミでは新生内膜形成予防に必要な cilazapril 量は降圧に必要な量よりも多かった。これらに比べ、0.3mg/kg/day の perindopril はわれわれの犬モデルにおいて血管損傷後の内膜・中膜増殖を有意に抑制し、毒性も示さなかった。Angiotensin II によって誘導される新生内膜過形成のメカニズムは平滑筋細胞において調べられてきた。Angiotensin II が誘発する発ガン前駆遺伝子である c-fos、c-jun と c-myc や、内因性発育因子である血小板由来成長因子、線維芽細胞発育因子、transforming growth factor- β などが angiotensin II 由来の新生内膜過形成に関与していると示唆されている。従って、ACE の抑制が新生内膜過形成の抑制に関与した事実より、perindopril が異なる血管層における angiotensin I から angiotensin II への転換をブロックすることにより、angiotensin II による新生内膜増殖とマトリックス・タンパク質合成を抑制し、損傷への血管反応を抑制すると考えられた。

学位論文の公開発表に際し、副査の筒井教授からは血圧測定の有無、perindopril の投与量、perindopril が apoptosis を誘導する機序について、副査の吉岡教授からは perindopril を選択した理由、perindopril の術後投与開始について、ACE より AT-I receptor を抑制した方が良いか、主査の安田教授から実験動物として犬を選択した理由などについて質問があった。申請者は豊富な実験結果と蓄積された学識をもって、文献的考察も交えて誠実かつ概ね適切に回答し得た。

本研究は犬のモデルにおいて perindopril による ACE の慢性的な抑制が移植静脈グラフトの内膜・中膜過形成を有意に減らすことを初めて明らかにし、晩期グラフト狭窄/閉塞防止への臨床応用に重要な示唆を与えるものと評価できる。

審査員一同は、申請者の豊富な学識に併せて、この研究が関連領域研究の進展に与える成果を評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。