

博士論文

抗炎症性脂質メディエータ Resolvin D1 と Protectin D1
isomer を用いたラット頸動脈擦過内膜肥厚モデルに対する
治療効果の検討

牧野 能久

目次

略語一覧	P.5
要旨	P.8
序文	
動脈硬化の炎症反応仮説、内膜肥厚による術後再狭窄の問題	P.10
内膜肥厚に対する従来の治療とその限界	P.13
炎症反応の経過と抗炎症性脂質メディエータの抗炎症作用	P.14
抗炎症性脂質メディエータを用いた先行研究例	P.18
Resolvin D 群について	P.20
Resolvin の血中動態に関する先行研究	P.23
Resolvin D1 と受容体の相互作用	P.26
Resolvin D1 の血管平滑筋細胞への細胞毒性	P.30
Protectin D1 及び Protectin D1 isomer について	P.32
炎症性転写因子 NF κ B と内膜肥厚の関係	P.35
抗炎症性脂質メディエータと内膜肥厚に関する先行研究	P.38
本研究の目的	P.40
本研究の実験概要	P.41

実験

動物モデルの作製	P.43
ラット頸動脈バルーン擦過モデルの経過	P.46
SPM の投与	P.48
検体の摘出	P.50

評価

免疫染色	P.52
炎症性転写因子 NF κ B 活性の評価	P.54
新生内膜増殖の評価	P.56
統計解析	P.56

結果

バルーン傷害した左総頸動脈における炎症性細胞浸潤の抑制	P.58
バルーン傷害した左総頸動脈の中膜における細胞分裂・増殖の抑制	P.62
バルーン傷害した左総頸動脈における炎症性転写因子 NF κ B 発現 の抑制	P.64
バルーン傷害による新生内膜増殖の抑制	P.66

<u>考察</u>	P.69
<u>結論</u>	P.75
<u>謝辭</u>	P.76
<u>参考文献</u>	P.77

略語一覧

ASO : arteriosclerosis obliterans

CABG : coronary artery bypass grafting

CLI : critical limb ischemia

DES : drug eluting stent、薬剤溶出性ステント

DHA : docosahexaenoic acid、ドコサヘキサエン酸

DPA : docosapentaenoic acid、ドコサペンタエン酸

EC₅₀ : 50%効果濃度

ECIS : electric cell-substrate impedance sensing

ECM : extracellular matrix、細胞外基質

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

EPA : eicosapentaenoic acid、エイコサペンタエン酸

GPCR : G protein-coupled receptor、G 蛋白質共役受容体

GST : glutathion S-transferase

HDHA : hydroxydocosahexaenoic acid

HE : Hematoxylin Eosin

IC₅₀ : inhibitory concentration for 50% effect

ICAM-1 : intracellular adhesion molecule-1

IKK : I κ B キナーゼ

IL : interleukin

LO : lipoxygenase

MCP-1 : monocyte chemotactic protein- 1

MnSOD : manganese superoxide dismutase

MPO : myeloperoxidase

NF κ B : nuclear factor-kappa B

NI : neointima、新生内膜

NI/M 比 : neointima/media 比

NPD1 : neuroprotectin D1

M : media、中膜

NOX : NADPH oxidase

PCI : percutaneous coronary intervention

PD : protectin D

PDGF : platelet-derived growth factor

RLU : relative luminescence units

ROS : reactive oxygen species

RvD : resolvin D

SMC : smooth muscle cell

SPM : specialized proresolving mediator

TNF- α : tumor necrosis factor - α

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1

抗炎症性脂質メディエータ Resolvin D1 と Protectin D1 isomer を用いたラット頸動脈擦過内膜肥厚モデルに対する治療効果の検討

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻 血管外科

指導教官 石原 聡一郎教授

牧野能久

要旨

動脈硬化性疾患に対する外科的治療法として balloon 拡張術や血栓内膜摘除術、バイパス手術などがある。今回、外科的治療後の予後不良因子の原因である再狭窄を予防するため、内膜肥厚モデルであるラット頸動脈擦過モデルに対し抗炎症性脂質メディエータである Resolvin D1 (RvD1)・Protectin D1 isomer (PD1 iso)を経静脈的に全身投与することで炎症性細胞の遊走が抑制され、炎症性転写因子 nuclear factor-kappa B (NFκB)の発現が抑制され、内膜肥厚が抑制されることを示した。ラット頸動脈擦過モデルにおいて、抗炎症性脂質メディエータを経静脈的に投与し内膜肥厚抑制効果を示したことと、Protectin series の内膜肥厚抑制効果を示したのは新たな知見

である。また今回、静脈内投与という比較的簡便な薬剤投与方法で内膜肥厚を抑制したことは、再狭窄の予防的治療に応用可能と考える。

序文

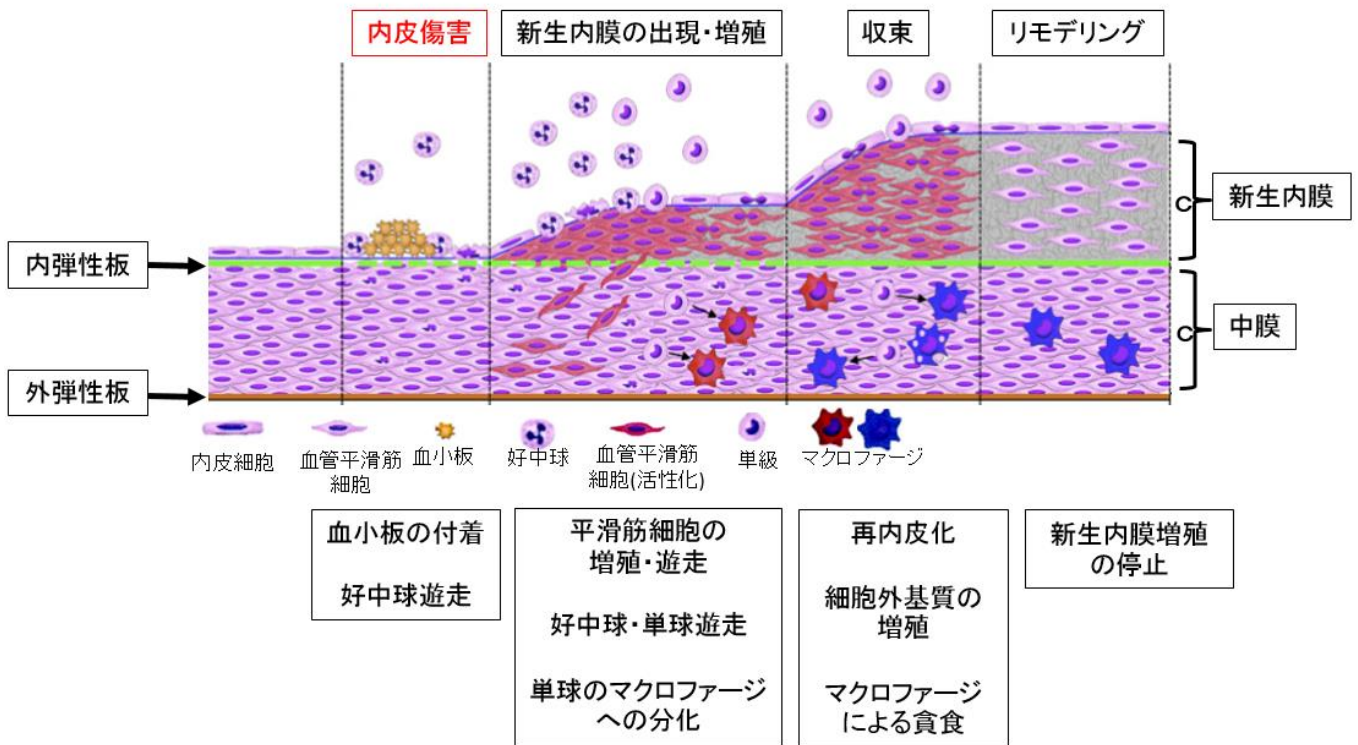
動脈硬化の炎症反応仮説、内膜肥厚による術後再狭窄の問題

現在、脳血管疾患・冠動脈疾患・末梢動脈疾患などの動脈硬化性疾患は欧米諸国における死亡原因のトップであり、本邦においても食習慣の欧米化とともに増加し、悪性新生物に次ぐ2位となっている。(1,2,3)その原因となるアテローム性動脈硬化症(atherosclerosis)の発生機序に関して諸説あったが、現在、傷害反応説に集約されている(4)。

傷害反応説では①血管内皮傷害によりサイトカイン・増殖因子が産生され、②好中球やTリンパ球の傷害部位への遊走や③血管平滑筋細胞の増殖と内腔への遊走、④マクロファージの集積・貪食と泡沫細胞(foam cell)形成が起こり、⑤内膜肥厚が形成されることが動脈硬化病変の主なメカニズムとされており、好中球などの炎症性細胞浸潤を伴う動脈壁のいわゆる炎症反応と考えられている(4)。治療方法としては薬物療法が第一選択となることが基本だが(5)、進行するとバルーンやステントを用いた血管内治療やバイパス手術や血栓内膜摘除術などの外科手術が必要となる。具体的には冠動脈の動脈硬化病変である狭心症・急性心筋梗塞に対する経皮的冠動脈形成術

(percutaneous coronary intervention: PCI) (6)や冠動脈バイパス移植術(coronary artery bypass grafting: CABG) (7)、また末梢血管の動脈硬化病変である閉塞性動脈硬化症(arteriosclerosis obliterans: ASO)・重症下肢虚血(critical limb ischemia: CLI) に対する血栓内膜摘除術や経皮的血管形成術(percutaneous transluminal angioplasty: PTA)、下肢バイパス手術などが挙げられる(8)。ただし、これらの治療効果の永続性を阻害する因子の主要なものとして、術後に起きる内膜肥厚(intimal hyperplasia) による再狭窄があり、再燃要因となる(9)。

上記の傷害反応仮説による内膜肥厚の発生メカニズムであるが、内皮細胞の傷害・剥皮に伴い血小板凝集が惹起されることにより開始される(10)。血小板由来増殖因子(platelet derived growth factor: PDGF) などの増殖因子により中膜における平滑筋細胞(smooth muscle cell: SMC) が局所で増殖し、更に内弾性板を超えて内膜側に遊走し新生内膜(neointima) を形成する(11)。これに細胞外基質(extracellular matrix: ECM) の沈着が加わり、内膜肥厚が形成され、狭窄の原因となる(図 1)。



(参考文献 12 より改変)

図 1 内皮傷害後の内膜肥厚発生のメカニズム

内皮傷害後、血小板の付着と好中球の遊走が出現する。血小板などで PDGF などの増殖因子が産生され中膜平滑筋細胞の一部が活性化し増殖、内腔に遊走し新生内膜を形成する。その後、新生内膜の増殖は平滑筋細胞の増殖と細胞外基質の沈着により進行するが、再内皮化の進行とともに収束する。

内膜肥厚に対する従来の治療とその限界

現在、動脈狭窄に対する治療は冠動脈疾患でも閉塞性動脈硬化症に代表される末梢動脈疾患でも薬物療法が基本である(6-8)が、狭窄が進行すると血管内治療やバイパス手術、血栓内膜摘除術などの外科的治療が必要となる。また治療後の術後再狭窄は長期開存を妨げる重要な要因となっている。これに対し薬剤溶出性ステント(drug eluting stent: DES)が1990年代後半より実用化されているが(13)、安全に全身投与可能な薬剤で同様の内膜肥厚抑制効果を示すものは少ない。

今回、内膜肥厚モデルを使用し、薬物の全身投与により局所の新生内膜増殖を抑制可能であるか、検討することとした。

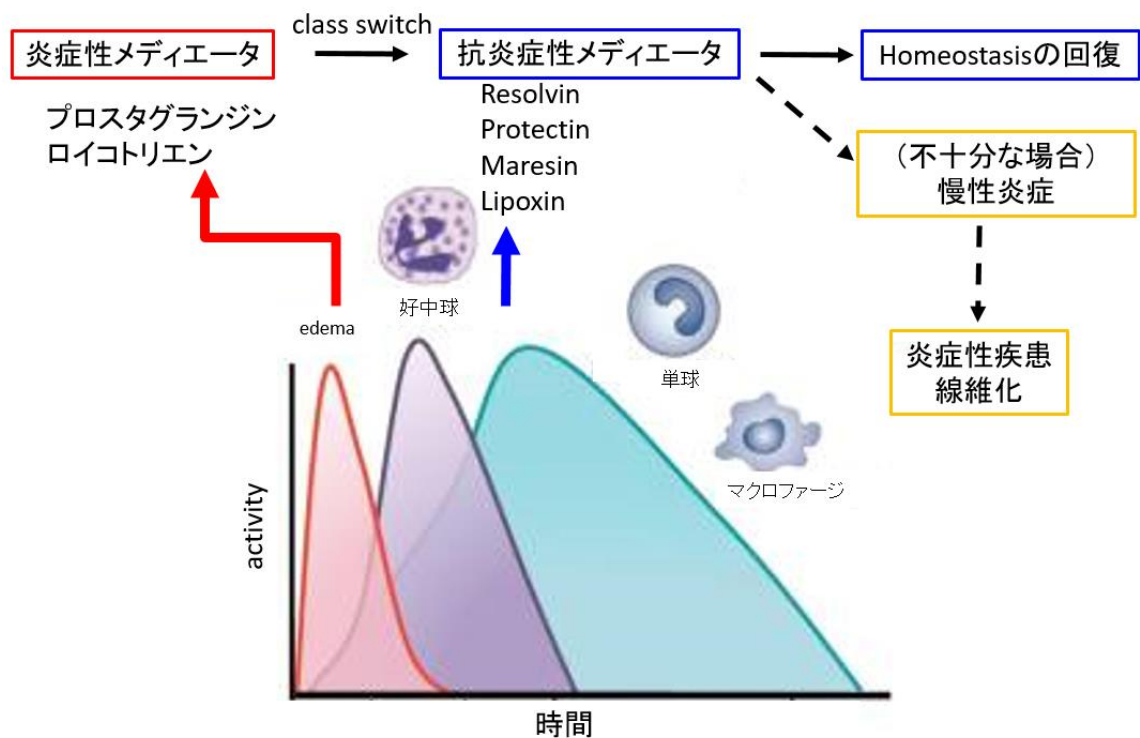
炎症反応の経過と抗炎症性脂質メディエータの抗炎症作用

脂質メディエータは刺激に応じて細胞膜のリン脂質より産生され、近傍細胞の特異的受容体である G タンパク質共役型受容体(GPCR) に作用して細胞間の情報伝達を行っている autacoid であるが(14)、炎症反応の惹起に関与しているもの（炎症性メディエータ）や収束に関与しているもの（抗炎症性メディエータ）が存在する(14,15)。

急性炎症反応では、炎症反応が惹起される段階においてアラキドン酸カスケードを介してプロスタグランジンやロイコトリエンに代表される炎症性メディエータが産生され、最初に血管壁からの漏出が出現し、好中球が組織内に遊走する。その後、数時間～数日で単球やマクロファージを中心とした白血球の遊走により炎症性メディエータの産生は増大する(16)。これまで炎症反応は、これらの炎症性メディエータの産生が減少することにより自然と軽快に向かうと考えられてきたが、近年炎症性メディエータから抗炎症性メディエータ(specialized proresolving mediator : SPM)へ切り替わる(class switch)ことにより、能動的に収束に向かうと考えられるようになっている(17-19)。その過程で好中球は減少し、マクロファージも非炎症性マクロファージとなって efferocytosis を行うことにより

homeostasis への回復を促進する(16)。一方、炎症反応が適切に収束しなかった場合、炎症反応が持続し、いわゆる線維化・炎症性疾患に至ると考えられている(図 2)。

現在、抗炎症性脂質メディエータとしてはドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid: DHA) 、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸(eicosapentaenoic acid: EPA)より産生される Lipoxin、Resolvin、Protectin、Maresin の 4 種が発見されている(19)。ドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid: DHA) から産生されるものには Resolvin D series(D1~6)、Protectin(D1、D1 isomer)、Maresin(1,2) があり(図 3)、アラキドン酸から産生されるものには Lipoxin(A4、B4)が、またエイコサペンタエン酸(eicosapentaenoic acid: EPA) から産生されるものには Resolvin E series(E1~3)がある。



(参考文献 16 より改変)

図 2 炎症反応の経過

血管の透過性が亢進し、最初に好中球が組織内へ遊走する。その後、炎症性メディエータ産生の亢進と共に単球も遊走するが、徐々に炎症性メディエータは抗炎症性メディエータに class switch し、炎症反応の収束と homeostasis の回復に向かう。一方、収束が不十分だった場合には慢性炎症や炎症性疾患へと進行する。

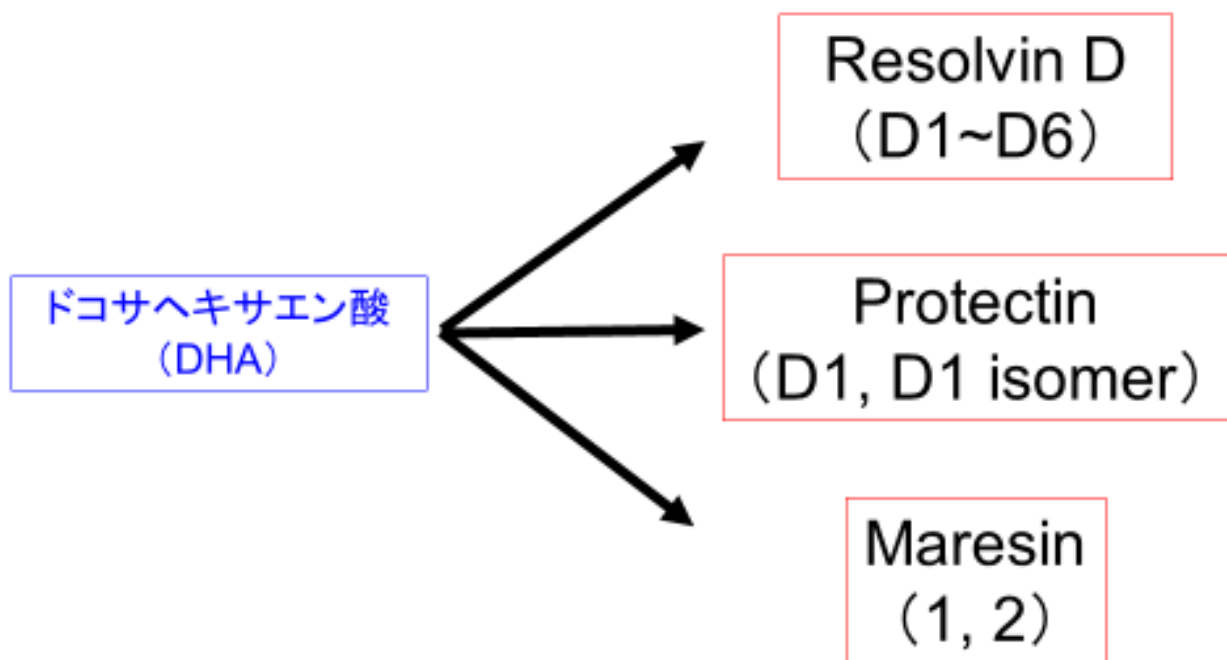


図3 ドコサヘキサエン酸(DHA)由来の各抗炎症性脂質メディエータ(SPM)

ドコサヘキサエン酸から産生される SPM には Resolvin D 群 (D1~D6)と Protectin 群(D1、D1 isomer)、Maresin 群(1、2)がある。

抗炎症性脂質メディエータを用いた先行研究例

近年、ナノモル濃度という低濃度の抗炎症性脂質メディエータが GPCR を介して好中球の遊走や炎症反応を軽快させたとの報告があり注目されている(20)。SPM の抗炎症作用に関して、腹膜炎モデル(21, 22)や腎虚血モデル(23)、炎症性腸疾患モデル(24)、新型インフルエンザを用いたモデル(25)などで効果が検証されている(表 1)。

抗炎症性脂質メディエータを用いた主な先行研究			
動物モデル	使用SPM	主な結果	参考文献
腹膜炎	Resolvin D2	炎症性サイトカインの産生抑制 好中球遊走抑制 単球・マクロファージによる貪食の 活性化	21
腹膜炎	PD1 isomer	炎症性サイトカインの抑制 腹腔内への好中球の遊走抑制 単球・マクロファージの遊走促進 M2マクロファージへの分化促進	22
腎虚血	Resolvin D群 /Protectin D1	白血球の集積を抑制 腎線維化を抑制 腎機能障害の抑制	23
炎症性腸疾患	Resolvin D5 /Protectin D1	虚血による炎症反応の軽減 腸管内皮と好中球の相互作用の抑制	24
インフルエンザ (H5N1)	Protectin D1	インフルエンザウイルスの増殖抑制 肺炎を軽快	25

表 1 抗炎症性脂質メディエータを用いた主な先行研究のまとめ

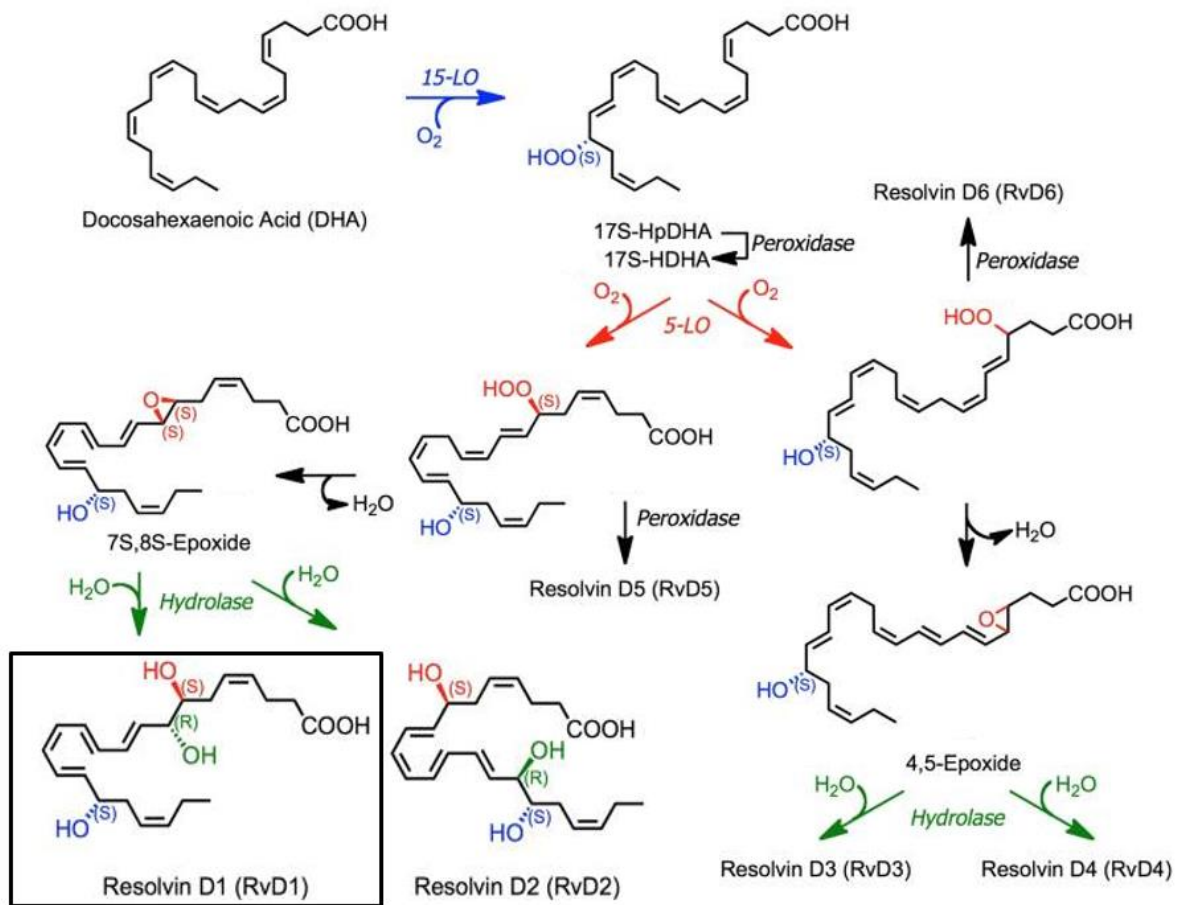
Resolvin D 群について

EPA と並び魚油の主成分である DHA の健康上の利点に関しては以前より認識されていたが、その分子的背景は未解明であった。近年、Resolvin D 群や Protectin 、Maresin などの DHA 由来 SPM の発見により背景の一端が解明されつつある(26)。

Resolvin D 群は DHA 由来の SPM で、resolution phase interaction products より命名された(14)。Resolvin D 群には D1~D6 の 6 種類が同定されており、いずれも DHA から lipoxygenase (LO)による 2 段階の lipoxygenation を経て産生される(16)。DHA は 15-LO により 17S-HpDHA に変化した後、5-LO により 7 位の炭素の過酸化中間物を経て 7S,8S-Epoxye とする。7S,8S-Epoxye の酵素加水分解により RvD1 と RvD2 が、また還元により RvD5 が産生される。一方 17S-HDHA より 5-LO により 4 位の炭素に lipoxygenation を受けた場合、4,5-Epoxye を介して RvD3 と RvD4 が、また peroxidase による還元により RvD6 が産生される(図 4)。

Resolvin D1(7S, 8R, 17S- trihydroxy- 4Z, 9E, 11E, 13Z, 15E, 19Z- docosahexaenoic acid)は DHA から in situ で 7、17 位の酸素化を経て産生され、好中球の遊走抑制・血小板の凝集抑制・接着因

子の発現抑制などの効果が報告されている(26)。



(参考文献 16 より改変)

図 4 DHA から Resolvin D 群の産生経路

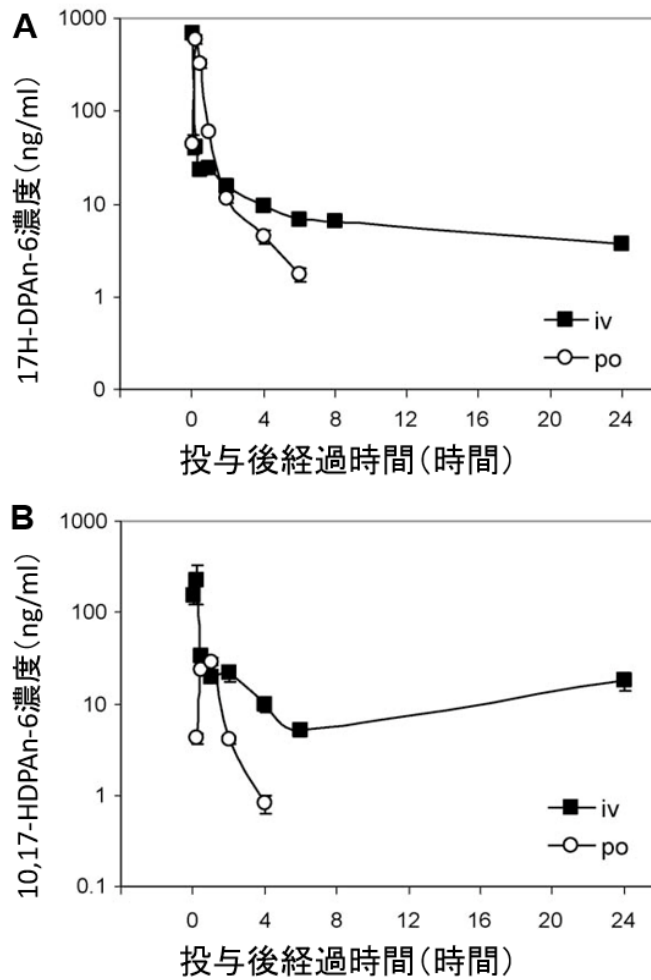
DHA から 15-LO と 5-LO により代謝を受け、Resolvin D1~6 が産生される。Resolvin D1 は 7、17 位の酸素化を経て産生される。

Resolvin の血中動態に関する先行研究

血中動態に関する先行研究において、Resolvin D 群の前駆物質である 17S-HDHA の *in vitro* での肝 microsome 中における半減期は、ラット肝臓由来 microsome 中で 13.6 分、ヒト肝臓由来 microsome 中で 13.0 分と報告されている(27)。

また同先行研究において、DHA 由来 Resolvin に構造的に類似したドコサペンタエン酸(docosapentaenoic acid: DPA)由来の 17S-HDPAn-6 (17S-hydroxydocosa-4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 15E-pentaenoic acid)や 10S,17S-HDPAn-6 (10S,17S-dihydroxydocosa-4Z, 7Z, 11E, 13Z, 15E-pentaenoic acid)も検討されており、ラット肝臓由来ミクロソーム中における半減期はそれぞれ 17.5 分と 110.0 分、ヒト肝臓由来ミクロソーム中における半減期はそれぞれ 25.8 分、266 分で、いずれも DHA 由来 17S- hydroxydocosahexaenoic acid (HDHA) より強い安定性を示したと報告されている。また、本文献中では 17S-HDHA をラットに投与した場合の血中濃度の推移は検証されていないものの、17S-HDPAn-6 や 10S,17S-HDPAn-6 をラットに経口又は静脈内注射した場合の血中濃度はそれぞれ図 5 のように推移

し、ラットにおける半減期はそれぞれ 607 分、799 分であったと報告されている(27)。



(参考文献 27 より改変)

図 5 ドコサペンタエン酸(DPA)由来 Resolvin 類似物質の血中動態

A : ラットに経口(po)と静脈内注射(iv)で 17S-HDPAn-6 を投与したところ、半減期はそれぞれ 607 分であった。

B : ラットに経口(po)と静脈内注射(iv)で 10S,17S-HDPAn-6 を投与したところ、半減期はそれぞれ 799 分であった。

Resolvin D1 と受容体の相互作用

Resolvin D1 の受容体として ALX/FRP2 と GPR32 の 2 種の G protein-coupled receptor(GPCR) が同定(28,29)されている(図 6)。

RvD1 とヒト ALX/FRP2 (hALX/FRP2)受容体とヒト GRP32

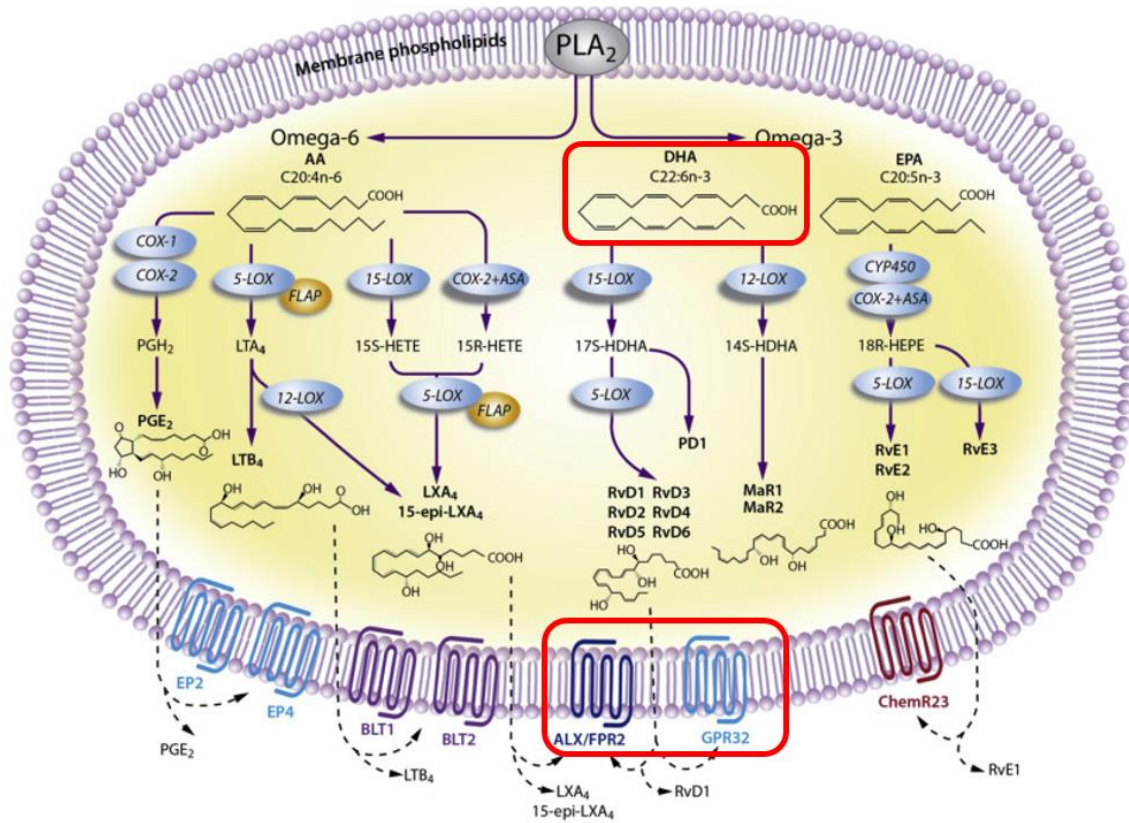
(hGRP32)受容体との相互作用を β -arrestin PathHunter

system(DiscoverRx, Fremont, CA) を使用して 10^{-12} ~ 10^{-7} mol/L の

濃度で行った先行研究では、50%効果濃度(EC_{50})は hALX/FRP2 受容体で 4.5×10^{-11} mol/L、h GRP32 受容体で 3.6×10^{-12} mol/L と報告

されている(28)。一方 DHA と hALX/FRP2 受容体、hGRP32 受容体との EC_{50} はそれぞれ 1.9×10^{-9} mol/L、 2.2×10^{-10} mol/L で、いずれも RvD1 の濃度とは有意差を認めた(図 7)。

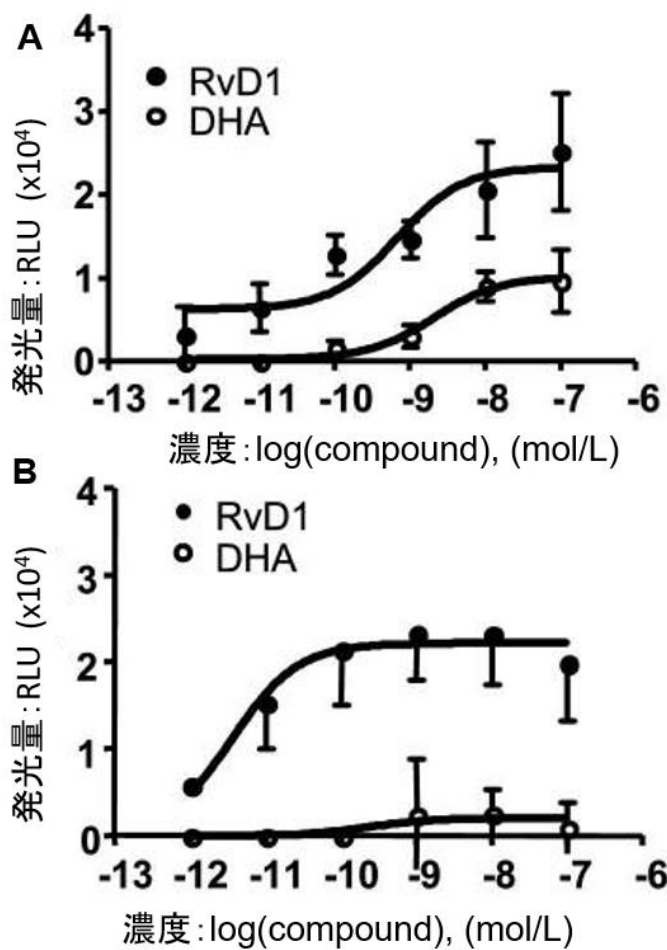
また RvD1 と hGRP32 受容体との結合を electric cell-substrate impedance sensing(ECIS) system(Applied Biophysics, Troy, NY)を用いて 1,10,100nmol/L の各濃度で解析したところ、濃度依存性に impedance が変化したものの、いずれの濃度でも開始 5 分後に変化は最大となり、受容体との結合が peak となったと報告(28)されている(図 8)。



(参考文献 29 より改変)

図 6 RvD1 の受容体

DHA より 15-LO と 5-LO により産生された RvD1 は、細胞膜上の GPCR である ALX/FPR2、GPR32 受容体と反応する。Protectin に関しては、特異的受容体は同定されていない。

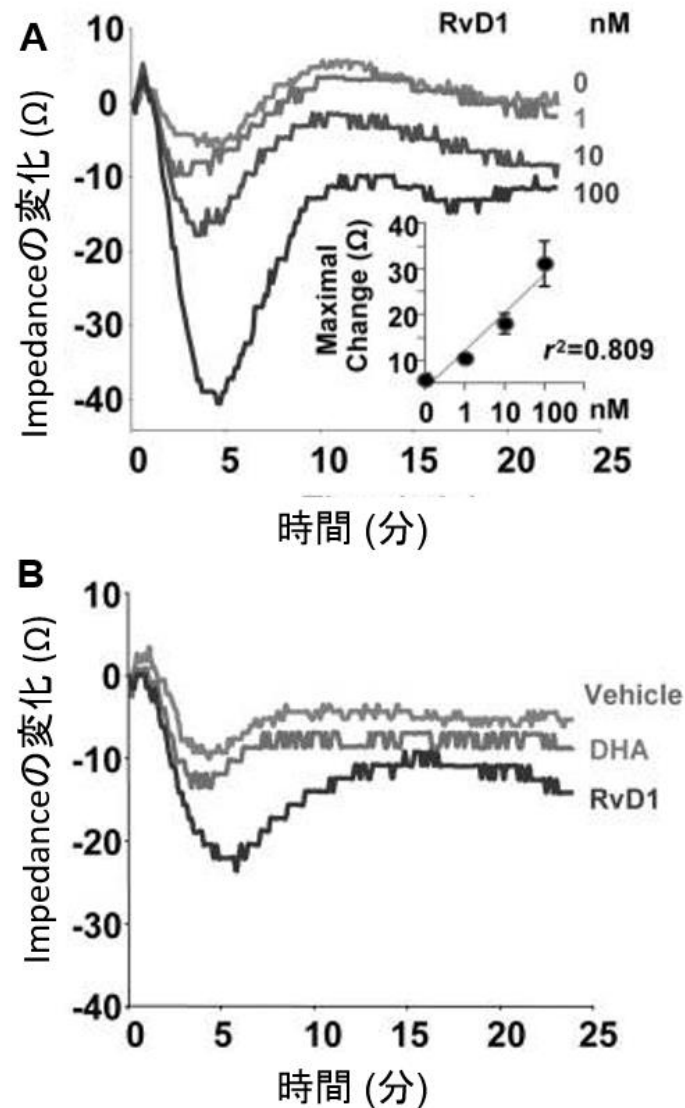


(参考文献 28 より改変)

図7 β-arrestin PathHunter system による RvD1 と hALX/FPR2 受容体、hGPR32 受容体との結合の評価

A : hALX/FPR2 受容体と RvD1 の 50%効果濃度(EC₅₀)は 4.5 x 10⁻¹¹mol/L だった一方、DHA は受容体活性化に有意に高濃度を要した。

B:hGPR32 受容体と RvD1 の EC₅₀は 3.6 x 10⁻¹² mol/L だった一方、DHA は受容体活性化に有意に高濃度を要した。



(参考文献 28 より改変)

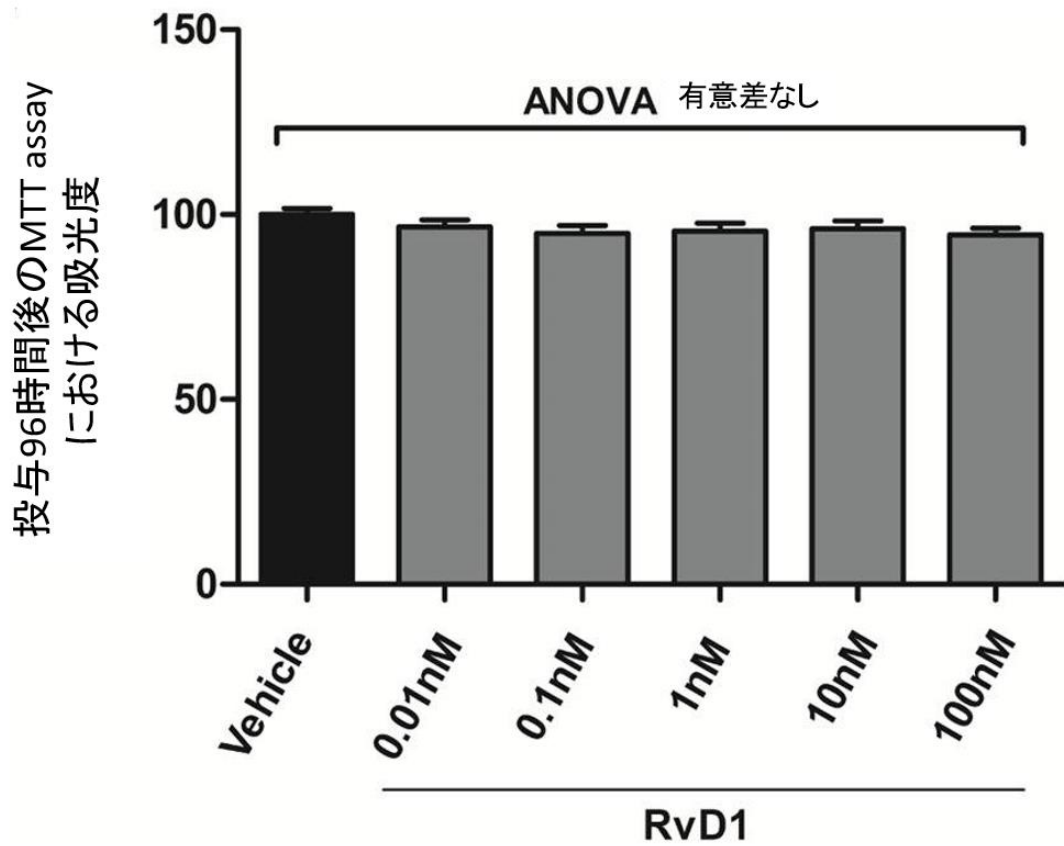
図8 RvD1 と hGPR32 受容体との結合の ECIS system による評価

A : 1~100nM では濃度依存性に impedance の変化は大きくなったが、変化はいずれの濃度でも 5 分後に最大となった。

B:RvD1 は DHA と比較すると有意に impedance の変化が大きかった。

Resolvin D1 の血管平滑筋細胞への細胞毒性

Resolvin D1 の血管平滑筋細胞に対する細胞毒性に関する先行研究では、ラット動脈壁平滑筋細胞を培養し、0.01~100nM の各濃度の RvD1 を投与したところ、動脈平滑筋細胞の増殖は抑制したものの、96 時間後に行った MTT assay では control から 100nM 群まで有意差を認めなかったと報告されている(30)。(図 9)



(参考文献 30 より改変)

図 9 培養ラット動脈壁平滑筋細胞を用いた MTT assay

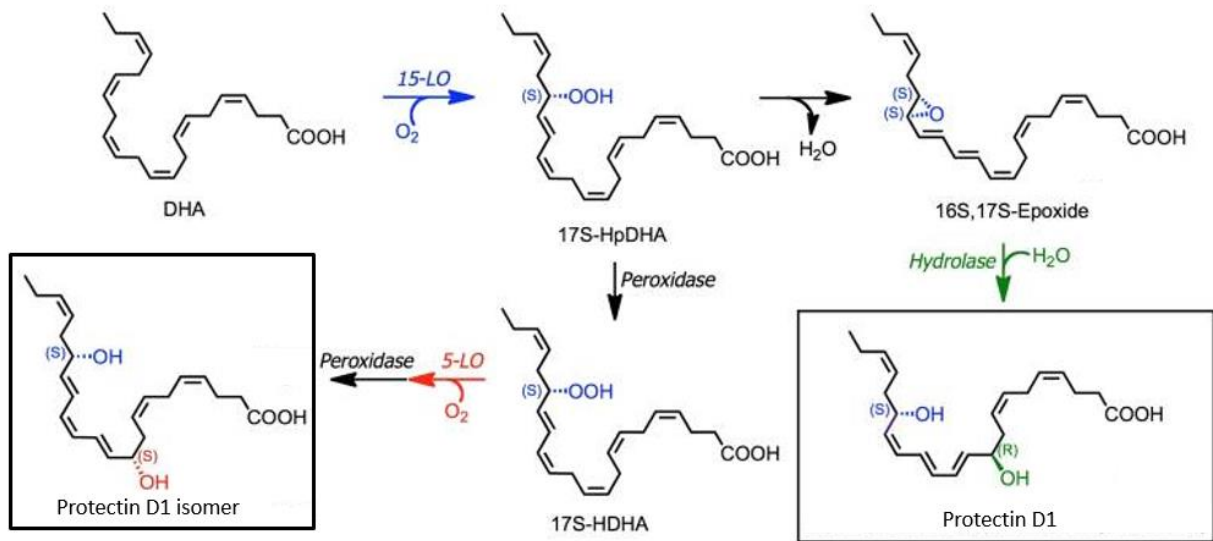
0.01~100nM の各濃度の RvD1 に 96 時間曝露し行った MTT assay では、いずれの濃度でも control と比較して有意差を認めなかった。

Protectin D1 及び Protectin D1 isomer について

Protectin D1 は 2004 年に脳虚血・再灌流に対する神経保護作用や、網膜色素細胞の抗酸化作用を持つ DHA 由来の 10R,17S-docosatriene として発見され、neuroprotective/inactivate proapoptotic signaling / DHA 由来より neuroprotectin D1(NPD1) として命名された(31)。当初、神経系で産生されたためこの名が付けられたが、後に神経系以外でも産生されることが発見され Protectin D1 と呼ばれる(32)。

DHA が 15-LO により 17S-HpDHA に変化し、Epoxide 中間体である 16S,17S-Epoxide を経て cis, trans, trans の二重結合と 10 位の炭素に R 配置を持つものが PD1(10R,17S-dihydroxy-docosa-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z-hexaenoic acid(16))となる。一方でその光学異性体である PD-1 isomer (10S, 17S-diHDHA) は 17S-HDHA を介して産生され、構造は 10S,17S-dihydroxy-docosa-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-hexaenoic acid と報告されている(33)。現段階では PD1、PD1 isomer とともに特異的な受容体は特定されておらず、作用の機序は Resolvin と比較して未解明である点が多いものの、PD1 には好中球の浸潤抑制(22)や apoptosis した分葉核好中球へのマクロフ

マクロファージの貪食を増加させる効果(22,32)が示されている。また PD1 iso
に関しては好中球の浸潤抑制(34)や thromboxane の合成阻害や受容
体の活性化を抑制することにより血小板の凝集を抑制する効果
(35,36)、好中球より産生される reactive oxygen species(ROS)や
NADPH oxidase(NOX)の活性を低下させ、放出される
myeloperoxidase(MPO)を低下させる効果(29)や、炎症反応の収束に
かかわる M2 マクロファージの炎症局所での比率を増加させ、また
個々のマクロファージの貪食を活性化させる効果が報告されている
(31)。



(参考文献 16 より改変)

図9 DHAからのProtectin D1及びそのisomerの産生経路

DHAは15-LOにより17S-HpDHAに変換され、その後16S, 17S-Epoxyeを介してPD1は産生される。一方、Protectin D1 isomerは17S-HpDHAよりperoxidaseにより17S-HDHAとなり、更に5-LOとperoxidaseにより産生される。

炎症性転写因子 NFκB と内膜肥厚の関係

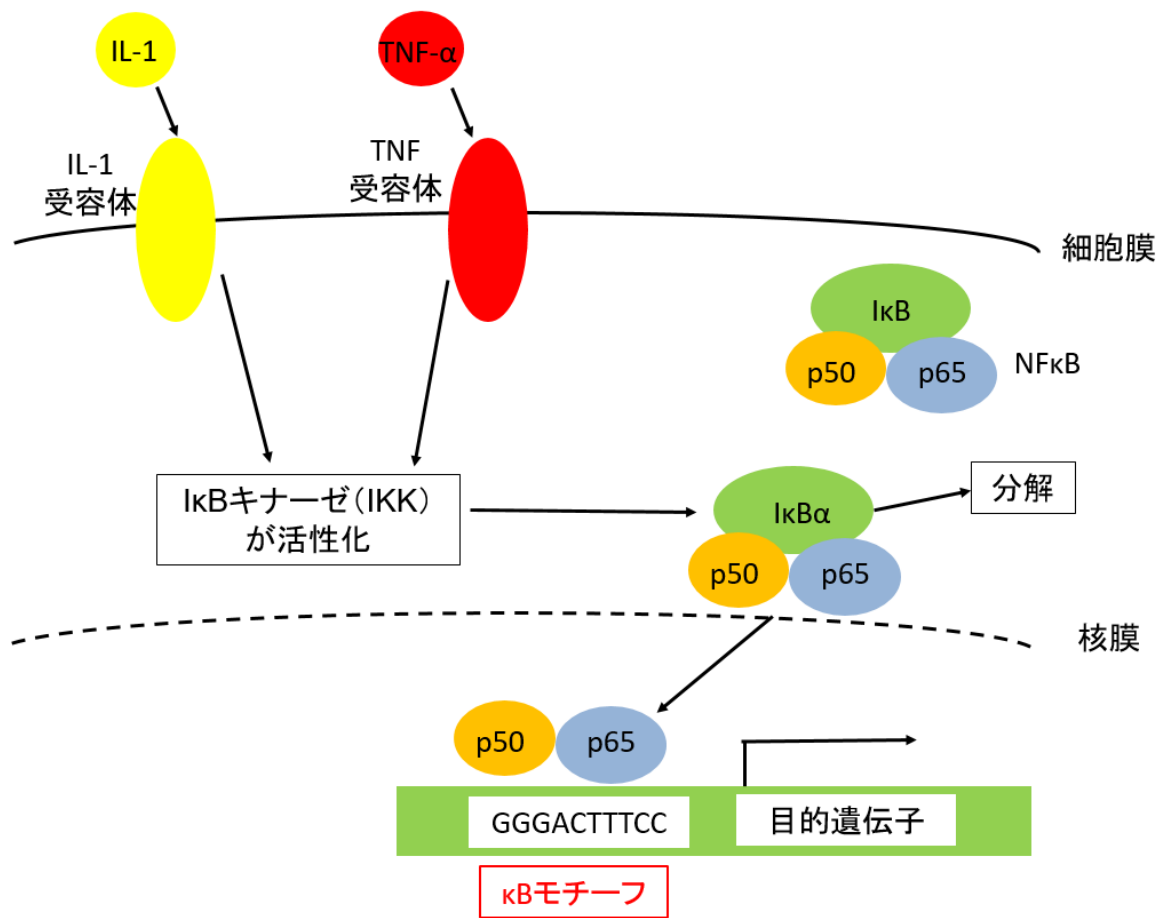
NFκB は DNA の κB モチーフ(GGGACTTCC)と呼ばれる配列に結合する転写因子で、通常 IκB(inhibitor κB)ファミリーと結合することにより抑制された状態で細胞質に局在している。NFκB ファミリーに属する分子は構造的に class I と class II に分類されており、class I は NFκB1(p105/p50)と NFκB2(p100/p52)があり、class II には RelA(p65)、RelB、c-Rel の存在が知られている。class I の p105 と p100 が限定分解を受けた p50 と p52 には転写活性化能が欠損しており、p50 と p52 の二量体では転写活性は上昇せず、class II の分子とヘテロダイマーを形成することにより転写が活性化する(37)。

活性酸素や interleukin (IL)-1、tumor necrosis factor-α (TNF-α) といったサイトカインなどの刺激により IκB キナーゼ(IKK)が活性化されると IκBα はタンパク質分解酵素複合体である proteasome により分解され、NFκB は核内に移行する。核内に移動した NFκB は DNA の κB モチーフに結合し、目的遺伝子の転写活性化を行う。

ラット頸動脈擦過モデルでは、擦過直後より IκBα や IκBβ、p105 は急速に減少し、同時に 4 時間以内に vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)や monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)

が発現し、それと並行してマクロファージが遊走する(38)。内皮傷害後の内膜肥厚は遊走した白血球と平滑筋細胞増殖に起因すると報告されているが(39)、NFκBは両者と相関し、Decoy(40)や IκBα dominant negative transgenic mouse(41)を使用して NFκB を抑制した先行研究では新生内膜の増殖が抑制されることが示されている。

マウスの内膜肥厚モデルである cuff-injury モデルを使用した先行研究では、内皮細胞の NFκB signaling を阻害することにより MCP-1、TNF-α、IL-1β、IL-6 といった炎症性因子や、F4/80 といったマクロファージのマーカー、PDGF-B、CXCL12 といった血管壁平滑筋細胞の増殖に関連する因子の低下を認めた(41)。また動脈壁の VCAM-1、や intracellular adhesion molecule-1(ICAM-1)といった細胞接着分子の発現や、抗酸化酵素である manganese superoxide dismutase (MnSOD)や glutathion S-transferase (GST)の活性化は抑制されたと報告されている(41)。



(参考文献 37 より改変)

図 10 NFκB の活性化

通常 NFκB は細胞質に IκB と結合して細胞質に抑制された状態で局在している。TNF-α などの刺激により IκB キナーゼ (IKK) が活性化すると IκBα が proteasome により分解され、核内に移動する。核内では κB モチーフに結合し、目的遺伝子 (IL-1、TNF-α、VCAM-1、ICAM-1 など) の転写活性化を行う。

抗炎症性脂質メディエータと内膜肥厚に関する先行研究

内膜肥厚と SPM に関する先行研究について列挙する。まず Resolvin D1 及び Resolvin D2 についてはウサギの大腿動脈擦過モデルを用いた先行研究において、局所投与により新生内膜の増殖を抑制したと報告されている(42)。またマウスを用いた動脈結紮モデルにおいて Resolvin D2 と Maresin 1 は新生内膜の増殖を抑制した(43)。ラット頸動脈擦過モデルに対し Resolvin D1 を動脈周囲にラップやゲルを使用して投与することによっても内膜肥厚抑制効果が示されている(30)。また Lipoxin A4 も浸透圧ポンプを用いて投与することにより新生内膜の増殖を抑制したと報告されている(44)。一方で、現在までのところ Protectin D series と血管内皮傷害後の内膜肥厚に関する先行研究はなかった。

また投与経路は、Resolvin D1 は局所投与と動脈周囲へのラップやゲルを使用した投与(30,42)、Resolvin D2 は局所投与と腹腔内投与(42,43)、Maresin 1 は腹腔内投与(43)、Lipoxin A4 は浸透圧ポンプを使用した投与方法(44)であり、静脈内に直接注射した先行研究はなかった。

抗炎症性脂質メディエータを内膜肥厚モデルに用いた先行研究					
使用動物	モデル	使用SPM	投与方法	結果	参考文献
ウサギ	大腿動脈 擦過	Resolvin D1 /Resolvin D2	動脈内 局所投与	内膜肥厚抑制	42
マウス	頸動脈 結紮	Resolvin D2 /Maresin 1	腹腔内投与	内膜肥厚抑制	43
ラット	頸動脈 擦過	Resolvin D1	動脈周囲の ラップ、ゲル	内膜肥厚抑制	30
マウス	頸動脈 結紮	Lipoxin A4	浸透圧 ポンプ	FPR2/ALX受容体 を介した内膜肥厚 抑制	44

表 2 抗炎症性脂質メディエータを内膜肥厚モデルに投与した先行
研究のまとめ

本研究の目的

血管内皮傷害により動脈壁の炎症反応を惹起した内膜肥厚モデルであるラット頸動脈擦過モデルに対し、抗炎症性脂質メディエータを投与することによる内膜肥厚抑制効果とその背景を調べることを本研究の目的とした。

本研究の実験概要

血管内治療時の内皮傷害とそれに続く一連の反応により新生内膜増殖や再狭窄が起こると考えられており、それをモデル化したラット頸動脈バルーン擦過モデルを使用することとした(11)。

投与する抗炎症性脂質メディエータは Resolvin D1 と Protectin D1 isomer を選択した。

Resolvin D1 は先行研究で動脈内局所投与により内膜肥厚抑制効果が示されているが、今回はより簡便で臨床応用しやすい投与経路で投与する方針とした。人体への薬剤の一般的な投与経路としては静脈内・筋肉内・皮下・経口・経肛門・吸入・経皮があるが(45)、先行研究において5分程度と比較的短時間で、濃度依存性に受容体との反応の peak を迎える(28)ことから、生体利用率が100%と高く、血中濃度の上昇速度が相対的に速い静脈内注射(45)を選択した。

Protectin D1 isomer は作用機序については不明な点があるものの、細胞レベルでは好中球浸潤抑制効果と血小板凝集抑制効果を認めており、内膜肥厚の機序を考慮すると好中球浸潤や PDGF の抑制により新生内膜増殖を抑制すると考えられたため、今回検証することとした。

投与量は、先行研究で 100nM の RvD1 を局所投与で投与していること(42)、また 100nM では MTT assay でラット動脈壁平滑筋細胞に対する細胞毒性を認めなかったこと(30)、ラットの血液量は 6.41ml/100g(46)であるため今回使用したラットの血液量が 20～25ml 程度と考えられたこと、これらの 3 点を考慮し 1 μ g/匹とした。

全身麻酔下にラットの左総頸動脈を 2Fr Fogarty balloon で全長に渡って擦過し、擦過直後と動脈壁での細胞増殖が peak となる擦過後 2 日目に SPM を投与した。急性期の動脈壁への白血球・単球/マクロファージの遊走・浸潤と、動脈壁の細胞増殖を擦過後 3 日目の標本に免疫染色を行い評価した。また擦過後 3 日目の動脈壁の炎症性転写因子 NF κ B 活性について Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法を用いて検討した。また新生内膜増殖については動脈壁の細胞数が一定となる擦過後 2 週間の段階で実施した。それ以降も再内皮化が進行するまで細胞外基質の増殖による内膜肥厚は持続するとされているが(11,12)、再内皮化に与える影響に関しては今回検証しておらず、2 週間以降に関する評価は実施しなかった。

実験

動物モデルの作製

本研究における動物実験は全て東京大学動物実験実施規則に基づいて実施された。12～14 週齢、体重 370～470g、オスの Sprague Dawly ラット（東京実験動物、東京、日本）を用いた。飼育中は通常の餌と水分がフリーアクセスの状態を与えられた。

手術時の麻酔はケタミン塩酸塩（第一三共製薬、東京、日本）とキシラジン塩酸塩（バイエル薬品、大阪、日本）の混合物を腹腔内投与することにより実施された。

十分な麻酔深度を得られた後に頸部の除毛を行い、頸部正中切開を行った。前頸筋群を正中で切開し、左総頸動脈・内頸動脈・外頸動脈を露出し、外頸動脈に 4 - 0 絹糸で **taping** を行った。この時、剥離による影響を最小限とするため、総頸動脈・内頸動脈周囲の剥離は最小限とした。外頸動脈に小切開を置き、ここから **2Fr Fogarty balloon** (Edwards Lifescience, Irvine, CA, USA) を中枢側に挿入、0.02ml の水を注入し拡張させた後、回転させながら引き抜き総頸動脈を全長に渡って擦過・傷害した。本操作を 3 回繰り返した後、左外頸動脈より **balloon catheter** を抜去し、その中枢・末梢側をそれ

ぞれ 4-0 絹糸で結紮した(図 11)。左総頸動脈・内頸動脈の拍動と止血を確認し、5-0 ナイロン糸で皮膚を閉創した。無事覚醒することを確認した。

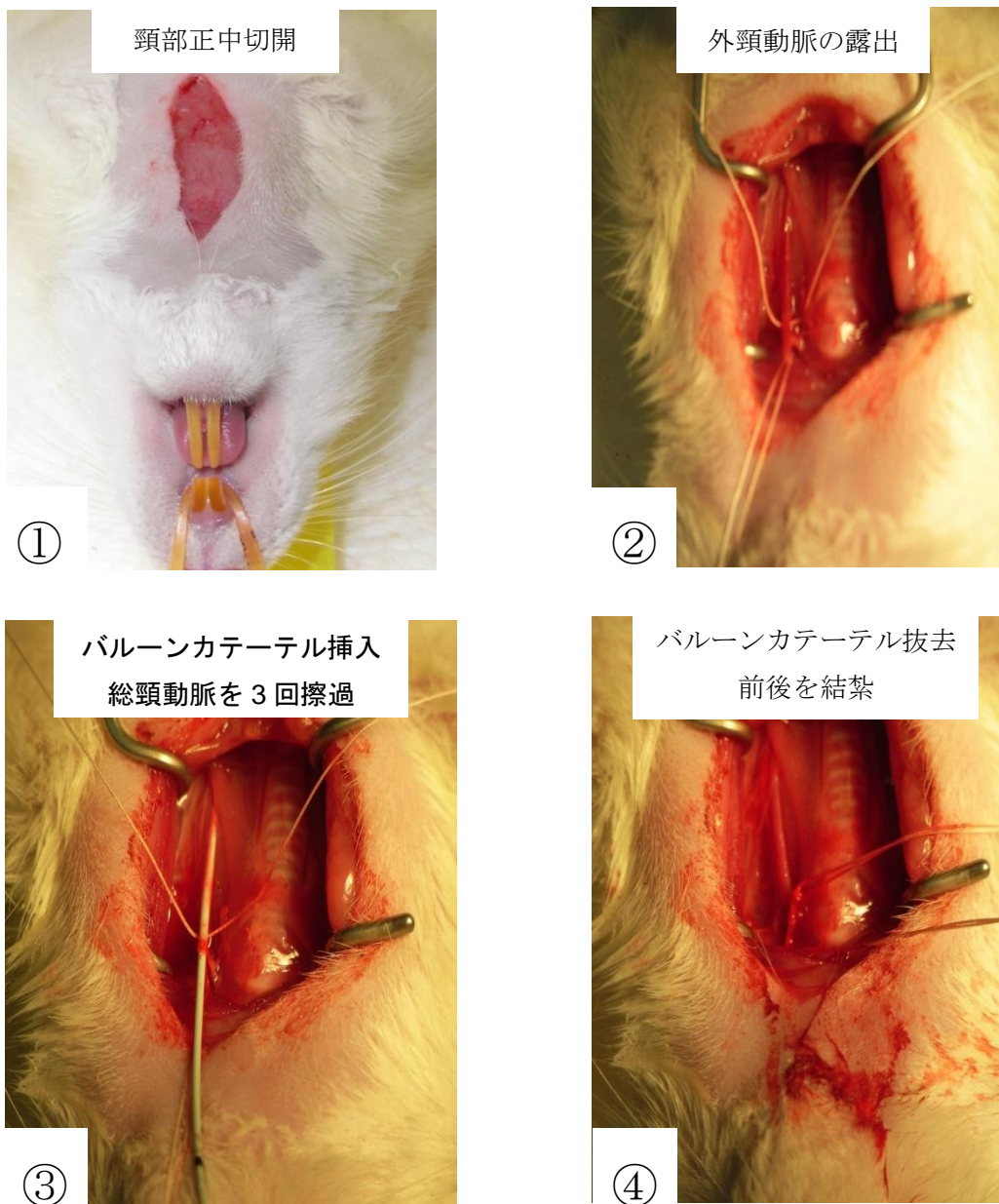
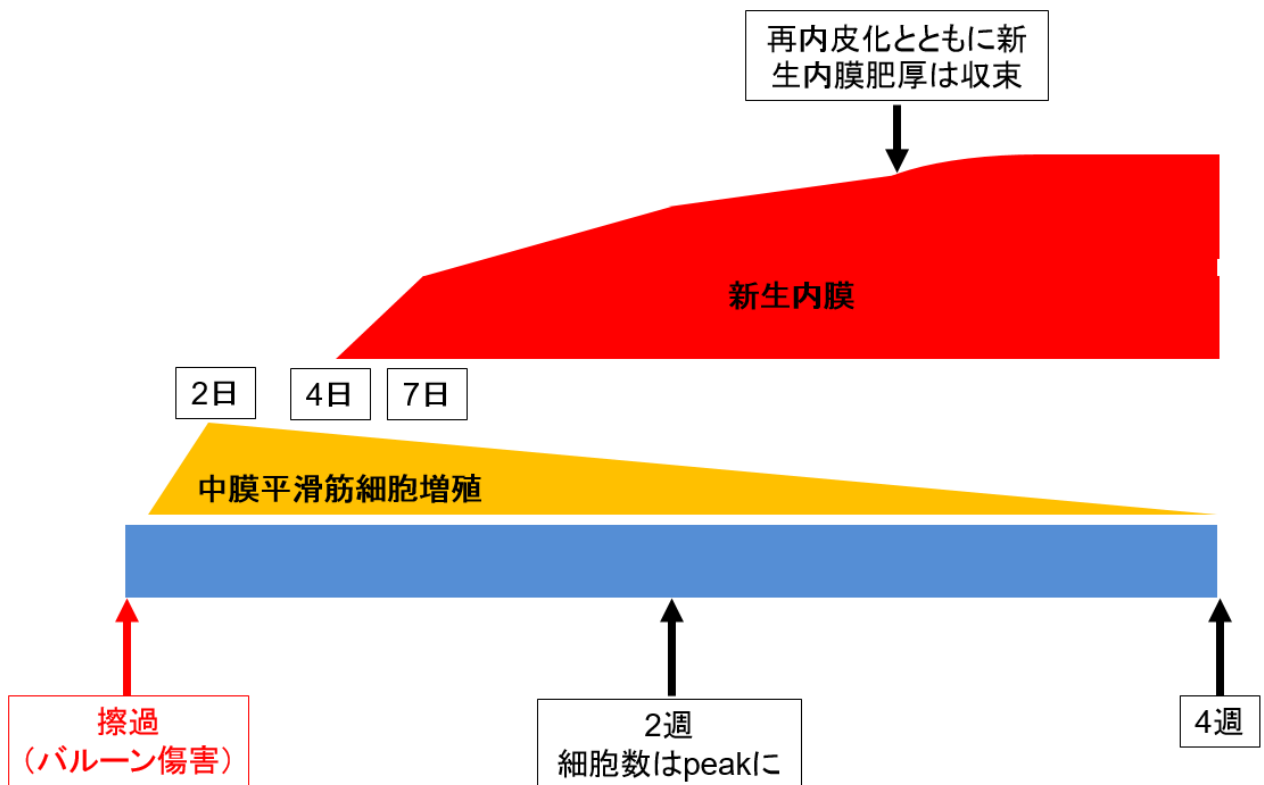


図 11 ラット頸動脈バルーン擦過モデルの作成

0.02ml の水を注入した 2Fr バルーンカテーテルで左総頸動脈を 3 回、
全長に渡って擦過傷害。

ラット頸動脈バルーン擦過モデルの経過

ラット頸動脈バルーン擦過モデルではラット頸動脈に内腔より擦過・傷害を加えることにより、内腔に内膜肥厚が出現する。その概要に関しては以前の研究によりかなり明らかになっているが(11)、概説するとバルーン傷害により単層の内皮細胞が剥離され、同時に中膜平滑筋細胞も傷害される。内皮細胞が剥離された部位に血小板が付着し、それらの産生する PDGF などの増殖因子により中膜平滑筋細胞の一部が増殖を開始する。その増殖は擦過傷害後、2 日目に peak を迎える。平滑筋細胞の増殖はその後も続くが傷害後約 2 週間で細胞数は一定となる。その後も細胞外基質(extra cellular matrix: ECM) の沈着により新生内膜肥厚は進行するが、傷害部位の両端より内皮細胞が内腔を覆ってくることにより収束する(図 12)。



(参考文献 11 より改変)

図 12 ラット頸動脈バルーン擦過モデルの擦過後経過

擦過後 1 日で中膜平滑筋細胞の増殖が開始され、擦過後 48 時間で peak となり、約 4 週間持続する。平滑筋細胞の血管内腔への遊走による新生内膜は擦過後 4 日目より出現し、擦過後 4~7 日目にその増殖速度は peak を迎える。血管平滑筋細胞を中心とする動脈壁の細胞数は擦過後 2 週間で一定となるが、その後も細胞外基質の増加による新生内膜の肥厚は続き、再内皮化されるまで持続する。

SPM の投与

前述の如くラットの左総頸動脈の擦過・傷害を行った直後と細胞増殖の peak である 2 日目に、 $1\ \mu\text{g}$ /匹の Resolvin D1(Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)、Protectin D1 isomer(Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)を 1ml の PBS で希釈し尾静脈より静脈内投与した。コントロール群には Resolvin D1、Protectin D1 isomer に溶媒として含まれるエタノールと同濃度・同量の 1%エタノール 1ml を尾静脈より静脈内投与した。本研究では SPM を投与し、炎症細胞浸潤や中膜細胞増殖に関しては擦過後 3 日目で評価することとした。また内膜肥厚に関しては細胞数が peak となり、以後一定となる傷害後 14 日目に評価することとした(図 13)。

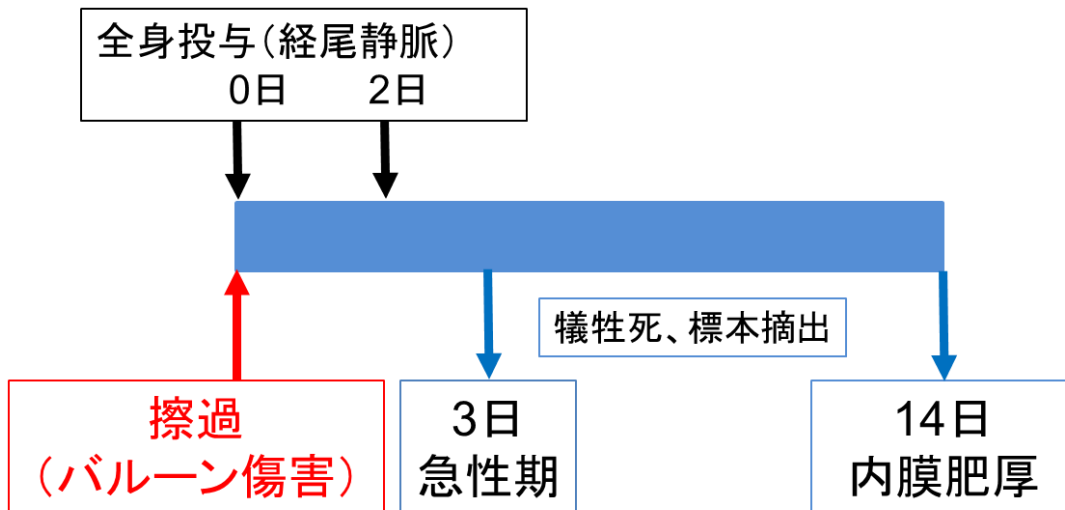


図 13 SPM 投与と検体摘出のタイミング

バルーンでの擦過直後と 2 日後に SPM を経静脈的全身投与。急性期の評価は擦過後 3 日目の検体、内膜肥厚の評価は擦過後 14 日目の検体を使用して実施した。

検体の摘出

ケタミン塩酸塩とキシラジン塩酸塩の混合物の腹腔内投与後、全身麻酔下にラットを背臥位とし、腹部正中より前頸部正中まで縦切開を置いた。腸管をよけて後腹膜を露出し、同時に両側外頸静脈を露出した。後腹膜背側の腹部大動脈を露出し 20G サーフロー針(テルモ株式会社、東京、日本)で穿刺、両側外頸静脈を切開した後に生理食塩水を 40ml 注入し血管内の血液を洗浄した。次に、免疫染色と Hematoxylin Eosin (HE) 染色を行う標本では 4%パラホルムアルデヒド(和光純薬工業、大阪、日本)を 20ml 注入し灌流固定を行い、NF κ B 活性の測定を行う検体では生理食塩水を 20ml 注入した。胸骨を腹部より頸部にかけて縦切し心臓～大動脈弓部及び総頸動脈を含めた分枝の起始部を露出、左総頸動脈全体を分岐部まで全長に渡って剥離・露出し、起始部より分岐部までを標本として採取した(図 14)。免疫染色用と NF κ B 活性測定用の検体は液体窒素で瞬間凍結し、HE 染色用の検体は 4%パラホルムアルデヒドで固定した。

検体摘出中、生理食塩水 40ml を腹部大動脈より注入した後、4%パラホルムアルデヒド 20ml 又は生理食塩水 20ml を注入した段階でラットは全例死亡した。

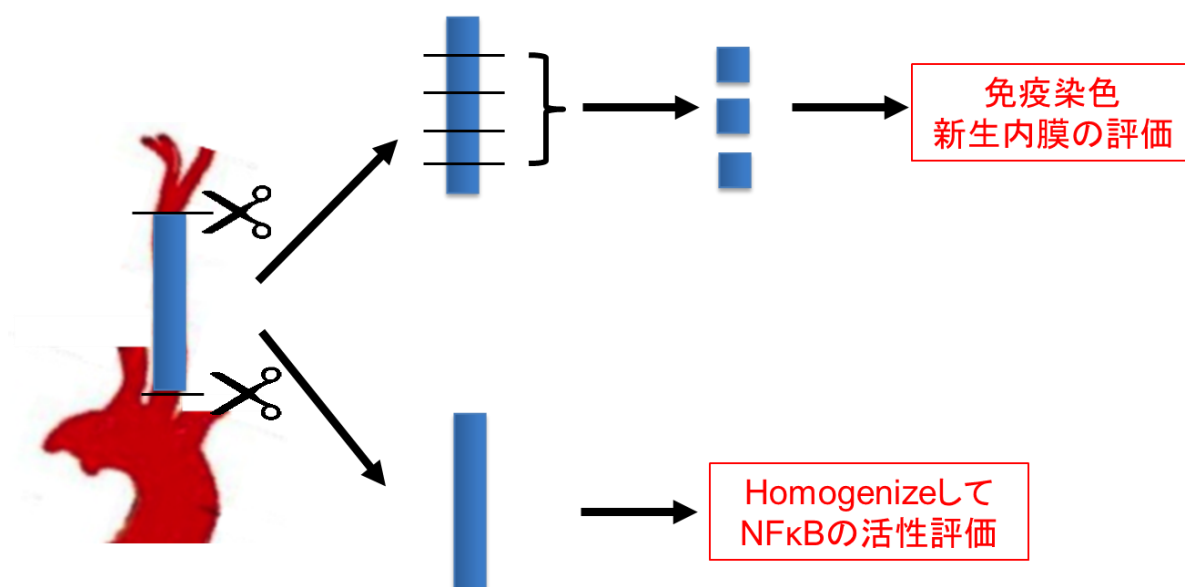


図 14 左頸動脈検体の摘出

左総頸動脈を全長に渡って摘出し、5等分した後に中央部の3検体を用いて免疫染色と新生内膜の評価を行った。NFκB活性測定のためのELISAには検体として全長に渡り使用した。

評価

免疫染色

免疫染色は以下のように行った。上記のように擦過後 3 日目の左総頸動脈を起始部より分岐部まで摘出し、摘出直後に液体窒素で凍結させた。凍結させた総頸動脈を 5 等分し、両端の 2 検体を除いた中央部の 3 検体より 1 か所ずつ 6 μ m の厚さで切り出した。プレパラートに貼付し 20 分間室温で風乾、その後氷冷アセトンで 10 分間固定を行った。固定後 10 分間室温で風乾した後、内因性 peroxidase のブロッキングを行った。洗浄の後、非特異的反応に対するブロッキングを行った。

次に一次抗体に増殖中の細胞(G0 期を除く G1 期、S 期、G2 期、M 期の細胞)を抗 Ki67 抗体(50 倍希釈 DAKO, Santa Clara, CA, USA)、白血球を抗 CD45 抗体(100 倍希釈 Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)、マクロファージ/単球を抗 CD68 抗体(500 倍希釈 BMA BIOMEDICALS, Augst, Switzerland) を用いて、室温下に 1 時間 incubate した。洗浄の後、二次抗体として LSAB kit(DAKO, Santa Clara, CA, USA)を用い、同様に室温下で 30 分 incubate した。発色は DAB kit(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を用

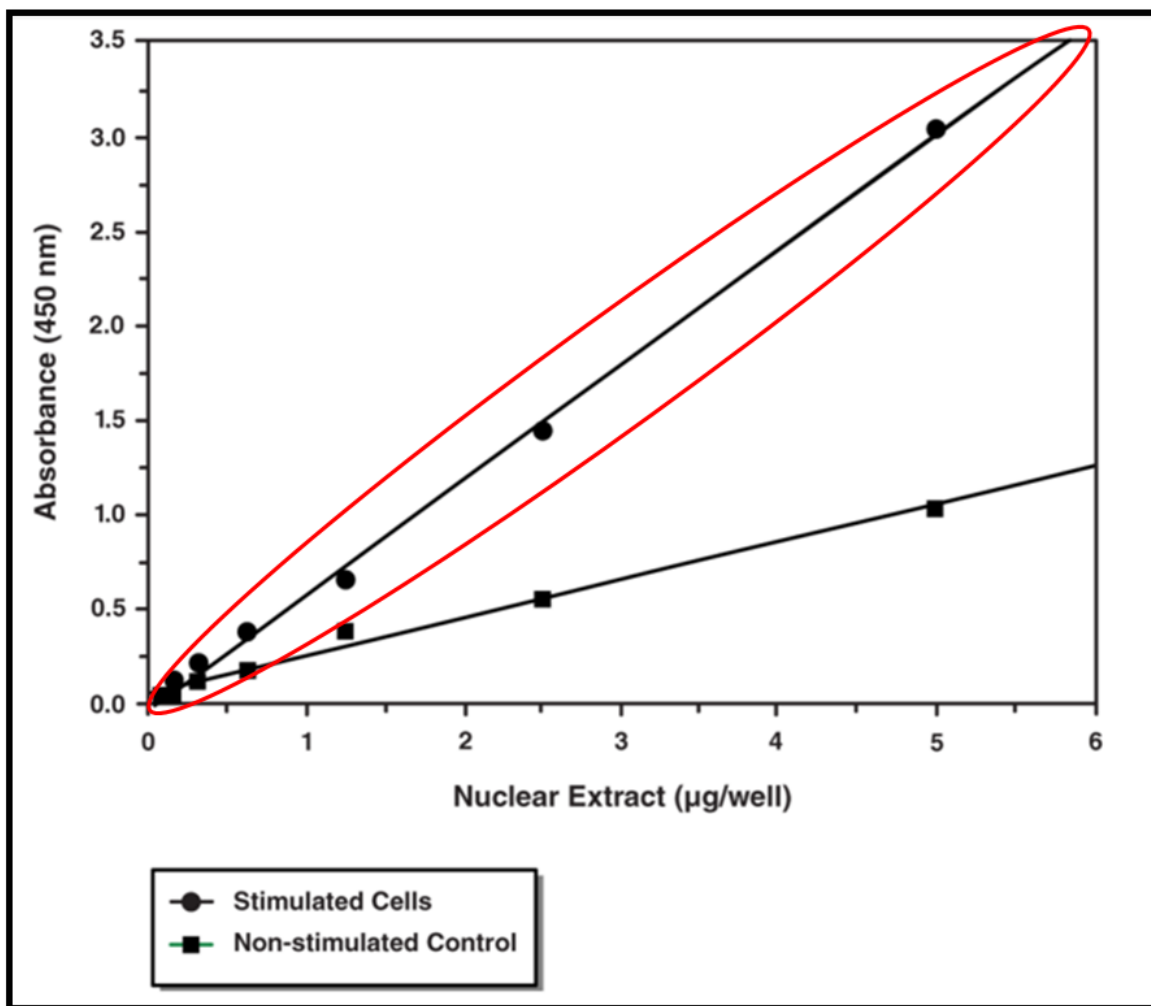
いて行った。発色の後、細胞核染色をマイヤーヘマトキシリン液を用いて行った。

染色の後、免疫染色で染まった細胞の動脈壁（中膜）の細胞に対する割合を算出し、平均値の差を検討した。外膜は外側の境界が不明瞭であり、先行研究(42)でも中膜のみで評価を行っていることから、今回も中膜のみでの評価を行った。動脈の中央部から3箇所を選び、400倍の視野で観察した。動脈の1断面につき動脈壁の6か所で、免疫染色で染色された細胞の動脈の中膜全体の細胞数に対する割合を計算した。3箇所の平均をその個体の平均とし、 $n=6$ で評価した。

観察はOlympus AX80顕微鏡（Olympus、東京、日本）を用いて行い、画像は顕微鏡に装着したOlympus DP70 digital microscope camera（Olympus、東京、日本）で撮影した。得られた画像データはImageJ（National Institute of Health, Bethesda, MD, USA）を用いて解析した。

炎症性転写因子 NFκB 活性の評価

擦過された動脈壁の NFκB 活性は ELISA 法を用いて以下のように評価した。先述のように擦過後 3 日目の左総頸動脈を起始部より分岐部まで摘出した後、生理食塩水で洗浄し、直ちに液体窒素を用いて凍結した。解凍した後、Daunce 型 homogenizer(DWK Life Sciences Inc., Millville, NJ, USA)を使用して homogenize した後、核抽出液を Nuclear Extraction Kit(Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)を使用して作製した。核抽出液中の NFκB 活性を濃度と波長 450nm における吸光度が一次直線的に相関する NFκB ELISA kit(Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)を使用して計測した(図 15)。この時、吸光度はプレートリーダー-VARIOSCAN (Thermo Fisher Scientific, Runcorn, Cheshire, UK)を用いて測定した。



(NFκB ELISA kit の添付文書より抜粋し改変)

図 15 NFκB の活性の ELISA kit による評価

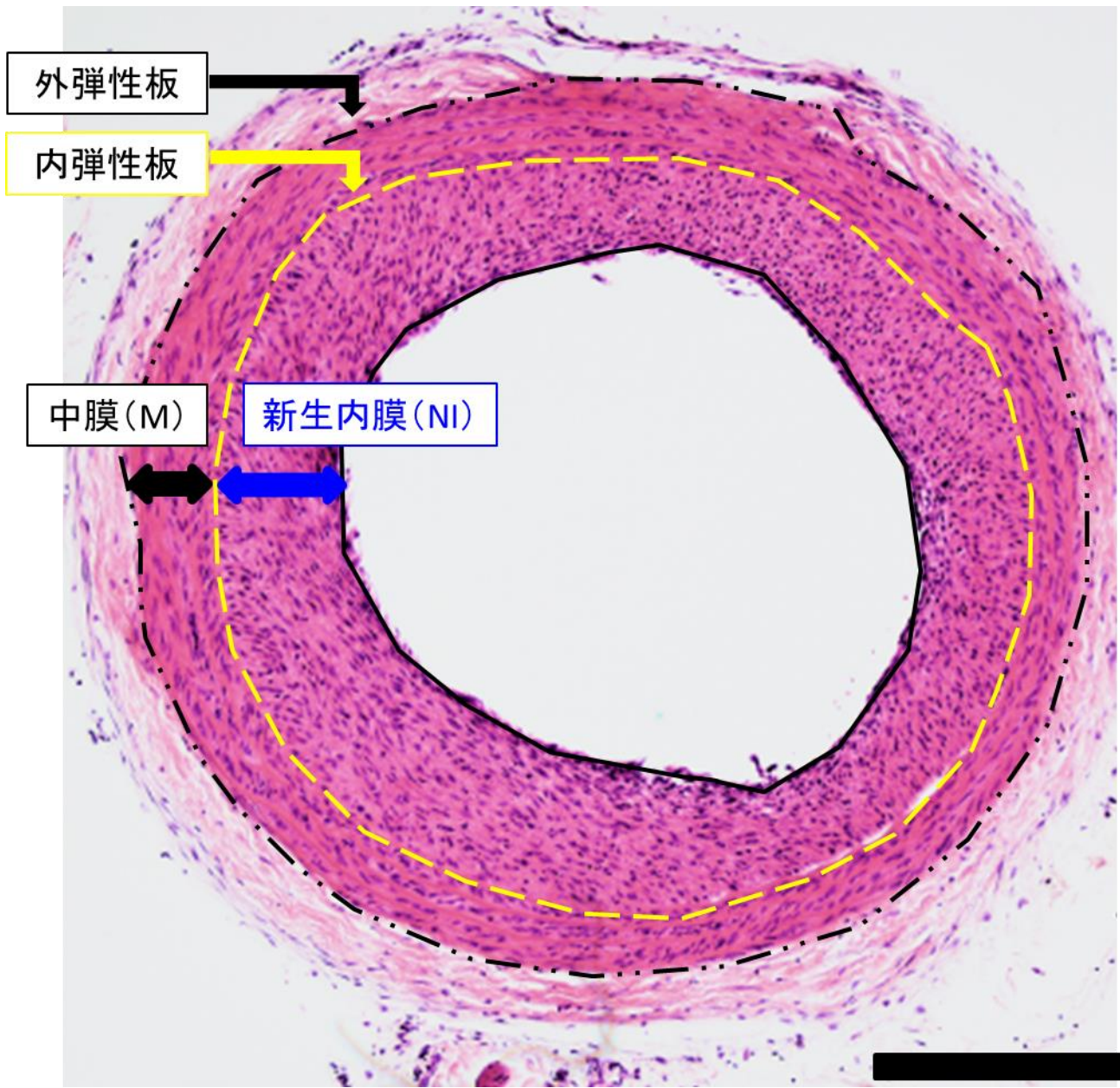
核抽出液中の NFκB 活性が波長 450nm における吸光度と一次直線的に相関する kit を使用した。

新生内膜増殖の評価

新生内膜増殖の評価は以下のように行った。先述のように擦過後 14 日目の左総頸動脈を起始部より分岐部まで摘出した後、摘出した総頸動脈を 5 等分し、両端の 2 検体を除いた中央部の 3 検体を 4% パラホルムアルデヒドで固定した。その後、中央部の 3 検体より 1 か所ずつ $6\mu\text{m}$ の厚さで切り出し、HE 染色を行った。先述の顕微鏡・カメラを用い 100 倍の視野で各標本の写真を撮影、新生内膜 (neointima : NI) と中膜(media : M)の面積を画像処理ソフト ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, ML, USA) を用いて計測し、新生内膜と中膜の面積比(NI/M 比)を算出した(図 16)。6 検体の平均を算出し、各面積と NI/M 比の平均値の検定を行った。

統計解析

全てのデータは平均値±標準偏差で記載した。平均値の差の検定は統計ソフトウェア JMP Pro 11.0(SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて 3 群間の比較を one-way ANOVA 法で行い、有意差を認められた場合には Turkey 法で各群間の比較を行った。 $P<0.05$ を有意水準とした。



(Scale bar, 100 μ m)

図 16 NI/M 比の算出方法

顕微鏡下 100 倍の視野で動脈の短軸断面を撮影、画像処理ソフト ImageJ を用いて新生内膜(NI)と中膜(M)の面積を測定。

(NI の面積) / (M の面積) を行って算出した。

結果

バルーン傷害した左総頸動脈における炎症性細胞浸潤の抑制

バルーン傷害後 3 日目の左総頸動脈を摘出し、動脈壁への好中球・単球/マクロファージの遊走・浸潤を評価した。動脈壁の細胞全体に対する好中球 (CD45 陽性細胞) の割合は control 群で $7.2 \pm 4.1\%$ 、Resolvin D1 投与群で $1.6 \pm 1.4\%$ 、Protectin D1 isomer 投与群で $2.2 \pm 1.1\%$ であった (図 17)。3 群間には有意差を認め ($P=0.003$)、Resolvin D1 投与群 ($P=0.005$) と Protectin D1 isomer 投与群 ($P=0.01$) の両方で control 群と比較して有意に好中球浸潤は抑制された。一方、Resolvin D1 投与群と Protectin D1 isomer 投与群の間では有意差は認められなかった ($P=0.93$)。

また同様に単球/マクロファージ (CD68 陽性細胞) の動脈壁の細胞全体に対する割合は、control 群で $4.6 \pm 1.9\%$ 、Resolvin D1 投与群で $0.98 \pm 0.57\%$ 、Protectin D1 isomer 投与群で $1.3 \pm 0.39\%$ であった (図 18)。3 群間には有意差を認め ($P=0.001$)、Resolvin D1 投与群 ($P=0.002$) と Protectin D1 isomer 投与群 ($P=0.006$) の両方で control 群と比較して有意に単球/マクロファージ浸潤は抑制された。一方、Resolvin D1 投与群と Protectin D1 isomer 投与群の間では有

意差は認められなかった($P=0.86$)。

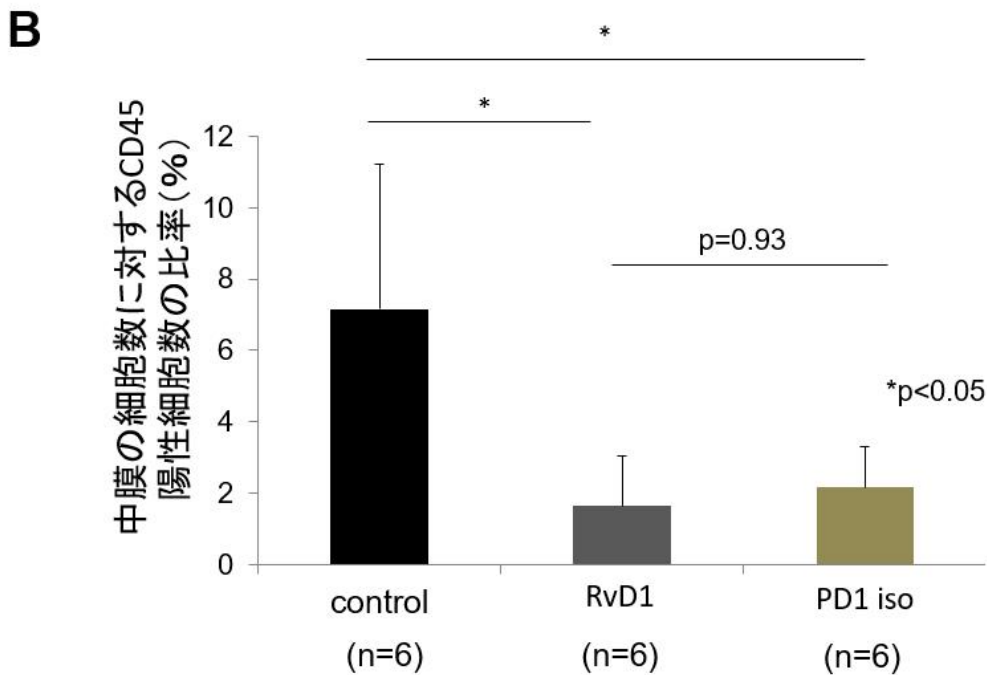
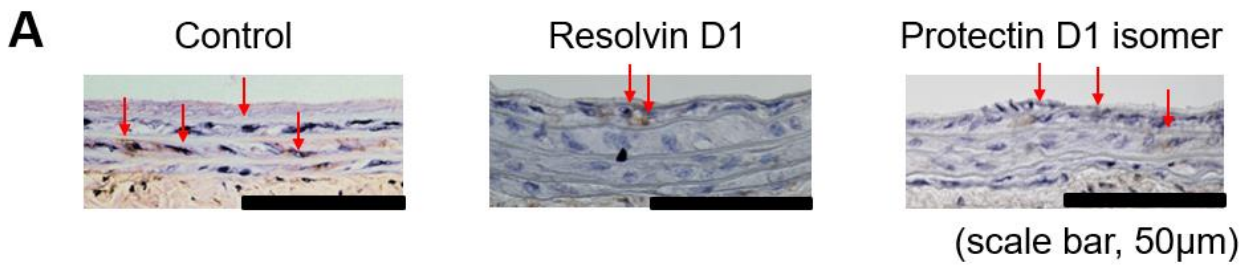


図 17 擦過後 3 日目の動脈壁への白血球浸潤評価(各 n=6)

A バルーン擦過後 3 日目の抗 CD45 抗体を使用した免疫染色の 400 倍視野である。陽性細胞は RvD1 投与群・PD1 iso 投与群で減少している。

B 中膜の細胞数に対する CD45 陽性細胞の比率を示したグラフである。RvD1 投与群・PD1 iso 投与群の両方で有意に減少していたが、RvD1 投与群と PD1 iso 投与群の間に差は認めなかった。

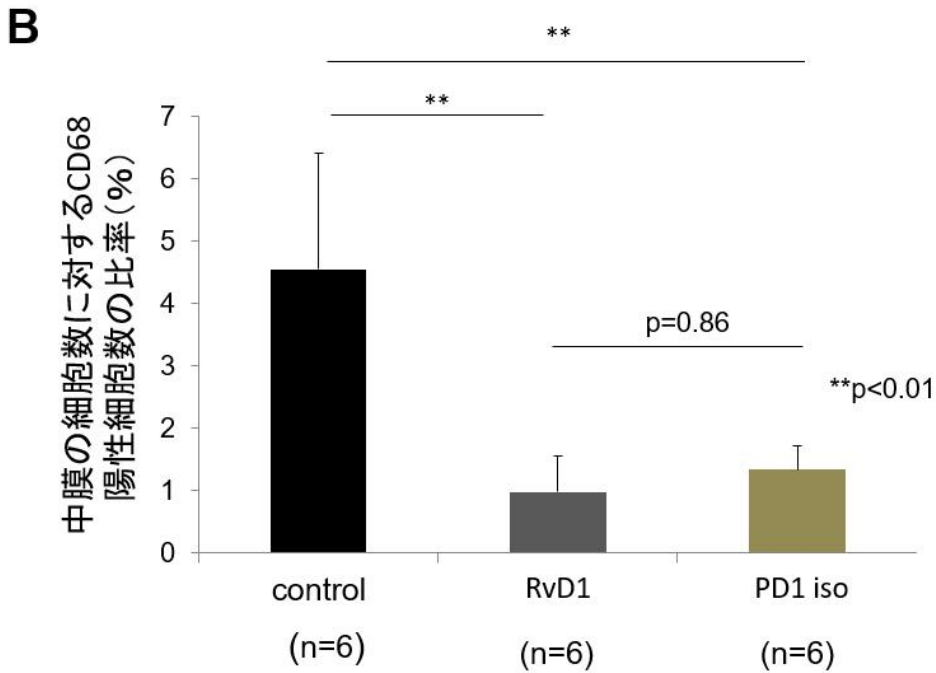
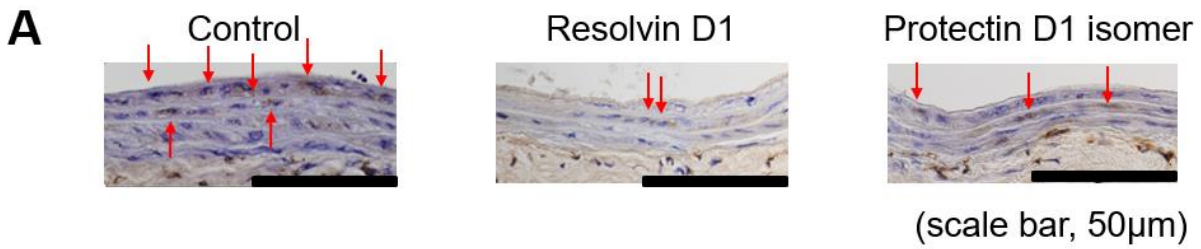


図 18 擦過後 3 日目の動脈壁へのマクロファージ浸潤の評価(各 n=6)

A バルーン擦過後 3 日目の抗 CD68 抗体を使用した免疫染色の 400 倍視野である。陽性細胞は RvD1 投与群・PD1 iso 投与群で減少している。

B 中膜の細胞数に対する CD68 陽性細胞の比率を示したグラフである。RvD1 投与群・PD1 iso 投与群の両方で有意に減少していたが、RvD1 投与群と PD1 iso 投与群の間に差は認めなかった。

バルーン傷害した左総頸動脈の中膜における細胞分裂・増殖の抑制

バルーン傷害後 3 日目の左総頸動脈を摘出し、動脈壁(中膜)の細胞増殖を評価した。中膜の細胞全体に対する増殖細胞(Ki67 陽性の非 G0 期にある増殖中の細胞)の割合は Control 群で $21.9 \pm 8.8 \%$ 、Resolvin D1 投与群で $4.1 \pm 2.6 \%$ 、Protectin D1 isomer 投与群で $5.2 \pm 2.7\%$ であった(図 19)。3 群間には有意差を認め($P < 0.001$)、Control 群と比較し Resolvin D1 投与群 ($P = 0.001$)、Protectin D1 isomer 投与群 ($P = 0.003$) の両方で、動脈壁の細胞増殖は control 群と比較して有意に減少していた。一方で、Resolvin D1 投与群と Protectin D1 isomer 投与群の間には有意差を認めなかった($P = 0.93$)。

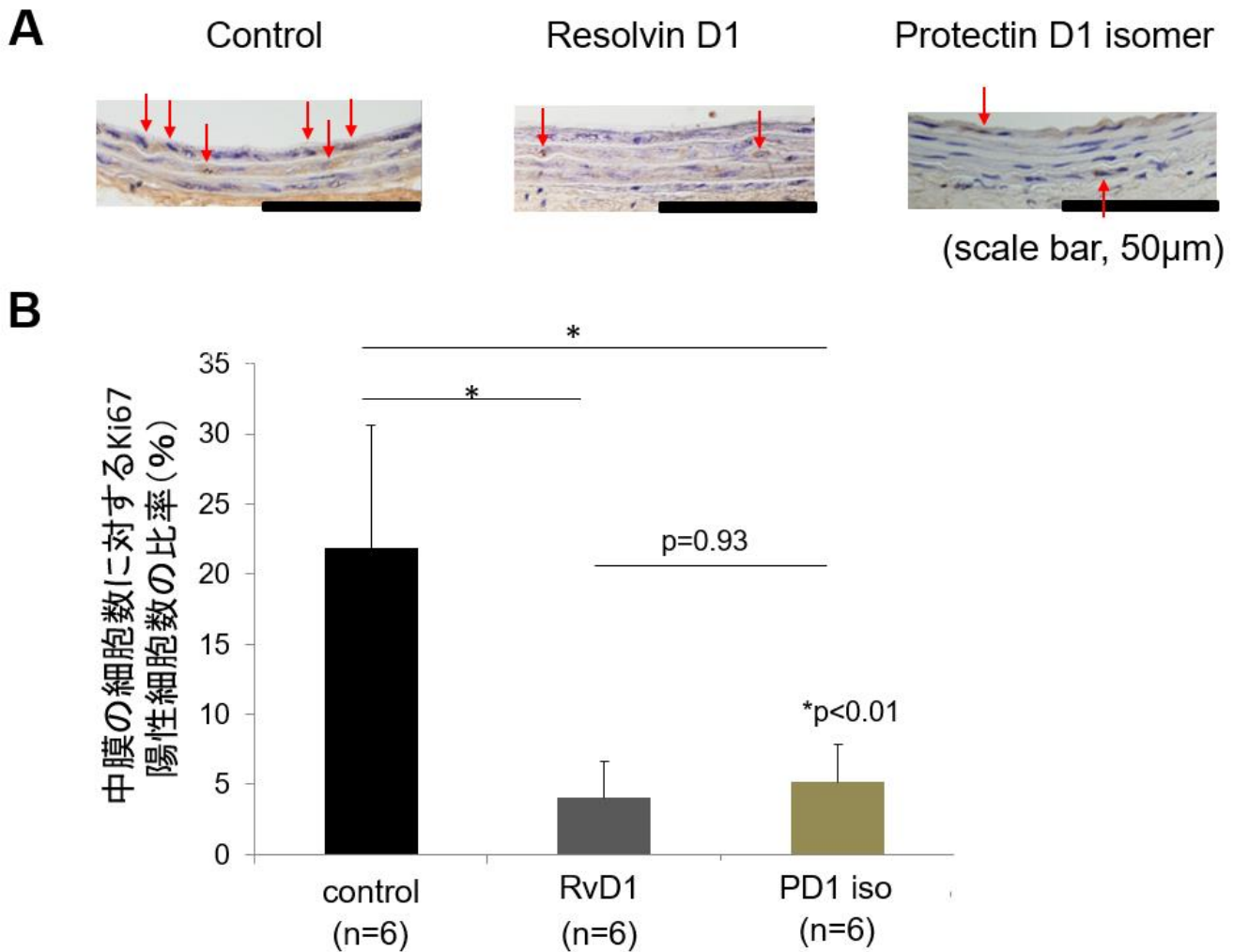


図 19 擦過後 3 日目の動脈壁での細胞増殖の評価(各 n=6)

A バルーン擦過後 3 日目の抗 Ki67 抗体での免疫染色、400 倍視野である。陽性細胞は RvD1 投与群・PD1 iso 投与群で減少している。

B 中膜の細胞数に対する Ki67 陽性細胞の比率を示したグラフである。RvD1 投与群・PD1 iso 投与群の両方で有意に減少していたが、RvD1 投与群と PD1 iso 投与群の間に差は認めなかった。

バルーン傷害した左総頸動脈における炎症性転写因子 NFκB 発現

の抑制

擦過・傷害した左総頸動脈を homogenize し核抽出物を作製、ELISA 法で動脈壁内の炎症性転写因子 NFκB の活性を測定した。吸光度は Control 群で 0.136 ± 0.011 、Resolvin D1 投与群で 0.102 ± 0.005 、Protectin D1 isomer 投与群で 0.119 ± 0.009 であり、3 群間には有意差を認めた ($P < 0.001$)。Resolvin D1 投与群 ($P < 0.001$)、Protectin D1 isomer 投与群 ($P = 0.003$) の両方で動脈壁内の NFκB 活性は control 群と比較して有意に低下した(図 20)。また Resolvin D1 投与群と Protectin D1 isomer 投与群の比較では、Resolvin D1 投与群でより有意に ($P = 0.004$) 抑制された。

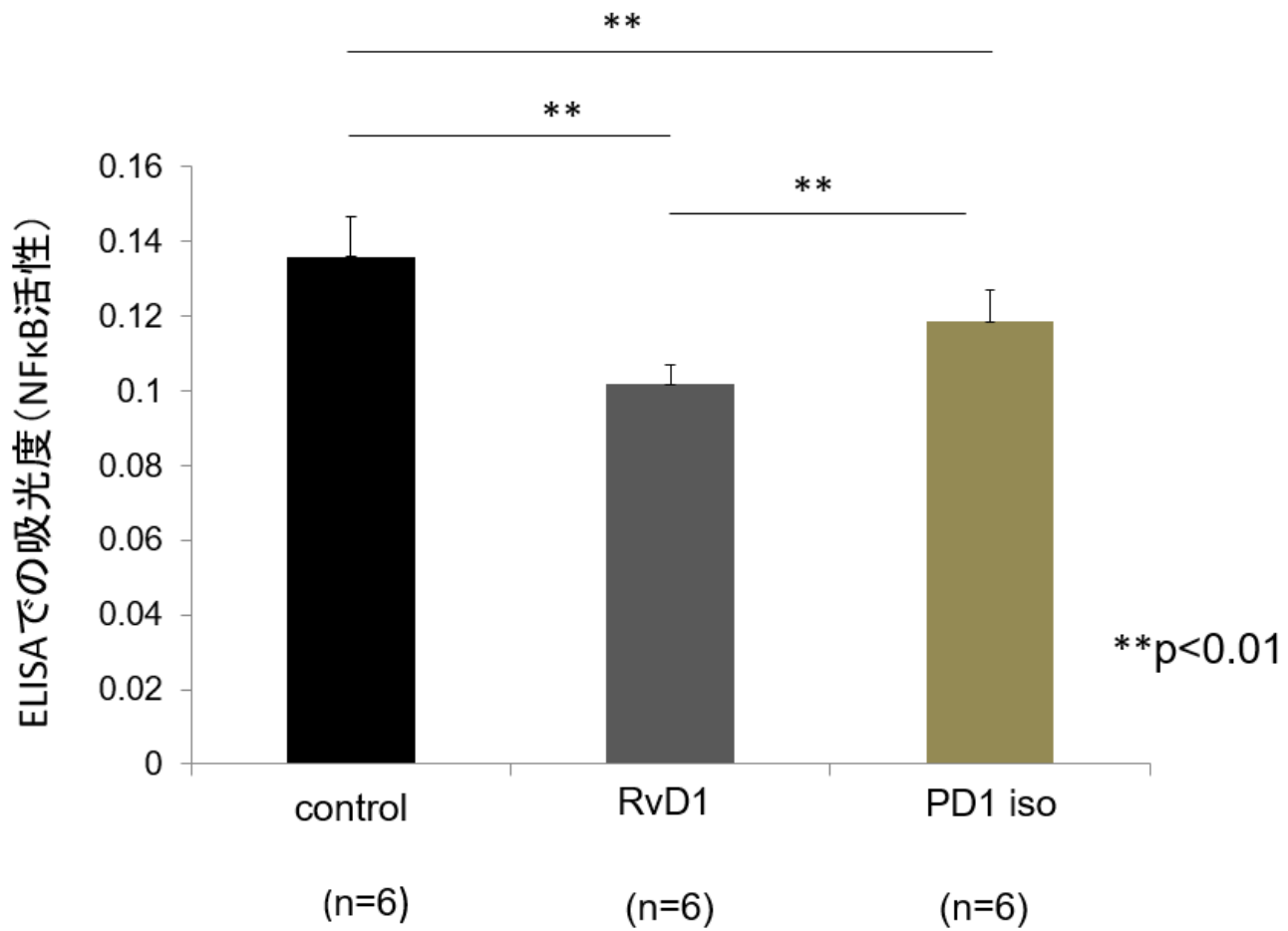


図 20 ELISA を使用した動脈壁での NFκB 活性の評価(各 n=6)

吸光度は RvD1 投与群・PD1 iso 投与群の両方で有意に低下していた。RvD1 投与群と PD1 iso 投与群では、RvD1 投与群でより強く抑制された。

バルーン傷害による新生内膜増殖の抑制

擦過した左総頸動脈の短軸断面における中膜の面積は Control 群では $0.14 \pm 0.015 \text{ mm}^2$ 、Resolvin D1 投与群では $0.15 \pm 0.022 \text{ mm}^2$ 、Protectin D1 isomer 投与群では $0.15 \pm 0.020 \text{ mm}^2$ であった。また短軸断面における新生内膜の面積は Control 群では $0.17 \pm 0.034 \text{ mm}^2$ 、Resolvin D1 投与群では $0.11 \pm 0.036 \text{ mm}^2$ 、Protectin D1 isomer 投与群では $0.12 \pm 0.025 \text{ mm}^2$ であった。

中膜の面積は 3 群間に有意差を認めなかったが ($P=0.62$)、新生内膜の面積は 3 群間には有意差を認めた ($P=0.003$)。Resolvin D1 投与群 ($P=0.003$)、Protectin D1 isomer 投与群 ($P=0.01$) の両方で新生内膜面積は減少した。一方で Resolvin D1 投与群、Protectin D1 isomer 投与群の間では有意差は認められなかった ($P=0.84$)。

新生内膜増殖を新生内膜(neointima) / 中膜(media) の面積比 (NI/M 比) で比較した。Control 群では 1.23 ± 0.17 、Resolvin D1 投与群では 0.72 ± 0.18 、Protectin D1 isomer 投与群では 0.82 ± 0.16 で (図 21)、3 群間に有意差を認めた ($P<0.001$)。Control 群に対し、Resolvin D1 投与群 ($P<0.001$)、Protectin D1 isomer 投与群 ($P<0.001$) の両方で新生内膜増殖は抑制された。一方で Resolvin D1

投与群、Protectin D1 isomer 投与群の間では有意差は認められなかった($P=0.51$)。

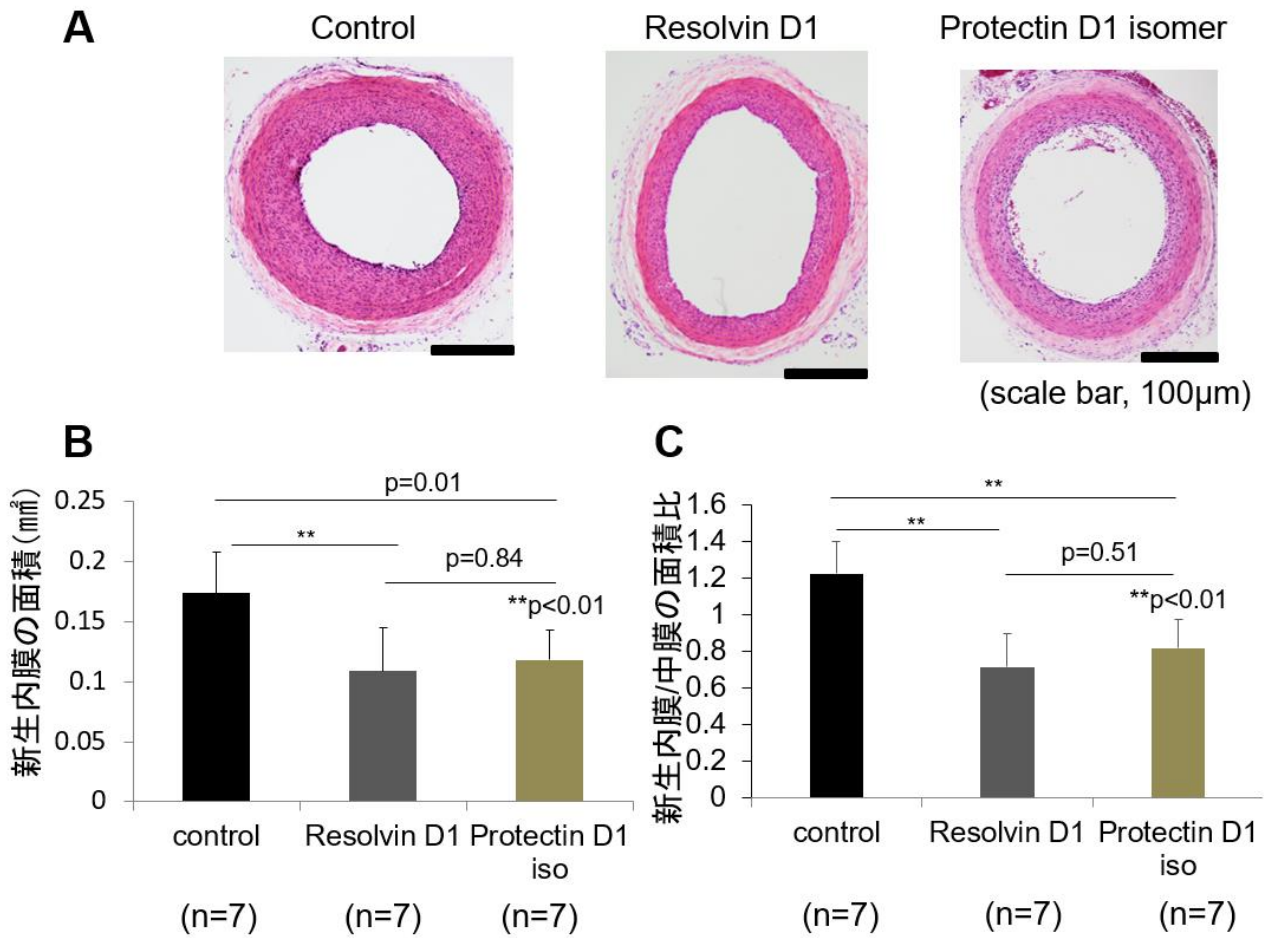


図 21 擦過後 14 日目の新生内膜増殖の評価(各 n=7)

A バルーン擦過後 14 日目の検体の HE 染色。100 倍の視野で観察。

B 新生内膜の面積を算出、RvD1 投与群・PD1 iso 投与群の両方で減少した。RvD1 投与群と PD1 iso 投与群では差を認めなかった。

C NIM 比を算出、RvD1 投与群・PD1 iso 投与群の両方で新生内膜増殖は抑制された。RvD1 投与群と PD1 iso 投与群では差を認めなかった。

考察

本研究ではラット頸動脈バルーン擦過モデルを用いて内皮傷害とその後惹起される内膜肥厚の増殖抑制効果を検証した。Resolvin D1 と Protectin D1 isomer の投与により擦過後 3 日目の白血球や単球・マクロファージの浸潤が抑制され、動脈壁の細胞増殖と炎症性転写因子である NF κ B の活性が抑制された。また擦過後 14 日目の検体では新生内膜の増殖が有意に抑制されていた。

投与経路に関してだが、上述の文献では SPM をいずれも動脈内局所投与(42)、腹腔内投与(43)、浸透圧ポンプ(44)を使用した投与方法や血管周囲にゲル(30)として投与する方法のいずれかで投与しており、直接臨床応用することは複雑または困難と考えられた。先行研究より RvD1 とその受容体である ALX(FPR2) や GPR32 との結合は 5 分程度(28)と比較的短時間で最強となることが知られており、また同時に濃度依存性に結合が増強することが知られていた。そのため短時間に血中濃度を急速に上昇させることが受容体と強く反応させる点で重要と考えられた。肝代謝を受けない動脈内局所投与を行った先行研究には有効性で劣るものの、静脈内注射は RvD1 の投与方法として簡便性と有効性を両立させる投与方法と考えられた。また他

の動物モデルで SPM を経静脈的に投与したものとしては、心虚血モデルに Resolvin E1 を投与した例(47)や、肺虚血モデルに Resolvin D1 を投与した例(48)があり、ともに尾静脈より投与していた。併せて尾静脈からの経静脈的投与はラット頸動脈擦過内膜肥厚モデルに対する RvD1 や PD1 iso の投与経路として有効性と簡便性を両立した経路と考えられた。

Resolvin と Protectin の効果について、今回 RvD1 と PD1 iso は何れも白血球・単球・マクロファージの遊走を抑制し、新生内膜の増殖を抑制した。文献的にはマウス急性腎虚血モデルに対して Resolvin 混和物(Resolvin D1、D2、D3 をそれぞれ 1 : 2 : 1 の割合で混合したもの) と Protectin D1 を投与したところ、両方で腎機能低下が緩和され、線維化も抑制された。ただ血清クレアチニン値の上昇は Resolvin 混和物を投与した群でより強く抑制されたのに対し、好中球や単球の浸潤は Protectin D1 によってより強く抑制された(23)。またマウス腸管虚血モデルに対し Resolvin D5 と Protectin D1 を投与して比較したところ、両方で顆粒球浸潤を抑制したものの Protectin D1 の方がより強く抑制した(24)。Resolvin D 群や Protectin D 群の抗炎症作用の強度に関しては差があるものの、その

作用の強弱に関しては今後の検討課題である。

SPM には現在までに Lipoxin、Resolvin、Protectin、Maresin の 4 つのグループが発見されている。これらと動脈の内膜肥厚への影響をウサギの大腿動脈をバルーン擦過した後に Resolvin D2 を局所投与したところ新生内膜の増殖が抑制され、その背景として *in vitro* で Resolvin D1 及び Resolvin D2 がともに炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1 と炎症性転写性因子として知られる NF κ B と AP-1 の発現を抑制していた(42)。また Resolvin D2 と Maresin 1 はマウスの動脈結紮モデルで新生内膜の増殖を抑制し、動脈壁での細胞増殖と白血球の浸潤が抑制された(43)。また Lipoxin もマウスの動脈結紮モデルで新生内膜の増殖を抑制したと報告されている(44)。バルーン傷害の後に炎症性転写因子である NF κ B は血管平滑筋細胞や VCAM-1 や MCP-1 の活性化において重要な役割を担っており(49)、NF κ B を抑制することにより新生内膜の増殖は抑制される(50-52)。今回 Resolvin D1、Protectin D1 isomer 投与により NF κ B の活性が抑制されており、Resolvin D1、Protectin D1 isomer の新生内膜の増殖を抑制する経路の一つに NF κ B を介する経路があると考えられた。

本研究で、Resolvin D1 と Protectin D1 isomer の投与により NFκB 活性はそれぞれ 25% と 13% 抑制され、同様に白血球浸潤は 77% と 70%、単球/マクロファージ浸潤は 78% と 71%、中膜細胞増殖は 81% と 76%、新生内膜増殖は 37% と 32% 抑制されていた。 *in vitro* で TNF-α で刺激した培養血管平滑筋細胞に 10nM の Resolvin D1 を投与した先行研究では NFκB 活性は 30% 抑制され(42)、Resolvin D2 と Maresin1 を投与した先行研究では、NFκB 活性は濃度依存性に抑制され 500nM 投与時にそれぞれ 24% と 28% 抑制されていた(43)。一方、10~100nM の Resolvin D2 と Maresin1 は ICAM-1 や VCAM-1 の発現を抑制せず(43)、ウサギ大腿動脈バルーン擦過モデルに対し 10nM の Resolvin D2 を動脈内局所投与した先行研究では動脈壁の VCAM-1 や ICAM-1 の発現は抑制されていなかった(42)。今回 NFκB 活性に有意差があったにも関わらず白血球や単球/マクロファージの遊走に差がつかなかったことの原因として、ICAM-1 や VCAM-1 などの細胞接着因子の抑制と比較して NFκB 活性がより強く抑制されていたことが関与している可能性が考えられた。また *in vitro* でヒト血管壁平滑筋細胞を培養し 0.01nM、1nM、100nM の Resolvin D1 を投与した先行研究では、細胞増殖は濃度依存性に

100nM で最大 59% の増殖抑制をしたものの 0.01nM でも有意に細胞増殖を抑制しており、inhibitory concentration for 50% effect(IC₅₀) は 0.1~1nM にあると報告されている(42)。今回の実験では 1μg/匹を投与したが、ラットの血液量が 20~25ml であることを考慮すると投与直後の血中濃度は最大で Resolvin D1 が 106~133nM、Protectin D1 isomer が 111~139nM になったと考えられ、IC₅₀ に対し十分高濃度であったため NFκB 活性の抑制では有意差を認めたものの、細胞増殖や新生内膜増殖では有意差がつかなかった可能性があると考えられた。

作用機序に関してだが、Resolvin D の受容体として ALX(FPR2) と GPR32 が特定されているが、Protectin D1 isomer に対する受容体は特定されていない。ただ腸管虚血モデルでの実験で、Protectin D1 の投与により TNF-α、IL-1β、IL-6 の活性が抑制されたのに対し、Resolvin D5 投与により活性が低下したのは IL-1β のみであったとの知見があり、異なる受容体・作用機序があると考えられた(24)。

ラット頸動脈バルーン擦過モデルは再狭窄のモデルとして確立されているが、実際の動脈硬化性病変と異なり正常血管に対する傷害後の反応に対する効果のみを見ている点が異なる。具体的には動脈

壁の慢性炎症とされる動脈硬化病変では、内皮の NF κ B の発現や(41)、VCAM-1 や ICAM-1 といった接着因子の発現が亢進し(53)、マクロファージや好中球が浸潤した状態にあるが(4,54)、それらに対する RvD1 や PD1 iso の評価を行っていないことが本実験の limitation と考えられる。また、擦過傷害を行っていない右総頸動脈の評価を行っていない点、中膜のみの評価を行っている点も limitation として挙げられる。

RvD1 は *in vitro* での先行研究で 100nM までの濃度では動脈平滑筋細胞への細胞毒性を指摘されておらず(30)、また今回の実験で薬剤投与後に死亡したラットは認めなかったが、作用機序の解明や濃度と効果の相関、全身投与した際の有害事象の有無の検証が臨床応用する前の重要な課題と考えられた。

結論

抗炎症性脂質メディエータである Resolvin D1 と Protectin D1 isomer はラット頸動脈バルーン擦過モデルにおいて、静脈内投与という比較的簡便な方法で白血球や単球・マクロファージといった炎症細胞の局所浸潤と血管壁の細胞増殖を抑制し、同時に炎症性転写因子 NF κ B の活性を低下させ、また形態学的には新生内膜の増殖を抑制した。これらは現在、実臨床の場で行われている血管内治療後に起きる再狭窄の治療に対し応用可能と考えられるが、安全性などの更なる検証が必要と考えられた。

謝辞

本研究を遂行する機会及び御指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科外科学専攻腫瘍外科・血管外科 渡邊聡明前教授、石原聡一郎教授に深謝いたします。

最後に研究の計画や基礎的方法から結果の解釈、考察、発表に至るまで日々懇切な御指導を賜りました公立昭和病院心臓血管外科 宮原拓也先生(前東京大学医学部附属病院 特任講師)ならびに東京大学医学系研究科外科学専攻血管外科 保科克行講師には格別の御礼を申し上げます。

参考文献

1. Fowkes FG, Aboyans V, Fowkes FJ, McDermott MM, Sampson UK, Criqui MH. Peripheral artery disease: epidemiology and global perspectives *Nat Rev Cardiol.* 2017 Mar;14(3):156-170
2. McAloon CJ, Boylan LM, Hamborg T, Stallard N, Osman F, Lim PB, Hayat SA. The changing face of cardiovascular disease 2000-2012: An analysis of the world health organization global health estimates data. *Int J Cardiol.* 2016 Dec 1;224:256-264
3. 厚生労働省 平成 27 年厚労省人口動態統計
4. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med,* 340, 115-126
5. Smith SC Jr, Benjamin EJ, Bonow RO, Braun LT, Creager MA, Franklin BA, Gibbons RJ, Grundy SM, Hiratzka LF, Jones DW, Lloyd-Jones DM, Minissian M, Mosca L, Peterson ED, Sacco RL, Spertus J, Stein JH, Taubert KA. AHA/ACCF secondary prevention and risk reduction therapy for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2011 update: a guideline from the American Heart Association and American College of Cardiology

Foundation endorsed by the World Heart Federation and the Preventive Cardiovascular Nurses Association. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Nov 29; 58(23):2432-46.

6. Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, Bailey SR, Bittl JA, Cercek B, Chambers CE, Ellis SG, Guyton RA, Hollenberg SM, Khot UN, Lange RA, Mauri L, Mehran R, Moussa ID, Mukherjee D, Nallamothu BK, Ting HH; American College of Cardiology Foundation; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. 2011 ACCF/AHA/SCAI guideline for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2013 Oct 1; 82(4):E266-355.
7. Hillis LD, Smith PK, Anderson JL, Bittl JA, Bridges CR, Byrne JG, Cigarroa JE, Disesa VJ, Hiratzka LF, Hutter AM Jr, Jessen ME, Keeley EC, Lahey SJ, Lange RA, London MJ, Mack MJ, Patel MR, Puskas JD, Sabik JF, Selnes O, Shahian DM, Trost JC, Winniford MD; American

College of Cardiology Foundation; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; American Association for Thoracic Surgery; Society of Cardiovascular Anesthesiologists; Society of Thoracic Surgeons. 2011 ACCF/AHA Guideline for Coronary Artery Bypass Graft Surgery. A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Developed in collaboration with the American Association for Thoracic Surgery, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, and Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol.* 2011 Dec 6; 58(24):e123-210.

8. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG; TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg.* 2007 Jan; 45 Suppl S:S5-67.

9. Inoue T, Croce K, Morooka T, Sakuma M, Node K, Simon DI; Vascular inflammation and repair : implications for re-endothelialization, restenosis, and stent thrombosis. *JACC Cardiovasc Interv* 2011;4:1057-66

10. Born GV, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol.* 168: 178-195(1963)
11. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest.* 49:327-333(1983)
12. Wu B, Mottola G, Schaller M, Upchurch GR Jr, Conte MS. Resolution of vascular injury: Specialized lipid mediators and their evolving therapeutic implications. *Mol Aspects Med.* 2017 Dec;58: 72-82.
13. Ozaki Y, Violaris AG, Serruys PW. New stent technologies. *Prog Cardiovasc Dis.* 1996 Sep-Oct; 39(2):129-40.
14. Fredman G, Serhan CN. Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution. *Biochem J.* 2011 Jul 15;437(2):185-97
15. Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger KH, Hong S, Serhan CN. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J Immunol.* 2005 Apr 1;174(7):4345-55.

16. Serhan CN, Petasis NA. Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem Rev.* 2011 Oct 12; 111(10):5922-43
17. Serhan C. N., Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* 2005 Dec; 6(12):1191-7.
18. Serhan C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 2007;25: 101–137
19. Serhan C. N., Chiang N., Van Dyke T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* 2008 May;8(5):349-61.
20. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature.* 2014 Jun 5; 510(7503): 92–101.
21. Spite M, Norling LV, Summers L, Yang R, Cooper D, Petasis NA, Flower RJ, Perretti M, Serhan CN. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature.* 2009 Oct 29;461(7268):1287-91
22. Xia H, Chen L, Liu H, Sun Z, Yang W, Yang Y, Cui S, Li S, Wang Y, Song L, Abdelgawad AF, Shang Y, Yao S. Protectin DX increases

- survival in a mouse model of sepsis by ameliorating inflammation and modulating macrophage phenotype. *Sci Rep.* 2017 Mar 7;7(1):99
23. Duffield JS, Hong S, Vaidya VS, Lu Y, Fredman G, Serhan CN, Bonventre JV. Resolvin D Series and Protectin D1 mitigate acute kidney injury. *J Immunol.* 2006 Nov 1;177(9):5902-11
24. Gobbetti T, Dalli J, Colas RA, Federici Canova D, Bonnet D, Alric L, Vergnolle N, Deraison C, Hansen TV, Serhan CN, Perretti M. Protectin D1n-3 DPA and Resolvin D5n-3 DPA are effectors of intestinal protection. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2017 Apr 11;114(15):3963-3968
25. Morita M, Kuba K, Ichikawa A, Nakayama M, Katahira J, Iwamoto R, Watanebe T, Sakabe S, Daidoji T, Nakamura S, Kadowaki A, Ohto T, Nakanishi H, Taguchi R, Nakaya T, Murakami M, Yoneda Y, Arai H, Kawaoka Y, Penninger JM, Arita M, Imai Y. The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza. *Cell.* 2013 Mar 28;153(1):112-25
26. Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity.* 2014 Mar 20;40(3):315-27

27. Dangi B, Obeng M, Nauroth JM, Chung G, Bailey-Hall E, Hallenbeck T, Arterburn LM. Metabolism and biological production of resolvins derived from docosapentaenoic acid (DPA_n-6) *Biochem Pharmacol*. 2010 Jan 15;79(2):251-60.
28. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Fredman G, Serhan CN. Resolvin D1 receptor stereoselectivity and regulation of inflammation and proresolving microRNAs. *Am J Pathol*. 2012 May;180(5):2018-27
29. Clària J, López-Vicario C, Rius B, Titos E. Pro-resolving actions of SPM in adipose tissue biology. *Mol Aspects Med*. 2017 Dec;58:83-92.
30. Wu B, Mottola G, Chatterjee A, Lance KD, Chen M, Siguenza IO, Desai TA, Conte MS. Perivascular delivery of resolvin D1 inhibits neointimal hyperplasia in a rat model of arterial injury. *J Vasc Surg*. 2017 Jan;65(1):207-217
31. Mukherjee PK, Marcheselli VL, Serhan CN, Bazan NG. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 1; 101(22):8491-6

- 32.Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature*. 2007 Jun 14;447(7146):869-74.
- 33.Chen P, Véricel E, Lagarde M, Guichardant M. Poxyrins, a class of oxygenated products from polyunsaturated fatty acids, potently inhibit blood platelet aggregation. *FASEB J*. 2011 Jan;25(1):382-8
- 34.Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Lu Y, Siegelman J, Baer T, Yang R, Colgan SP, Petasis NA. Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. *J Immunol*. 2006 Feb 1;176(3):1848-59.
- 35.Chen P, Fenet B, Michaud S, Tomczyk N, Véricel E, Lagarde M, Guichardant M. Full characterization of PDX, a neuroprotectin/protectin D1 isomer, which inhibits blood platelet aggregation. *FEBS Lett*. 2009 Nov 3;583(21):3478-84.
- 36.Chen P, Véricel E, Lagarde M, Guichardant M. Poxyrins, a class of oxygenated products from polyunsaturated fatty acids, potently inhibit blood platelet aggregation. *FASEB J*. 2011 Jan;25(1):382-8

- 37.血管生物学事典 日本血管生物医学学会編集 佐藤靖史、森田育男、高倉伸幸、小室一成 監修、朝倉書店 2011 年
- 38.D. B. Landry, L. L. Couper, S. R. Bryant, V. Lindner Activation of the NF-kappa B and I kappa B system in smooth muscle cells after rat arterial injury. Induction of vascular cell adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1. *Am J Pathol.* 1997 Oct; 151(4): 1085–1095.
- 39.Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002 Dec 19-26; 420(6917): 868-74.
- 40.Yoshimura S, Morishita R, Hayashi K, Yamamoto K, Nakagami H, Kaneda Y, Sakai N, Ogihara T. Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis-element 'decoy' of nuclear factor-kappaB binding site as a novel molecular strategy. *Gene Ther.* 2001 Nov;8(21):1635-42.
- 41.Saito T, Hasegawa Y, Ishigaki Y, Yamada T, Gao J, Imai J, Uno K, Kaneko K, Ogihara T, Shimosawa T, Asano T, Fujita T, Oka Y, Katagiri H. Importance of endothelial NF-κB signalling in vascular remodelling

- and aortic aneurysm formation. *Cardiovasc Res.* 2013 Jan 1;97(1):106-14.
- 42.Miyahara, T., Runge, S., Chatterjee, A., Chen, M., Mottola, G., Fitzgerald, J.M. , Serhan CN, Conte MS. D-series resolvins attenuates vascular smooth muscle cell activation and neointimal hyperplasia following vascular injury. *FASEB J.* 2013; 4: 1–13
- 43.Akagi, D., Chen, M., Toy, R., Chatterjee, A., Conte, M.S. Systemic delivery of proresolving lipid mediators resolvins D2 and maresin 1 attenuates intimal hyperplasia in mice. *FASEB J.* 2015; 29: 2504–2513
- 44.Petri, M.H., Laguna-Fernandez, A., Tseng, C.N., Hedin, U., Perretti, M., Back, M. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 signals through FPR2/ALX in vascular smooth muscle cells and protects against intimal hyperplasia after carotid ligation. *Int J Cardiol.* 2015; 20: 370–372
- 45.カッツング薬理学 原書 10 版 柳沢輝行・飯野正光・丸山敬・三澤美和 監訳 丸善株式会社 2009 年
- 46.図解・実験動物技術集 I 14 ページ、株式会社アドスリー 日本実験動物技術者協会 図解・実験動物技術集編集委員会 2005 年 東京 丸善株式会社出版事業部

47. Keyes KT, Ye Y, Lin Y, Zhang C, Perez-Polo JR, Gjorstrup P, Birnbaum Y. Resolvin E1 protects the rat heart against reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Jul; 299(1):H153-64
48. Zhao Q, Wu J, Lin Z, Hua Q, Zhang W, Ye L, Wu G, Du J, Xia J, Chu M, Hu X. Resolvin D1 Alleviates the Lung Ischemia Reperfusion Injury via Complement, Immunoglobulin, TLR4, and Inflammatory Factors in Rats. *Inflammation*. 2016 Aug;39(4):1319-33
49. Landry DB, Couper LL, Bryant SR, Lindner V. Activation of the NF-kappa B and I kappa B system in smooth muscle cells after rat arterial injury. Induction of vascular cell adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1. *Am J Pathol*. 1997 Oct; 151(4):1085-95.
50. Monaco C, Paleolog E. Nuclear factor kappaB: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Res*. 2004 Mar 1;61(4):671-82
51. Breuss JM, Cejna M, Bergmeister H, Kadl A, Baumgartl G, Steurer S, Xu Z, Koshelnick Y, Lipp J, De Martin R, Losert U, Lammer J, Binder BR. Activation of nuclear factor-kappa B significantly contributes to

lumen loss in a rabbit iliac artery balloon angioplasty model. *Circulation*.
2002 Feb 5;105(5):633-8.

52. Yamasaki K, Asai T, Shimizu M, Aoki M, Hashiya N., Sakonjo H,
Makino H, Kaneda Y, Ogihara T, Morishita R. Activation of the NF- κ B
and Ik B system in smooth muscle cells after rat arterial injury. *Gene
Ther*. 2003 Feb 10(4) 356-64

53. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and
atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2003 Oct;170(2):191-203.

54. Soehnlein O. Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res*.
2012 Mar 16;110(6):875-88.