

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 牧野 能久

【序文】

現在、動脈硬化性疾患は欧米諸国で死因の首位、日本でも悪性新生物に次ぐ2位となっているが、その原因となるアテローム性動脈硬化症の発生機序は傷害反応説に集約されている。①血管内皮傷害によってサイトカイン・増殖因子の産生、②好中球やリンパ球の傷害部位への遊走、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、⑤内膜肥厚の形成がその主なメカニズムであり、炎症性細胞の浸潤を伴う動脈壁の炎症反応と考えられている。

冠動脈疾患や閉塞性動脈硬化症における治療は薬物療法が第一選択だが、進行すると血管内治療やバイパス手術が必要となる。再狭窄は長期開存を妨げる要因となっているが、それを防ぐために1990年代に薬剤溶出性ステントが実用化されたものの、全身投与により内膜肥厚抑制効果を認める薬剤は少なく、今回検討することとした。

炎症反応についてであるが、近年まで炎症反応が惹起される段階でアラキドン酸カスケードによりプロスタグランジンやロイコトリエンといった炎症性メディエータが産生され、それらの産生減少により自然と軽快に向かうと考えられてきたが、近年では抗炎症性メディエータ(specialized proresolving mediator: SPM)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。SPMとしてはLipoxin、Resolvin、Protectin、Maresinの4種類が同定されており、Lipoxinはアラキドン酸より、Resolvin E群はエイコサペンタエン酸(EPA)より、Resolvin D群とProtectin、Maresinはドコサヘキサエン酸(DHA)より代謝・産生される。これらのSPMの抗炎症作用に関しては腹膜炎モデルや腎虚血モデル、炎症性腸疾患モデルや新型インフルエンザを用いたモデルで検証されている。

SPMと動脈の内膜肥厚との関係についての先行研究では、Resolvin D1(RvD1)及びResolvin D2(RvD2)をウサギ大腿動脈擦過モデルに局所投与で用いた研究、RvD2とMaresin 1をマウス動脈結紮モデルに腹腔内投与で用いた研究、RvD1をラット頸動脈擦過モデルの動脈周囲にラップやゲルを使用して投与した研究、Lipoxin A4をマウス動脈結紮モデルに浸透圧ポンプを使用して用いた研究があり、いずれも内膜肥厚抑制効果を示した。ただそれらの投与経路は、いずれも直接臨床応用するには困難又は複雑であると考えられる経路であった。またProtectin D1 isomer(PD1 iso)は好中球浸潤抑制や血小板凝集抑制などの効果が報告されているものの、動脈の内膜肥厚との関連についての先行研究は認めなかった。以上より、今回の実験ではバルーンにより血管内皮を傷害し内膜肥厚を形成するモデルであるラット頸動脈擦過モデルに対し、RvD1

と PD1 iso を、臨床現場で一般的に行われている経静脈的に投与し、内膜肥厚に与える効果と背景を調べることとした。

【実験概要】

ラット頸動脈擦過モデルを作製し、尾静脈より RvD1 と PD1 iso を経静脈的に投与した。RvD1 と PD1 iso の投与は擦過直後と 2 日後に行い、急性期の評価を 3 日後に、内膜肥厚の評価を 14 日後に行うこととした。

まず 12~14 週齢のオスの Sprague Dawley ラットを全身麻酔下に仰臥位とし、左総頸動脈・内頸動脈・外頸動脈を露出、外頸動脈より 2Fr Fogarty balloon を中枢側に挿入して総頸動脈を全長に渡って 3 回擦過して頸動脈擦過モデルを作製した。擦過直後と 2 日後に尾静脈より RvD1 又は PD1 iso を $1\mu\text{g}$ /匹投与、control に対しては 1%エタノールを投与した。

ラット頸動脈擦過モデルの経過だが、血管壁平滑筋細胞の増殖は傷害後 2 日目に peak を迎え、増殖はその後続くものの傷害後約 2 週間で細胞数は一定となる。その後も細胞外基質(extracellular matrix: ECM) の沈着により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。このことから SPM の 2 回目の投与は動脈壁での細胞増殖の peak となる 2 日後とし、急性期の動脈壁への炎症性細胞の遊走や動脈壁での細胞増殖、炎症性転写因子 NF κ B の活性の評価を 3 日後に、内膜肥厚の評価を 14 日後に行うこととした。

左総頸動脈の検体摘出は全身麻酔下に行い、起始部より内・外頸動脈分岐部まで摘出した。急性期の評価を行うものは瞬間凍結し、内膜肥厚を検討する検体は 4%パラホルムアルデヒドで固定した。

【評価】

急性期の評価は擦過後 3 日目の検体を用いて白血球浸潤(抗 CD45 抗体)・マクロファージ/単球浸潤(抗 CD68 抗体)・動脈壁の細胞増殖(抗 Ki67 抗体)を免疫染色で行うと共に、動脈壁の炎症性転写因子 NF κ B の活性を ELISA 法を用いて行った。また内膜肥厚の評価は擦過後 14 日目の検体を Hematoxylin Eosin(HE)染色し、新生内膜(NI)と中膜(M)の面積比である NI/M 比を算出することで比較した。

免疫染色による評価であるが(n=6)、摘出した左外頸動脈を 5 等分し、中央部の 3 検体より 1 か所ずつ $6\mu\text{m}$ の厚さで検体を切り出し、アセトン固定を行った後、各一次抗体を使用し免疫染色を行った。最後に核染色を行い、免疫染色で染まった細胞数と動脈壁(中膜)の細胞数の比率を切り出した 1 検体につき動脈壁の 6 か所で算出し、平均値の差の検定を行った。

ELISA 法を用いた動脈壁の NF κ B 活性の評価であるが(n=6)、摘出した検体を homogenize し、核抽出液を作製、活性と吸光度が一次直線的に相関する ELISA kit を用いて吸光度を測定し、平均値の差の検定を行った。

内膜肥厚の評価であるが(n=7)、摘出した左総頸動脈を 5 等分し、中央部の 3 検体より 1 か所ずつ $6\mu\text{m}$ の厚さで検体を切り出し、HE 染色を実施。各断面の新生内膜と中膜の面積を画像解析ソフトで測定し NI/M 比を算出、平均値の差の検定を行った。

平均値の差の検定は統計ソフトウェア JMP Pro 11.0 を用いて 3 群間の比較を one-way

ANOVA 法を用いて行い、有意差を認めた場合には Turkey 法で各群間の比較を行った。 $P < 0.05$ を有意水準とした。

【結果】

擦過後 3 日目における中膜の細胞全体に対する白血球(CD45 陽性細胞)の割合は control 群で $7.2 \pm 4.1\%$ 、RvD1 投与群で $1.6 \pm 1.4\%$ 、PD1 iso 投与群で $2.2 \pm 1.1\%$ であった。3 群間に有意差を認め($P=0.003$)、RvD1 投与群($P=0.005$) と PD1 iso 投与群($P=0.01$) の両方で有意に白血球浸潤は抑制された。一方、RvD1 投与群と PD1 iso 投与群の間では有意差は認められなかった($P=0.93$)。同様に単球/マクロファージ(CD68 陽性細胞)の中膜の細胞全体に対する割合は、control 群で $4.6 \pm 1.9\%$ 、RvD1 投与群で $0.98 \pm 0.57\%$ 、PD1 iso 投与群で $1.3 \pm 0.39\%$ で、3 群間に有意差を認め($P=0.001$)、RvD1 投与群($P=0.002$) と PD1 iso 投与群($P=0.006$) の両方で有意に単球/マクロファージ浸潤は抑制された。一方、RvD1 投与群と PD1 iso 投与群の間では有意差は認められなかった($P=0.86$)。また中膜の細胞全体に対する増殖細胞(Ki67 陽性細胞)の割合は Control 群で $21.9 \pm 8.8\%$ 、RvD1 投与群で $4.1 \pm 2.6\%$ 、PD1 iso 投与群で $5.2 \pm 2.7\%$ で、3 群間に有意差を認め($P < 0.001$)、RvD1 投与群($P=0.001$) と PD1 iso 投与群($P=0.003$) の両方で有意に細胞増殖は抑制された。一方、RvD1 投与群と PD1 iso 投与群の間では有意差は認められなかった($P=0.93$)。

擦過後 3 日目の動脈壁の炎症性転写因子 NF κ B 活性を ELISA 法で測定し、吸光度は Control 群で 0.136 ± 0.011 、RvD1 投与群で 0.102 ± 0.005 、PD1 iso 投与群で 0.119 ± 0.009 であった。3 群間に有意差を認め($P < 0.001$)、RvD1 投与群($P < 0.001$) と PD1 iso 投与群($P=0.003$) の両方で有意に NF κ B 活性は抑制された。一方、RvD1 投与群と PD1 iso 投与群の間では、RvD1 投与群でより有意に抑制された($P=0.004$)。

擦過後 14 日目の左総頸動脈の NI/M 比は Control 群で 1.23 ± 0.17 、RvD1 投与群で 0.72 ± 0.18 、PD1 iso 投与群で 0.82 ± 0.16 であった。3 群間に有意差を認め($P < 0.001$)、RvD1 投与群($P < 0.001$) と PD1 iso 投与群($P < 0.001$) の両方で有意に NI/M 比は抑制された。一方、RvD1 投与群と PD1 iso 投与群の間では有意差は認められなかった($P=0.51$)。

【考察】

RvD1 と PD1 iso の投与により擦過後 3 日目の白血球・単球/マクロファージの浸潤が抑制され、中膜の細胞増殖と炎症性転写因子である NF κ B 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。

先行研究における投与経路は動脈内局所投与や腹腔内投与、浸透圧ポンプやラップ・ゲルを用いた投与など、直接臨床応用するのは複雑・困難と考えられた。また先行研究において RvD1 とその受容体である ALX(FPR2)や GPR32 との結合は 5 分程度で peak となり、また濃度依存性に結合が増強することが知られていた。そのため短時間で急速に血中濃度を上昇させる静脈内注射は簡便性と有効性を両立する投与経路と考えられた。

NF κ B はバルーン傷害後の血管平滑筋細胞や vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1)や monocyte chemotactic protein -1(MCP-1)の活性化において重要な役割を担っており、その抑制

より新生内膜の増殖は抑制されることが知られている。今回 RvD1、PD1 iso 投与により NFκB 活性が抑制されており、RvD1、PD1 iso の新生内膜増殖を抑制する経路の一つに NFκB を介する経路があると考えられた。一方、NFκB 活性は RvD1 投与により、より強く抑制されたにも関わらず、炎症細胞の浸潤や細胞増殖、内膜増殖で差がつかなかった背景には inhibitory concentration for 50% effect に対し十分高濃度であったため、有意差がつかなかった可能性が考えられた。

Resolvin と Protectin の効果について、先行研究における Resolvin D 群や Protectin D 群の抗炎症作用の強度に関しては差を認めており、その作用の強弱に関しては今後の検討課題である。

作用機序に関してだが、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-1 β 、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-1 β 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。

SPM は受容体や作用機序に未解明な点もあり、今後の検討課題である。

【結論】

RvD1 と PD1 iso はラット頸動脈擦過内膜肥厚モデルにおいて、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 NFκB の活性を低下させ、新生内膜の増殖を抑制した。これらは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。