

p38 MAP kinase を介した静脈グラフトの内膜肥厚抑制

課題番号 : 14571119

平成 14 年度～平成 15 年度科学研究費補助金 (基盤研究 C) (2) 研究成果報告書

平成 16 年 3 月

研究代表者 赤坂 伸之

(旭川医科大学医学部)

# p38 MAP kinase を介した静脈グラフトの内膜肥厚抑制

課題番号 : 14571119

## 研究組織

|       |       |                 |
|-------|-------|-----------------|
| 研究代表者 | 赤坂 伸之 | (旭川医科大学医学部助手)   |
| 研究分担者 | 東 信良  | (旭川医科大学医学部講師)   |
|       | 内田 恒  | (旭川医科大学医学部助手)   |
|       | 稲葉 雅史 | (旭川医科大学医学部助教授)  |
|       | 笹嶋 唯博 | (旭川医科大学医学部教授)   |
| 研究協力者 | 清水 紀之 | (旭川医科大学医学部大学院生) |

## 研究経費

|          |          |
|----------|----------|
| 平成 14 年度 | 2,400 千円 |
| 平成 15 年度 | 1,100 千円 |
| 計        | 3,500 千円 |

## 研究発表

### 口頭発表

1) 清水紀之、東信良、赤坂伸之、平田哲、西川智之、森下竜一、金田安史、  
笹嶋唯博.

静脈グラフトにおける移植後 NF $\kappa$ B の活性化と decoy 導入による内膜肥厚抑制  
の検討. 第 34 回日本心臓血管外科学会総会. 2004

2) 清水紀之、東信良、赤坂伸之、平田哲、西川智之、森下竜一、金田安史、  
笹嶋唯博. HVJ-Envelope 法を用いた NF $\kappa$ B decoy 導入による移植静脈グラフト  
内膜肥厚抑制の検討. 第 105 回日本外科学会総会. 2004

3) Nobuyoshi Azuma, Masashi Inaba, Nobuyuki Akasaka, Takayuki Kadohama,  
Kazutomo Goh, and Tadahiro Sasajima. Limb salvage achieved by paramalleolar bypass  
with topical treatment. International symposium for Critical Limb Ischemia. The 32nd  
Annual Meeting of Japanese Society for Vascular Surgery. 2004

## 緒 言

血管は、shear stress や内圧などによる物理的ストレスや虚血再灌流や炎症にともなう生物学的なストレスなど各種のストレスを受け、それに対して各種の chemical mediator やサイトカインを分泌したり、細胞のアポトーシスや増殖などにより反応しリモデリングを引き起こしている。p38 Mitogen activated protein kinase (p38 MAP kinase) は、ストレス応答 MAP kinase として多くの細胞での役割が報告されており、我々は、血管内皮細胞や平滑筋細胞においても、p38 MAP kinase がこうしたストレスに対する反応において重要な細胞内情報伝達システムとして機能していることを見いだしてきた。<sup>1, 2)</sup>

一方、自家静脈グラフトの内膜肥厚は、多くの研究者による長年の研究にも関わらず未だに解決方法が確立されていない重要な問題である。小口径領域の動脈閉塞症に対して最も重要な代用血管である自家静脈グラフトは、その20%程度に内膜肥厚が発生し、再手術の原因になったり、時にはグラフトを閉塞せしめて下肢切断の原因になり、糖尿病性足壊疽が増加の一途である今日、解決を急がねばならない問題の一つである。我々は、この自家静脈内膜肥厚が、静脈が採取され動脈環境に移植される際のストレスに対する過剰なリモデリング反応の結果であるという仮説のもと、自家静脈グラフト移植における p38 の役割とその制御を行うことを目的に本研究に着手した。

結果的に、p38 は自家静脈移植モデルにおいて重要な蛋白では無いことが明らかとなったが、p38 にかかわって、炎症に関わる重要なサイトカインを制御し、p38 と同様にストレス応答に多いに関連する転写因子である Nuclear Factor kappa B (NFkB) が重要であることが判明したので、その研究成果を報告する。

## 材料と方法

雑種成犬の下肢静脈（伏在静脈）を採取し、これを、同じイヌの大腿動脈に移植し（大腿動脈置換モデル）、一定期間後に移植した静脈グラフトを摘出して以下の項目について検討を行った。なお、移植実験の際には、ケタラール筋注と静脈麻酔を併用した全身麻酔を行い、術中はヘパリンナトリウムを使用して血管移植を行い、血管吻合には拡大鏡下、8-0 プロピレン系の連続縫合を用いた。

### 1. 移植後自家静脈の形態学的観察および内膜肥厚の評価

移植後摘出した自家静脈グラフトを 100mmHg にて加圧しつつホルマリン固定

し、パラフィン切片を作成して、H-E 染色、Elastica von Gieson (EVG) 染色を行い、内膜肥厚、内皮細胞の状態、接着細胞の有無、中膜平滑筋細胞の状態などを観察した。また、EVG 染色切片の光学顕微鏡像をコンピュータに取り込み、内膜肥厚部分をトレースして、内膜肥厚面積を求めた。イヌの個体差により血管径や血管厚が異なるため、それらを標準化する目的で、内腔面積を同様に求めて、内膜肥厚面積/内腔面積の値をもって内膜肥厚を評価した。

## 2. 静脈グラフトの蛋白採取ならびにウエスタンブロッティング

摘出した静脈の中枢側半分を摘出後内腔をヘパリン化生理食塩水で洗い、直ちに液体窒素にて凍結し、蛋白実験を行った。組織を凍結したまま粉碎し、lysis buffer 内で蛋白を細胞質分画と核分画に分離して採取し、蛋白量を測定して、蛋白量が各サンプル間で一定になるように調整した後、サンプルを SDS-PAGE にて泳動した後、ウエスタンブロッティングを施行した。用いた抗体は、p38 実験では、anti-p38 MAP kinase antibody (rabbit), anti-phospho p38 MAP kinase antibody (mouse), beta-actin antibody (mouse), NFkB 実験においては、anti-phospho IκB antibody (mouse) と beta-actin antibody (mouse) を用い、2 次抗体はそれぞれの抗体の動物種の IgG に対する抗体を用いた。

## 3. NFκB デコイオリゴデオキシヌクレオチドの血管内導入とその効果の評価

転写因子 NFκB の活性化を抑制する目的で、NFκB のコンセンサスシーケンスを配列したオリゴヌクレオチドを作成し、これをデコイ（おとり）として血管壁細胞内に導入する実験を追加した。デコイの配列は以下の通り。

5'-CCT TGA AGG GAT TTC CCT CC-3'

3'-GGA ACT TCC CTA AAG GGA GG-5'

デコイを血管壁細胞に導入する手段として、HVJ-Envelope Vector を用いた。HVJ-Envelope Vector は HVJ を不活化しその膜性分のみを利用したベクターで、多種類の細胞に効率よく遺伝子導入できることで注目されている。この HVJ-Envelope に NFκB を封入して、採取した静脈グラフトに ex-vivo で遺伝子導入し、NFκB デコイの移植血管における内膜肥厚抑制効果について検討した。対照として、機能を有しない配列の Scramble デコイを導入した血管 (Scramble

デコイ群) を移植して、NFkB デコイ群と比較した。

なお、上記の遺伝子導入法については、マーカー (ビオチン) を結合したデオキシオリゴヌクレオチドを血管壁細胞に導入する予備実験を行って、目的遺伝子が内皮細胞および中膜浅層平滑筋細胞の細胞核まで導入されていることを証明した。

## 結 果

### 1. 静脈グラフト移植後の p38 MAP kinase の役割

p38 MAP kinase のウエスタンブロットによる解析では、静脈グラフト移植後 30 分後、2 時間後、2 日後、7 日後のいずれのタイミングでもほとんど phospho-p38 MAP kinase の発現を認めず、p38 の活性化が認められなかった (図 1)。繰り返し実験を行い、わずかな活性を認めるものもあったが、再現性に乏しく、多少の活性化があったとしても、p38 MAP kinase はあまり重要な役割を果たしていないのではないかという結論を得た。

### 2. 他のストレス応答性因子の検討

#### ー静脈グラフト移植における NFkB の活性化ー

静脈グラフトの移植後早期の変化は、図 2 に示すとおり、内膜側に多数の炎症細胞の接着を認めることから何らかの炎症性サイトカインや接着分子発現が起こっているものと考えられる。p38 MAP kinase 以外にストレス応答性の蛋白として炎症性サイトカインやアポトーシスに関連の深い転写因子である NFkB に着目し、以下にその実験を行った。

移植静脈を 30 分後、2 時間後、2 日後、7 日後にそれぞれ摘出し、上記の如く速やかに静脈を凍結し、蛋白を採取し、NFkB 活性化に必須の IκB の活性化すなわちリン酸化 IκB をウエスタンブロットにて測定した (図 3)。図の如く、リン酸化 IκB は、移植後 2 時間から 2 日目でその活性がピークに達し、以後漸減した。

### 3. 静脈グラフト移植後内膜肥厚における NF $\kappa$ B の役割

NF $\kappa$ B デコイを導入した静脈グラフトと Scramble デコイを導入したグラフトをそれぞれイヌ大腿動脈に移植し、1ヶ月後に摘出して組織標本にて形態観察を行った結果、図4の如く、コントロールである Scramble デコイ群に比べて、NF $\kappa$ B 群では明らかに内膜肥厚が抑制されており、コンピュータによる計測の結果、有意に内膜肥厚面積の抑制を確認した ( $p < 0.05$ ) (図5)。

## 考 察

p38 MAP kinase に着目し実験を行った結果、p38 MAP kinase そのものはあまり静脈グラフト内膜肥厚に深く関与していなかったが、その他のストレス応答性の情報伝達系を検討した結果、NF $\kappa$ B の活性化を明らかとなり、さらにその NF $\kappa$ B の活性化をブロックすることにより内膜肥厚を抑制できたことは、NF $\kappa$ B が静脈グラフト内膜肥厚に深く関与していることを示唆する所見であると考えられた。

NF $\kappa$ B はその下流で炎症性サイトカインや接着分子を発現する遺伝子を活性化することから炎症や自己免疫疾患、移植などの分野で多く研究されているが、頸動脈擦過実験モデルで内膜肥厚に関与していることを示唆する研究も報告されている。

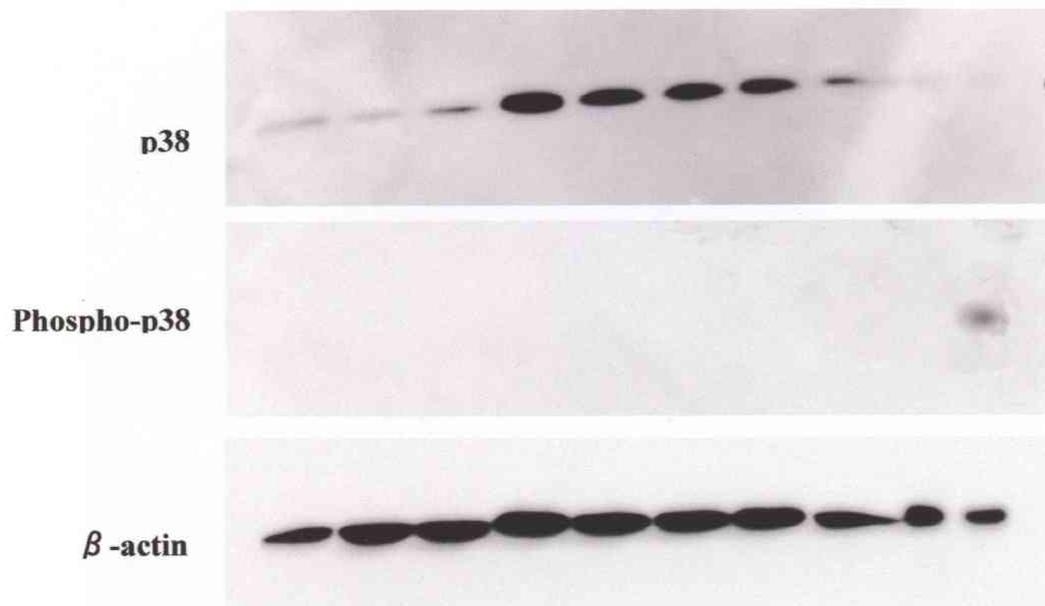
静脈グラフトにおいても NF $\kappa$ B が活性化していることを明らかにした報告はこれまで無く、本研究において得られた新たな知見である。NF $\kappa$ B が重要であるということは、これまで内膜肥厚の主因と考えられてきた血流などの物理的刺激や各種の増殖因子などの他に、炎症という新たな要因の重要性を物語るものであり、興味深い。

さらに、静脈グラフト内膜肥厚が多くの研究者による長年の研究にもかかわらず未解決である中で、本研究では、NF $\kappa$ B デコイを使用して内膜肥厚を抑制できることを示した点でも重要である。

今後は、NF $\kappa$ B 活性化のダウストリーム解析や NF $\kappa$ B デコイの長期成績などを明らかにするとともに、遺伝子導入の方法を詳細に検討し、臨床へ応用するための安全性や倫理性、および長期成績などを確立する必要がある。

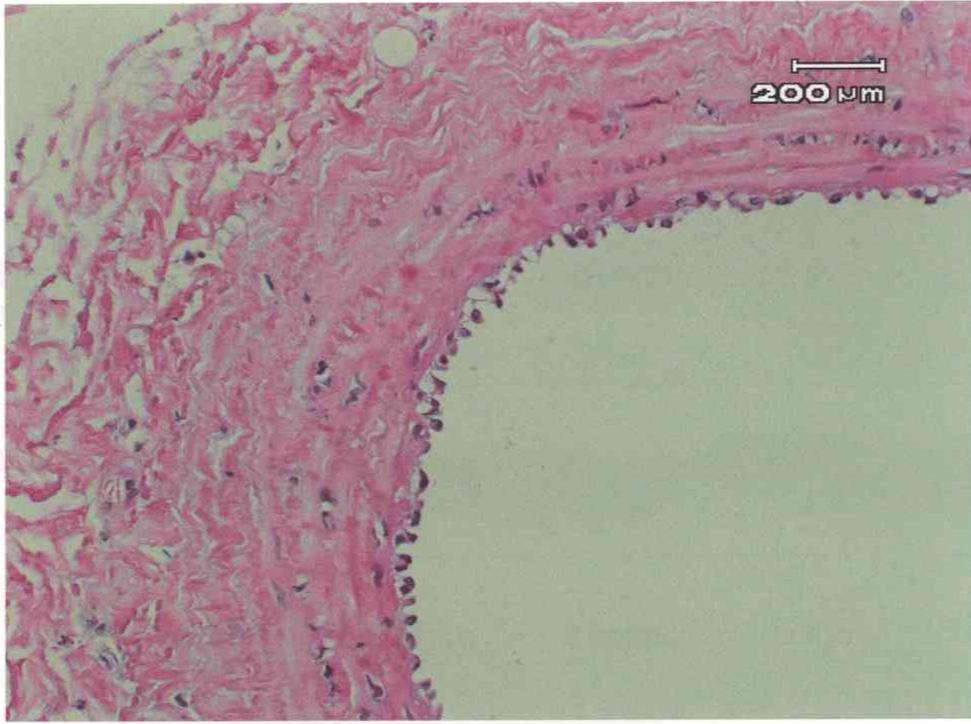
## 文 献

- 1) Nobuyoshi Azuma, Aydin Duzgun, Masataka Ikeda, Hiroyuki Kito, Nobuyuki Akasaka, Tadahiro Sasajima, Bauer E. Sumpio. Endothelial cell response to different mechanical forces. *J Vasc Surg* 32:789-94, 2000
  
- 2) Nobuyoshi Azuma, Nobuyuki Akasaka, Hiroyuki Kito, Masataka Ikeda, Vivian Gahtan, Tadahiro Sasajima, Bauer E. Sumpio. Role of p38 MAP kinase in endothelial cell alignment induced by fluid shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H189-97, 2001

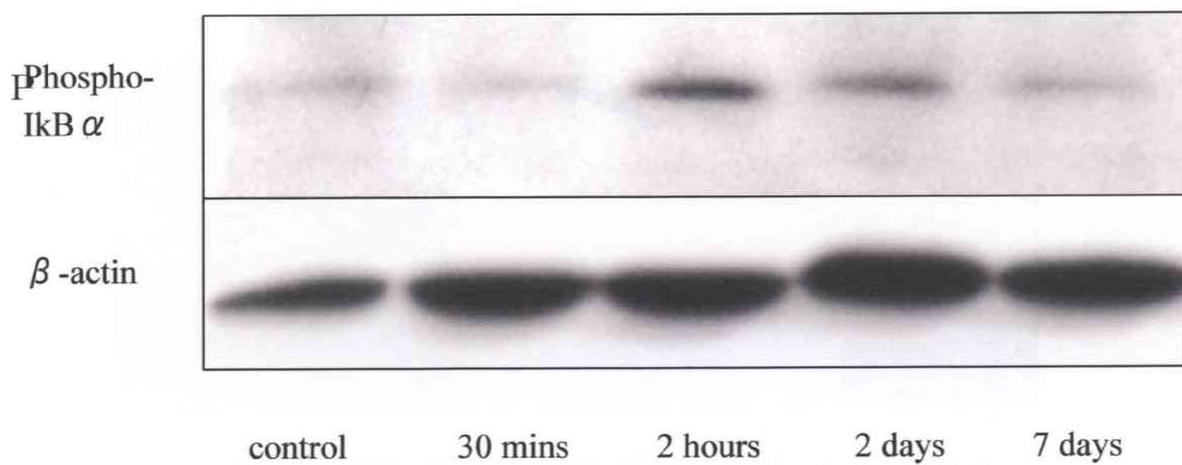


Western blotting of phospho-p38 and p38 protein in the cytoplasm of vein graft. Lane 1 : vein graft before grafting, Lane 2 : 30 min after grafting, Lane 3 : 2 h after grafting, Lane 4 : 2 days after grafting, Lane 5,6,7 : 7 days after grafting (different graft), Lane 8 : vein graft treated with  $\text{TNF } \alpha$  for 15 min, Lane 9 : HeLa cell extract, Lane 10 : HeLa cell extract treated with  $\text{TNF } \alpha$ .

$\beta$ -actin was detected to control the amount of protein loaded in each lane of the gel.



Cross-section of canine vein graft 2days after grafting. H-E stain



Western blotting of protein extracted from canine vein graft with anti-phospho IkB antibody

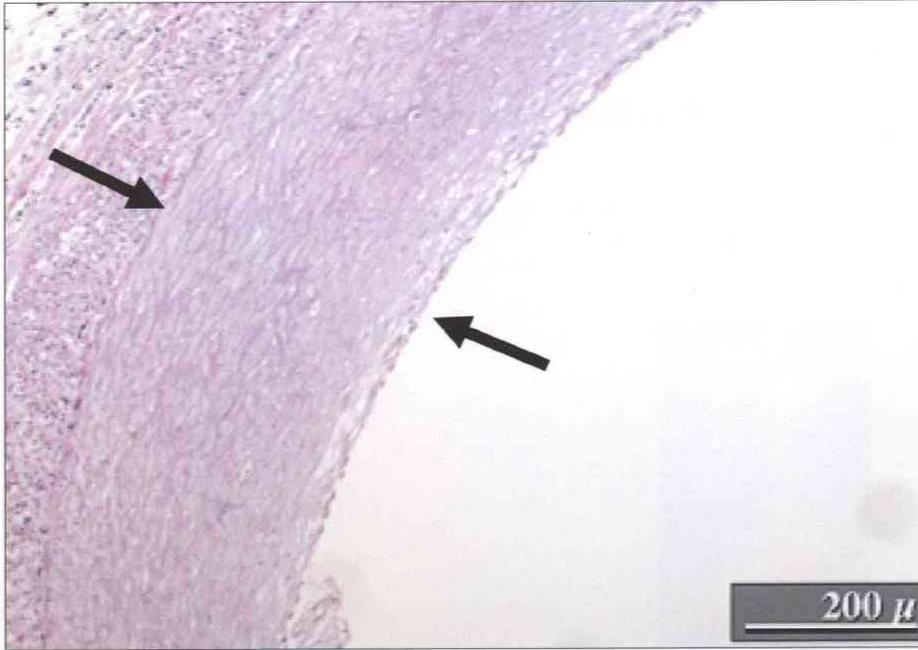


图 4 A : Cross-section of vein graft (scramble decoy group)

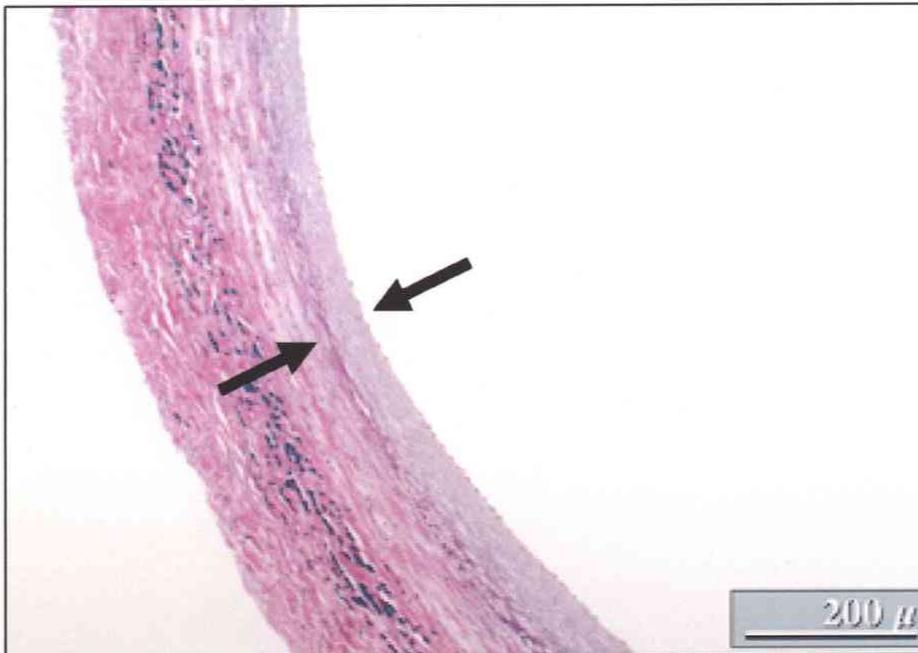


图 4 B : Cross-section of vein graft (NFkB decoy group)

Intimal area/Luminal area

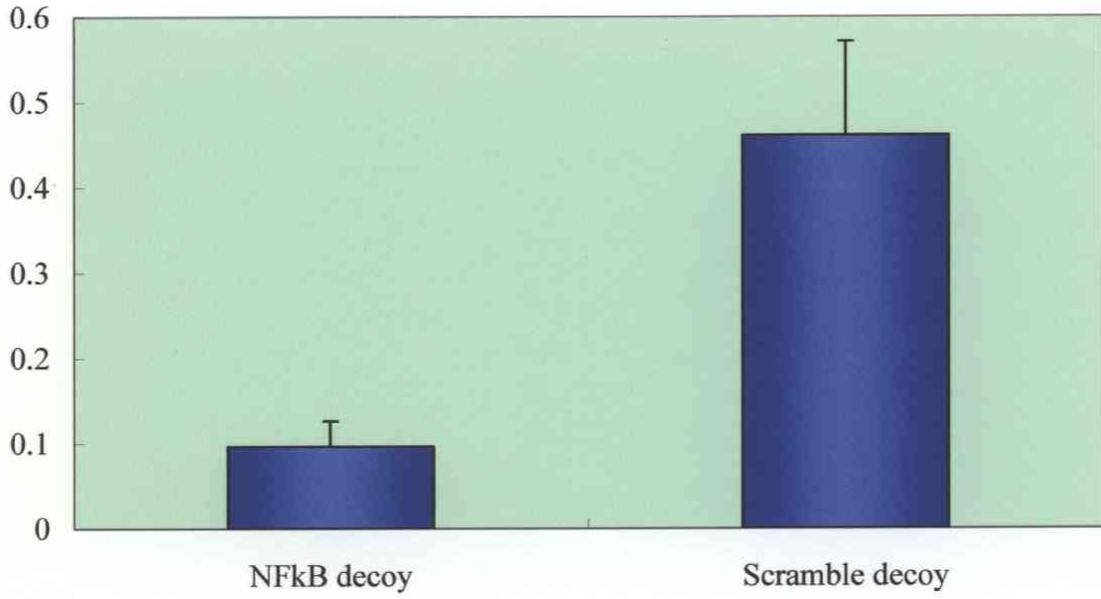


图 5