

学位の種類	博士	氏名	赤坂 伸之
-------	----	----	-------

学位論文題目

Lipo-prostaglandin E₁ is absorbed by vascular smooth muscle cells and
may enhance re-endothelialization of vein grafts.

(リポプロスタグランディン E₁ は平滑筋細胞により吸収され
静脈グラフトの内皮化を促進しうる。)

共著者名

山崎弘資、石川雅彦、古屋淳宏、平沢雅敏、稲葉雅史、郷一知、笹嶋唯博

J. Cardiovascular surgery 誌 43 巻 (以下未定) 平成 14 年掲載予定

研究目的及び背景

静脈グラフトは単径部以下の動脈や冠動脈のバイパスに用いられるが、大部分の内皮細胞は移植直後に脱落し、その再生は移植後3日目から始まり、早くても移植7日で約80%になる¹。内皮再生完了は内膜肥厚の発生を抑制し、グラフトは生物学的に安定した血管となる。しかし静脈グラフトは術式に関らず約70%の5年開存率で、冠動脈バイパス術の内胸動脈より20%以上低値であり、その主原因は移植後2年以内に発症する進行性内膜肥厚によるグラフト狭窄で、15-20%開存率を低下させる。

内膜肥厚抑制ためのアプローチは主として2つに大別される。即ち、内膜肥厚の原因をなす平滑筋細胞自身の増殖、遊走抑制と内皮再生促進により2次的に平滑筋細胞の増殖、遊走を停止することである。

一方 PGE₁ 及び PGE₁ を小脂肪球で被覆した Lipo-prostaglandin E₁ (LPGE₁) は血管拡張薬として臨床使用されているが、細胞内の cAMP の増加によるアポトーシス抑制や、細胞保護及び平滑筋細胞での血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の分泌などが知られている。

そこで、本研究では、PGE₁ の内皮細胞促進効果を明らかにするため、LPGE₁ の内皮細胞及び平滑筋細胞の取り込み及び、静脈グラフトの再内皮化における LPGE₁ の効果を検討した。

研究 方 法

<培養細胞の取り込み> 培養内皮細胞と平滑筋細胞を雑種成犬の頸静脈から採取し、PGE₁濃度が 5, 50, 及び 250 ng/ml の DiI-LPGE₁(DLPGE₁; 100µg DiI/ml LPGE₁)を加えた培養液に室温で2時間インキュベートした。細胞への取り込みを標準ローダミン励起法で蛍光顕微鏡にて観察した。同様に 0.5, 5, 50 ng/ml の濃度でインキュベートし Flow cytometry 法でアッセイを行いそのヒストグラムを解析した。

<移植実験> 18頭の雑種成犬(体重 9-20 kg)をサイアミラール麻酔下に気管内挿管後、両側大腿静脈を採取し、1時間ヘパリン化生食に浸漬した後に対側の大腿動脈に移植した。うち9頭に0.2 µg/kg の LPGE₁を2週間投与し(I群)、非投与の残り9頭をコントロール(II群)とした。移植後3, 7及び21日に静脈グラフトを採取し、塗銀染色法で染色した後、40×の実体顕微鏡下にビデオを用いて画像解析装置に60画面を取り込み、内皮細胞の被覆面積率(%EC)を測定した。

測定値は平均 ± 標準誤差で表示し、%ECの2群間の比較は Mann-Whitney test を用い、p < 0.05 を有意とした。

結 果

<DLPGE₁の取り込み> 平滑筋細胞では5 - 250ng/ml DLPGE₁の全濃度で DiI の蛍光を認めた。それに対して内皮細胞では、250ng/ml でも蛍光は明らかではなかった。Flow cytometry 法においては 内皮細胞のヒストグラムは DLPGE₁ 0.5, 5, 50ng/ml で有意変化を認めないのに対し、平滑筋細胞のヒストグラムでは濃度に順じた大きさの特異な集積を認めた。この特異な集積は内皮細胞では DLPGE₁非投与の平滑筋細胞と同様にどの濃度でも認めなかった。以上の結果から LPGE₁はまず平滑筋細胞に取り込まれてから PGE₁が放出され、その後平滑筋細胞自身及びおそらくは内皮細胞にも作用するというメカニズムを推察された。

<%EC> I群の3, 21日に採取した各1例に閉塞を認めた。I群の移植後3, 7及び21日での%ECは、33.4 ± 7.8, 58.4 ± 1.9 及び 80.3 ± 5.5 %で、II群では26.1 ± 2.6, 31.6 ± 6.8 及び 80.3 ± 6.2 %であり、移植後7日の%ECは有意に高値を示した(p < 0.05)。この結果は、LPGE₁が静脈グラフトの内皮再生を促進することを示した。

考 察

PGE₁の作用機序は未だ十分に解明されていないが、これまでは内皮細胞に取り込まれると考えられてきた²。しかし今回の培養細胞による試験では、LPGE₁は臨床使用時の推定血中濃度以下の0.5ng/mlでも平滑筋細胞に旺盛に取り込まれるのに対し、内皮細胞には

薬理学的通常量ではまったく取り込みを認めなかった。プロスタノイドは親水性が低く細胞膜に付着、通過しにくい、小脂肪球で包まれた LPGE₁は細胞膜への親和性が増加し、レセプターを介したエンドサイトーシスにより平滑筋細胞に取り込まれるものと考えられる。吸収後の LPGE₁の挙動は未だ明らかでない部分が多い。細胞膜上で PGE₁は PGE₂やプロスタサイクリンのレセプターに結合するが、二つの経路がある³。一つは PG トランスポーター、もう一つはレセプター関連のエンドサイトーシスであり、free PGE₁は前者、LPGE₁は後者のメカニズムで作用する。平滑筋細胞に取り込まれた LPGE₁は PGE₁を放出し、平滑筋細胞のレセプターに結合して cAMP を増加させ、一部は残存している内皮細胞のレセプターに結合する可能性が考えられる。これらのメカニズムは LPGE₁が free PGE₁よりも作用時間が長いという臨床所見と矛盾しない。媒体となる小脂肪球自体には生物学的な作用はないと言う報告が多い。

平滑筋細胞の分裂、遊走抑制は 内膜肥厚を抑制するアプローチの一つである。PGE₁は平滑筋細胞における cAMP を増加し、DNA 合成を阻害して結果的に分裂を抑制する。また Umemura らは紫外線で損傷したラット大腿動脈に対して、PGE₁連続投与により内膜肥厚が抑制されたと報告している。もう一つのアプローチとしてエストロゲンや、VEGF 投与による内皮再生促進にて内膜肥厚が抑制されたとする報告がある。平滑筋細胞では cAMP が VEGF を分泌するのに対し、内皮細胞ではそれが見られないことから、PGE₁による細胞内の cAMP 増加は平滑筋細胞の増殖、遊走を押さえるとともに、VEGF を介して内皮再生を促進すると考えられる。

また、PGE₁にはアポトーシスを抑制する細胞保護作用があるといわれている。内皮細胞障害は内皮細胞上に白血球や血小板の接着因子を発現させることがあるため、その結合抑制作用も間接的に内皮再生促進に関っていると考えられる。

内膜肥厚抑制の薬物療法における投与時期や期間に対する研究や明らかな根拠は示されていない。静脈グラフト移植では内膜肥厚により狭窄部に一致して内皮細胞再生障害が確認されていることから、内皮再生を促進することは内膜肥厚による狭窄の抑制につながるものと考えられる。全グラフトの内皮化完了までの期間は静脈に対する前処置の違いで 10 日から 10 週とばらつきがある。以前の検討ではグラフト処理の相違により移植 1 週間後で被覆率の最大差を認めたため¹、LPGE₁の投与期間を 2 週間と設定した。

結 論

LPGE₁はまず平滑筋細胞に吸収された後、作用を発揮する。静脈グラフトバイパス移植術において LPGE₁の早期静脈内連日投与は静脈グラフトの内皮細胞の再生を促進し、内膜肥厚を抑制する可能性がある。

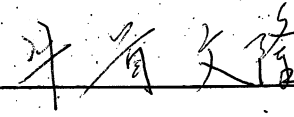
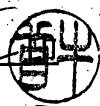
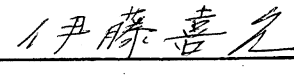



引用論文

1. Ishikawa M, Sasajima T, Kubo Y. Re-endothelialisation in autogenous vein grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996;11:105-11.
2. Suzuki K, Takahashi K, Matsuki Y, Kawakami M, Kawaguchi Y, Hidaka T, et al. Fluorescent probe-labeled lipid microsphere uptake by human endothelial cells: a flow cytometric study. *Jpn J Pharmacol* 1992;60:349-56
3. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 1999 Oct;79:1193-226.

参考論文

1. 経皮的心肺補助装置(PTCA)の使用経験 郷一知ほか 8名と共著
人工臓器 26巻3号 650-652頁 平成9年
2. 二重管を用いた人工血管内挿法による弓部大動脈末梢吻合法の経験 笹嶋唯博ほか
7名と共著 脈管学 39巻8号 419-422頁 平成11年
3. 硬化療法と付加価値—私の手技 高位結紮術とカテーテル硬化療法
笹嶋唯博と共著 下肢静脈瘤 硬化療法の実際 医学書院 102-103頁 平成9年

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	赤坂伸之
<p>審査委員長  </p> <p>審査委員  </p> <p>審査委員  </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Lipo-prostaglandin E₁ is absorbed by vascular smooth muscle cells and may enhance re-endothelialization of vein grafts</p> <p>(リポプロスタグランジン E₁ は平滑筋細胞により吸収され 静脈グラフトの再内皮化を促進しうる)</p>			
<p>近年、食事の欧米化や高齢化社会の到来により、閉塞性動脈硬化症に起因する四肢の血流不全症例が増加している。その治療には、大伏在静脈などを用いた血管移植による血行再建術が施行されている。しかし、静脈移植を受けた患者の約3割では、術後2年以内に移植片に発生する内膜肥厚による再閉塞が認められ、再手術を余儀なくされている。したがって、この移植片に発生する内膜肥厚の病態生理の解明やその予防手段の開発は、血管移植による血行再建術を受けた患者の管理において重要な課題となっている。</p>			

本研究は、血管平滑筋増殖抑制作用を持つプロスタグランジン E₁ を主成分とする製剤であるリポプロスタグランジン E₁ の、移植静脈片の内膜肥厚抑制効果の可能性を検証した。方法として、イヌ頸静脈から調整した培養血管内皮および平滑筋細胞を用い、蛍光色素 DiI で標識したリポプロスタグランジン E₁ のこれらの細胞への取り込みを *in vitro* で解析した。また、イヌ大腿動脈の一部を大腿静脈で置換し、その再内皮化に対するリポプロスタグランジン E₁ の効果を *in vivo* で検討した。

その結果、リポプロスタグランジン E₁ は、血管平滑筋に濃度依存的に取り込まれたが、血管内皮細胞には取り込まれなかった。また、移植7日後の静脈内皮の血管内腔面での占有率は、リポプロスタグランジン E₁ 投与群では 58.4% であり、対照群の 31.6% と比較して有意に高かった。

以上の結果、リポプロスタグランジン E₁ は、従来知られていた細胞表面に存在する EP や IP 受容体を介した作用以外に、直接平滑筋細胞に取り込まれて作用を発現する可能性が示唆された。さらに、リポプロスタグランジン E₁ は、移植静脈片の再内皮化を促進することが解明された。これらの成果は、移植血管の再内皮化がその後の血管内膜肥厚を抑制する可能性を考慮すると、血管再閉塞の病態生理の解明やその治療の上で、重要な貢献をするものと考えられる。

なお、論文提出者に対し各審査委員より、本論文とその関連領域に関して試問が行われ、適切な回答が得られた。

以上より、本論文は博士の学位論文として適切であると判定した。