

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Effects of Angiotensin II type 1 receptor blocker on transplant arteriosclerosis in a murine model of cardiac transplantation

和 訳 マウス心移植モデルを用いたアンジオテンシン II 受容体拮抗薬による移植後動脈硬化抑制作用の検討

指導教官 高本 眞一 教授  
東京大学大学院 医学系研究科

平成 13 年 4 月入学  
医学博士課程  
外科学専攻  
氏名 山本 哲史

## 背 景

心移植は末期心不全患者にとって唯一長期生存が見込める治療法である。1967 年以来、全世界で 66,000 件以上の心移植が行われており、1,5,10 年生存率はそれぞれ約 80,70,50%と徐々に改善してきている。近年の免疫抑制療法法の進歩、特に cyclosporine の使用により心移植後の拒絶反応は劇的に減少した。しかし、慢性期の拒絶反応と考えられる瀰漫性の冠動脈硬化の進行は心移植患者の長期予後にとって最も重要な問題の一つであり、移植 5 年以降の死因の 16.2% を占めている。移植後動脈硬化の成因としては recipient の骨髄由来細胞の関与が示唆されているものの十分に解明されておらず、有効な治療法は確立されていない。

アンジオテンシン II 受容体拮抗薬(ARB)は現在降圧薬として広く用いられている。血管新生や動脈硬化への関与など、アンジオテンシン II の持つ幅広い作用が次第に明らかになり、ARB の抗血管新生作用や抗動脈硬化作用も注目されてきている。アンジオテンシン II には主に 2 種類の受容体(アンジオテンシン II タイプ 1 受容体(AT<sub>1</sub>R)とアンジオテンシン II タイプ 2 受容体(AT<sub>2</sub>R))があり、心血管系への作用は主に AT<sub>1</sub>R を介している。

今回我々は、マウス腹部異所性心移植モデルを用い、AT<sub>1</sub>R 拮抗薬である candesartan と valsartan を用いて移植後の冠動脈硬化抑制作用及び循環血液中の平滑筋前駆細胞に与える影響を検討した。

## 方 法

<マウス>6~9 週齢のマウスを用いた。DBA/2 マウス (ドナー) の心臓を摘出、B10.D2 マウス(レシピエント)の腹部へ異所性移植した。レシピエントマウスは candesartan(1mg/kg/day)投与

群、valsartan(10mg/kg/day)投与群と vehicle(0.5%カルボキシルメチルセルロース)投与群に分け、移植手術の7日前より投与を開始、犠牲死させるまで投与を継続した。レシピエントマウスはそれぞれ薬物投与開始前及び犠牲死直前に血圧及び心拍数を測定した。

＜組織学的検索＞移植30日後にレシピエントマウスを犠牲死させ移植心を摘出した。摘出した移植心はホルマリン固定後、パラフィン包埋し、組織切片をつくり HE 染色、EVG 染色及び免疫染色(抗 $\alpha$ -SMA 抗体、抗 CD45 抗体)を施行した。HE 染色から細胞浸潤の程度を ISHLT score に従い 5 段階評価した。また、EVG 染色から冠動脈硬化の程度(内膜肥厚の程度=I/M ratio: Intima area/Medial area ratio)を計測した。I/M ratio は心外膜下の比較的径の大きい動脈と心筋内の小径動脈に分けて計測した。

＜免疫組織染色＞冠動脈病変の機序の検討のため、移植14日後に移植心を摘出、凍結切片を作成し抗 $\alpha$ -SMA、CD31、CD45、ICAM-1、VCAM-1、MCP-1 及び TGF- $\beta$ 1 抗体を用いて免疫染色を施行した。コントロールとしてドナー心から同様に凍結切片を作り、免疫染色施行した。

＜血清 IL-6 濃度＞非移植マウス及びレシピエントマウス(移植後14日、30日後)から血液を採取、血清分離し、ELISA 法にて IL-6 濃度を測定した。

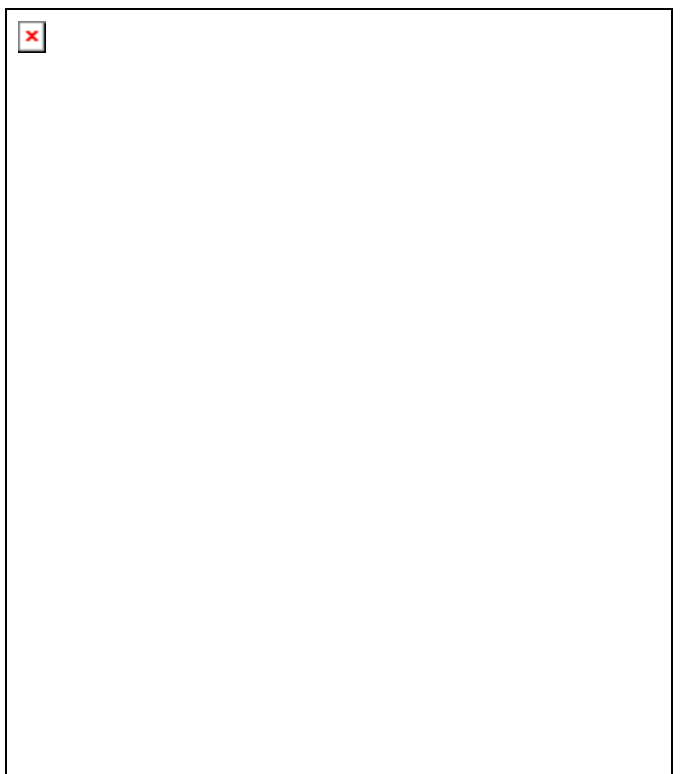
＜循環血液中の平滑筋前駆細胞数＞移植後14日目に採血した血液から溶血法にて白血球を分離し、 $3 \times 10^5$ の細胞ずつ培養を行った。培養液は HuMedia-SG2 を用い、10ng/ml の bFGF と 10ng/ml の PDGF-BB を添加、37°C、5%CO<sub>2</sub>の環境にて培養した。培養液は4日目に交換、培養細胞は8日目に4%パラホルムアルデヒドにて固定し、抗 $\alpha$ -SMA 抗体にて染色した。 $\alpha$ -SMA 陽性の多角形細胞を平滑筋様細胞と判断し、各視野(HPF)の陽性細胞の数を計測した。

＜RT-PCR＞骨髄細胞中の AT<sub>1</sub>R の発現を調べるため、7日間 valsartan 及び vehicle を投与された B10.D2 マウスの大腿骨から骨髄細胞を採取した。全 RNA を抽出し、AT<sub>1</sub>R 及び GAPDH に対して RT-PCR 施行した。

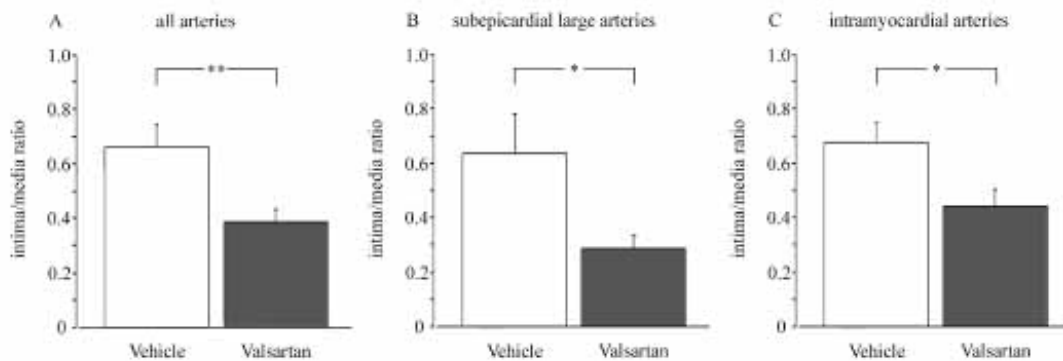
## 結果

＜移植後動脈硬化＞candesartan 投与前後で血圧は有意に低下したが、valsartan 投与前後では血圧及び心拍数に差はなかった。移植後30日目に摘出した移植心は、軽度の炎症細胞浸潤から出血を伴う心筋壊死まで様々な程度の拒絶状態を呈しており、ISHLT score は薬物投与群と vehicle 群で差はなかった。冠動脈も様々な程度の内膜肥厚を呈しており、肥厚内膜は主として $\alpha$ -SMA 陽性細胞と CD45 陽性細胞で構成されていた。

冠動脈病変は valsartan 群(n=9)では vehicle 群(n=8)に比べ有意に軽度であり(I/M ratio: vehicle  $0.66 \pm 0.08$ , valsartan  $0.39 \pm 0.05$ ,  $p < 0.01$ )、動脈径にかかわらずこの傾向を認めた(心外膜下動脈:



vehicle  $0.63 \pm 0.15$ , valsartan  $0.29 \pm 0.05$ ,  $p < 0.05$  ; 心筋内小動脈 : vehicle  $0.68 \pm 0.07$ , valsartan  $0.44 \pm 0.06$ ,  $p < 0.05$ 。candesartan でも同様の傾向が見られた。



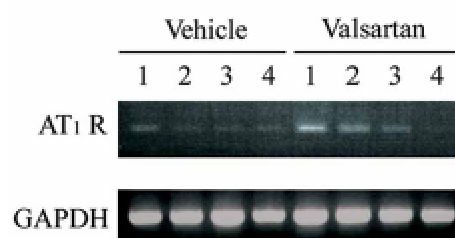
<免疫組織染色>移植 14 日後に摘出した移植心での免疫染色では、炎症細胞(CD45, F4/80)や接着因子(ICAM-1, VCAM-1)、サイトカイン(TGF  $\beta$  1, MCP-1)の局在に 2 群で明らかな差はなかった。血管内皮細胞(CD31 陽性細胞)は 2 群ともに正常に保たれていた。

<血清 IL-6 濃度>血清 IL-6 濃度は移植 2 週間後に有意に高値となったが、4 週間後には baseline 値に低下、この傾向は candesartan 投与にかかわらず同様であった。

<循環血液中の平滑筋前駆細胞>末梢血中の白血球を bFGF と PDGF-BB の存在下に培養すると、4 日目には一部の細胞で紡錘型の形態変化を認めた。培養 8 日目に細胞を固定、抗  $\alpha$ -SMA 抗体にて染色したところ valsartan 群(n=5)では vehicle 群(n=4)に比し、抗  $\alpha$ -SMA 抗体陽性細胞が有意に減少していた(vehicle  $30.3 \pm 4.4$ cells/HPF, valsartan  $18.0 \pm 1.5$ cells/HPF,  $p=0.01$ )。candesartan でも同様の結果であった。



<RT-PCR>RT-PCR にて vehicle 群、valsartan 群とも骨髄細胞中に AT<sub>1</sub>R の発現を認めた。



## 考 察

本研究ではマウス異所性心移植モデルにおける ARB(candesartan 及び valsartan)の作用に関して検討した。candesartan 及び valsartan 投与により移植後の冠動脈硬化は有意に抑制されたが、炎症細胞浸潤や接着分子、サイトカインの発現や局在はほとんど影響を受けなかった。しかし、candesartan と valsartan 投与による内膜肥厚の抑制は、レシピエント末梢血液中の  $\alpha$ -SMA 陽性細胞に分化可能な白血球数の減少と関係していた。

移植後動脈硬化の病因に関してはまだほとんど明らかになっていないが、通常の動脈硬化と同様、主として局所の炎症性線維性増殖に起因すると考えられている。AT<sub>1</sub>R の刺激によりさまざまな種類の細胞に対する伝達経路が活性化される。ACE 阻害剤や ARB の投与により移植片の血管病変が抑制されることはこれまでも示されていたが、AT<sub>1</sub>R のブロックが移植後動脈硬化を抑制するメカニズムは十分に解明されていない。

移植後 14 日の検討では、candesartan 及び valsartan 投与は接着因子や MCP-1 の発現、炎症細胞浸潤の程度に影響を与えなかった。ARB の抗炎症作用は免疫機能が十分に活性化された状態にあるレシピエントにおいては、他の免疫抑制剤ほどの強い作用を示さないと考えられる。

移植後動脈硬化は大部分は平滑筋細胞の過増殖によるものであり、アンジオテンシン II は平滑筋細胞の増殖や肥大を誘導しうると同時に、バルーン血管形成後の平滑筋細胞の過形成を促進すると考えられている TGF- $\beta$ 1 の合成を活性化しうる。このため、candesartan 及び valsartan の動脈硬化抑制作用は局所のアンジオテンシン II により誘導される平滑筋細胞の過形成を抑制することで発揮されると考えられる。

最近の研究では、ドナー中膜の平滑筋細胞だけでなくレシピエントの循環血液中の細胞も心臓移植片の新生内膜形成に関与していることが示されている。さらに、平滑筋前駆細胞がヒトの血液中にも存在していること、ヒトの冠動脈プラークは骨髄由来の平滑筋細胞に富んでいることも報告されている。candesartan 及び valsartan が末梢血中の平滑筋様細胞数を有意に減らしていること、骨髄細胞は AT<sub>1</sub>R を発現していることより、AT<sub>1</sub>R をブロックすることで移植後動脈硬化の病因に関与する骨髄由来の平滑筋前駆細胞の遊走や分化を抑制している可能性が示唆された。candesartan 及び valsartan の移植後動脈硬化抑制作用の少なくとも一部分は平滑筋前駆細胞の数と機能の調節によりなされていると思われる。

## まとめ

マウス異所性心移植モデルにて、candesartan 及び valsartan を用いた AT<sub>1</sub>R のブロックより移植後冠動脈硬化の進行が抑制され、同時にレシピエント循環血液中の平滑筋前駆細胞の減少が認められた。ARB は高血圧患者の治療に広く用いられており副作用も比較的少ない。近年の臨床研究では、ARB 投与により心不全患者や心筋梗塞患者の心血管イベントの発症が有意に減少することが示されている。無作為研究で効果が示されれば、candesartan や valsartan は心移植後の冠動脈硬化予防のために使用できるかもしれない。