

論文の内容の要旨

論文題目 内膜肥厚抑制・ステント内再狭窄抑制に関する研究

- 炎症性シグナル伝達系に着目して -

指導教員 名川 弘一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 宮原 拓也

【背景】

バルーン拡張術やステント留置術などの血管内治療後に生ずる再狭窄のメカニズムを解明し、その予防法を開発することは、動脈硬化性疾患を治療する上で重要な課題となっている。最近の報告では動脈硬化性疾患と炎症反応との関係が注目されており、本研究ではその炎症性シグナル伝達系の中で CD40 シグナル伝達系に着目した。この伝達系は、TNF receptor-associated factor (TRAF) という細胞内の仲介蛋白を介して nuclear factor κ B (NF κ B) などの転写因子を活性化するが、この活性化は平滑筋細胞の増殖や炎症細胞の浸潤など内膜肥厚の形成や動脈硬化の進展過程に関与すると報告されている。その仲介蛋白の中で TRAF6 は NF κ B と extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) の共通の transducer であるだけでなく、TNF receptor superfamily と Toll-like receptor/interleukin-1 receptor (TLR/IL-1R) superfamily の両シグナル伝達系に関与する唯一の TRAF 蛋白であり、その中で TLR4 もまた内膜肥厚に関与すると報告されている。これらの知見から、TRAF6 を介するシグナル伝達系は動脈硬化性疾患の治療のあらたなターゲットになり得ると考えた。

【目的】

本研究の目的は、ウサギの頸動脈を用いたバルーン擦過とステント留置による再障害モデルを作製し、肥厚内膜内の血管平滑筋細胞においていかなるシグナル伝達系が関与しているかを検討し、さらに内膜細胞増殖に関係すると考えられるシグナル伝達系を抑制することで、内膜肥厚やステント内再狭窄が *in vivo* で抑制されるか検討することである。本研究ではステント内再狭窄における炎症反応の役割に注目しているが、血管壁への遺伝子導入による炎症性シグナル伝達系の遺伝子レベルでの制御を検討する点に本研究の特徴がある。従来、CD40 や NF κ B の選択的阻害により内膜肥厚を抑制する報告はあるが、TRAFに着目し、electroporation 法を用いた導入法で内膜肥厚抑制を試みた報告は過去にはみられない。本研究で用いた再障害モデルは、臨床における動脈硬化性病変へのステント留置に近似したモデルであり、ステント内再狭窄抑制のメカニズム解明につながることを目標とする。

【方法と結果】

TRAF6は、本来NH₂末端を介してNF κ Bなどの転写因子を活性化しているが、本研究ではこのNH₂末端のRING fingerと zinc fingersを欠損したdeletion mutantをdominant negative (DN)として用いた。TRAF6 DN plasmid (pME-FLAG-T6 Δ RZ5) とその対照群としてTRAF6 DN配列を含まないcontrol plasmid (pME-FLAG) とを用い、内膜肥厚とステント内再狭窄に関して両群間の比較・検討を行った。

実験には普通飼料で飼育した日本白色ウサギ (雄、2.5~3.0 kg) を用いた。内膜肥厚の検討にはウサギ頸動脈のバルーン障害モデルを、またステント内再狭窄の検討には臨床における動脈硬化性病変へのステント留置に近似したモデルとしてウサギ頸動脈の肥厚内膜へのステント留置モデルを用いた。麻酔はxylazineとketamineの筋注で行い、頸部正中切開にて左頸動脈を露出した。バルーン障害は2Fr Fogarty balloon catheterで総頸動脈を3回擦過

することにより行い、またステント留置は3 mm径のPalmaz-Schatz™ stentをPTCA balloon catheterを用いて総頸動脈へデリバリーした。血管壁への遺伝子導入法にはelectroporation法を用いたが、この導入法には抗原性や細胞毒性などがなく、特定部位への導入が可能で、さらに繰り返し施行可能であることなどの特徴がある。本研究ではelectric pulse generator (Electro Square Porator ECM830, BTX) を用い、400 µg/mlのplasmid DNAを血管内腔に充填し、20分間incubate後に電極で血管を挟み込み、電圧 30 V、電圧負荷時間 20 ms、パルス10回の条件下でプラスミドを導入した。

TRAF6 DN導入の2日後に、プラスミドに組み込まれたFLAG tagに対するモノクローナル抗体で免疫染色を行ったところ、electroporation法によりTRAF6 DNを含むプラスミドが血管壁へ導入されることが確認された。また、gel-mobility shift assay法でプラスミド導入/バルーン障害6時間後のNFκB活性を評価したところ、TRAF6 DN導入後のNFκB活性は抑制されており、導入されたTRAF6 DNがin vivoでこのシグナル伝達系に作用していることが確認された。

TRAF6 dominant negative導入による内膜肥厚抑制の検討

プラスミド導入/バルーン障害7日後の内膜肥厚を新生内膜/中膜面積比 (NI/M ratio) で評価したところ、TRAF6 DNの導入によりバルーン障害後の内膜肥厚の形成が抑制された。そのメカニズムの解明として、細胞増殖、炎症細胞の浸潤、内膜細胞数、さらにapoptosisなどに関して検討を行った。BrdUの取り込み率 (BrdU labeling index) により細胞増殖を評価したところ、TRAF6 DNにより内膜および中膜細胞増殖が抑制された。マクロファージに対するモノクローナル抗体 (RAM11) で免疫染色を行ったところ、TRAF6 DNによりバルーン障害2日後の内膜へのマクロファージの浸潤も抑制された。走査型電子顕微鏡にてバルーン障害後4日目の内膜細胞を観察したところ、TRAF6 DNにより内膜細胞数が有意に抑制された。また、バルーン障害2日後の中膜細胞のapoptosisの評価はTUNEL染色およびラジ

オアイソトープを用いたDNA fragmentationの観察の2つの手法を用いて行ったが、TRAF6 DNによりapoptosisは有意に促進された。さらにNFκBとともにTRAF6のtransducerであり、また中膜細胞増殖に関与することが知られているERK1/2活性に関してin-gel kinase assay法で評価したところ、TRAF6 DNの導入によりバルーン障害2時間後のERK1/2活性も抑制されることが確認された。

これらの結果を踏まえ、内膜肥厚に続いてステント内再狭窄に対するその影響に関して検討を行った。

TRAF6 dominant negative 導入によるステント内再狭窄抑制の検討

バルーン障害 28 日後の内膜肥厚が形成された血管壁に対して、プラスミド導入とステント留置を行った。導入後にプラスミドに組み込まれた FLAG tag に対するモノクローナル抗体で免疫染色を行ったところ、electroporation 法により内膜肥厚を伴う血管に対しても肥厚内膜から中膜にかけてプラスミドが導入されることが確認された。

ステント留置後の経時的变化を観察するために、プラスミド導入/ステント留置後 3、7、14 日目に標本を採取し、ステント内内膜肥厚を評価した。その結果、TRAF6 DN の導入により内膜面積および内膜細胞数の経時的な増加はコントロール群に比較して有意に抑制され、さらに細胞密度は上昇した。つまり、TRAF6 DN がステント内内膜肥厚形成の抑制に関与することが示唆された。そのメカニズムの解明として、細胞増殖、炎症細胞の浸潤、細胞外マトリックスの蓄積、さらにプロテアーゼの活性などに関して検討を行った。BrdU の取り込み率により細胞増殖を評価したところ、TRAF6 DN により内膜および中膜の細胞増殖が抑制された。マクロファージに対するモノクローナル抗体 (RAM11) で免疫染色を行ったところ、TRAF6 DN によりステント内内膜へのマクロファージの浸潤も抑制された。また、TUNEL 染色により内膜細胞の apoptosis の評価も行ったが、前実験と同様に TRAF6 DN により apoptosis は促進される傾向にはあるものの、両群間に有意差はみられなかった。

走査型電子顕微鏡によりステント留置後の内腔側を観察したところ、TRAF6 DNにより白血球の内腔側への付着は抑制されており、また透過型電子顕微鏡により肥厚内膜内の細胞外マトリックスを観察したところ、プロテオグリカンの蓄積は抑制される傾向にあった。内膜肥厚の形成過程においてはさまざまなプロテアーゼが活性化されることが報告されているが、matrix metalloproteinase (MMP)-9 と plasminogen activator (PA) 活性を zymography で評価したところ、TRAF6 DNによりそれらのプロテアーゼ活性はともに抑制された。

【結語】

本研究では、炎症や免疫反応などに関与するシグナル伝達系の仲介蛋白である TRAF6 に着目し、その dominant negative をプラスミドに組み込み、in vivo electroporation 法を用いてウサギ頸動脈へ導入することにより、内膜肥厚ならびにステント内再狭窄に対するその抑制効果が確認された。その過程には、白血球やマクロファージなどの炎症細胞の浸潤、細胞増殖、さらに細胞外マトリックスの蓄積などのさまざまな要素が関与していることが示唆された。以上、動物モデルを用いて TRAF6 DN 導入による内膜肥厚抑制ならびにステント内再狭窄抑制の効果とそのメカニズムの一端を解析したが、この検討が実際の臨床現場において動脈硬化病変の治療やステント内再狭窄予防に対するあらたな戦略のひとつとなることが期待される。