

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
成山 仁	主査 教授 花 房 俊 昭 副査 教授 宮 崎 瑞 夫 副査 教授 北 浦 泰 副査 教授 勝 間 田 敬 弘 副査 教授 黒 岩 敏 彦
主論文題名 ステント植込みによる内膜肥厚に対するセリバスタチンの抑制効果 (HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, inhibits stent-induced intimal hyperplasia of rabbit carotid artery)	
学位論文内容の要旨	
<p>(背景)</p> <p>HMG-CoA 阻害薬(スタチン)はコレステロール低下作用を有するが、最近、コレステロール低下を介さない“pleiotropic effect”も明らかになってきた。そこで本研究では、“pleiotropic effect”の機序を明らかにするため、普通食で飼育した正常コレステロール値の日本家兔の頸動脈を用い、セリバスタチンがステント埋え込み後の内膜肥厚に与える影響について検討した。</p> <p>(方法)</p> <p>家兔頸動脈に内膜は存在しないので、バルーン傷害によりあらかじめ新生内膜を形成させてからステント留置を行った。18 匹の雄の日本白色家兔を普通食で 2 週間飼育した後、拡張したバルーンで右頸動脈を擦過し、血管に傷害を与えた。2 週間後、透視下に 2.5mm 径のステントを、バルーンで擦過した部位に留置した。これらの家兔を 9 匹ずつの 2 群に分け、スタチン群にはセリバスタチン溶液 (1mg/kg/day) を、対照群には生理食塩水を皮下注射した。</p> <p>各群 6 匹の家兔を、ステント留置後 2 週間目に屠殺し灌流固定した。固定後、頸動脈を摘出し、以下の解析をおこなった。HE 染色においては、内膜と中膜の面積を測定し、内膜面積/中膜面積比で内膜の肥厚度を表した。免疫染色においては、RAM11 を用いマクロファージの発現を観察した。また、抗 α-Smooth Muscle アクチン抗体である HHF35、平滑筋ミオシン重鎖のアイソザイム抗体である SM2、SMemb を用い、ウェスタンブロット法による各蛋白の発現について検討した。</p> <p>さらに、豚冠動脈から得た平滑筋細胞 (SMC) の培養系に、セリバスタチン $0 \mu M$, $1 \mu M$, $10 \mu M$ を添加し、SMC の増殖と遊走に及ぼすセリバスタチンの効果を検討した。すなわち、BrdU 添加後に免疫染色を行い、有核細胞中の BrdU 陽性細胞の比率を算出して増殖能を、また、Boyden's chamber 法によって細胞の遊走能を測定し、比較した。</p> <p>血管壁における遺伝子発現を調べるため、各群 3 匹の家兔をステント留置後 3 日目に解剖し、Real-time reverse transcriptional Polymerase Chain Reaction (Real-time RT-PCR) を行った。MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) の cDNA の相対量は GAPDH の cDNA で補正し、コントロール群を 100 としてスタチン群の比率を算出した。</p>	

(結果)

ステント留置後 2 週目の HE 染色では、両群ともステント内に新生内膜の形成を認めたが、I/M 比はスタチン群でコントロール群に比べて有意に低く(0.93 ± 0.35 VS 1.72 ± 0.35 , $P < 0.005$)、スタチン群では内膜肥厚が抑制されていた。

免疫染色において、単位面積あたりの RAM11 陽性細胞数を内膜と中膜で比較したところ、両群とも内膜の方で有意に多く、とくにステントストラット周囲に RAM11 陽性細胞の集簇を認めた。(コントロール群: 315.4 ± 19.6 vs 31.2 ± 5.9 ; $P < 0.05$ 、スタチン群: 159.1 ± 61.2 vs 11.9 ± 7.4 ; $P < 0.05$)。さらに、血管壁全体における単位面積あたりの RAM11 陽性細胞数について比較検討したところ、スタチン群で有意に少数であった(123.0 ± 3.9 vs 69.7 ± 16.0 ; $P < 0.05$)。

ウェスタンブロット法では、スタチン群でステント留置後 3 日目、14 日目とも、SM2、HHF35 の発現が增强し、SMemb の発現が減弱していた。Real-time RT-PCR では、MCP1 の発現はコントロール群に比べてスタチン群で著明に抑制されていた(100 ± 37.9 vs 34.7 ± 11.7 ; $P < 0.05$)。

培養 SMC を使った検討においては、セラバスタチン添加により濃度依存的に BrdU 陽性細胞の比率が低下した($1 \mu M$ $28.2 \pm 3.5\%$ vs $7.4 \pm 6.0\%$; $P < 0.05$)。又 Boyden チェンバーを用いた遊走能の検討においては、セラバスタチンは濃度依存性に SMC の遊走を阻害($1 \mu M$ 59.4% inhibition; $p < 0.01$)した。

(考察)

セラバスタチンはステント留置後 14 日目の新生内膜の形成を抑制していた。機序の一つとしては、培養 SMC を使った検討でセラバスタチンがその増殖ならびに遊走を抑制したことより、SMC に対する直接作用が考えられた。また、平滑筋細胞のフェノタイプでは、分化型から脱分化型への変換が抑制されていることがウェスタンブロット法により確認された。

免疫組織染色では、内膜とくにステントストラット周囲にマクロファージの集簇を認め、スタチン群で有意にその集簇が抑制されていた。このことからまず、新生内膜形成にマクロファージの関与が考えられた。さらに、ステント留置後の MCP-1/mRNA を Real-time RT-PCR で定量したところ、スタチン投与群で 65% 抑制されていた。この成績は、MCP-1 が炎症反応により NF- κ B を介して活性化されることを考慮すると、セラバスタチンがステントによる異物反応に対して抗炎症作用を示した可能性を示唆している。また、MCP-1 はマクロファージのみならず血管平滑筋細胞にも直接作用し、SMC の遊走、増殖に大きな役割を果たすことが報告されており、今回の実験においては、スタチンが MCP-1 の発現抑制を介して SMC の増殖、遊走を抑えたことも、スタチンの内膜肥厚抑制機序の一つと推察される。

(結論)

セラバスタチン投与により、普通食飼育家兔で頸動脈ステント留置後の内膜肥厚が抑制され、その機序の一つとして MCP-1 の発現抑制を介する“pleiotropic effect”が関与していると考えられた。臨床においてもスタチン系薬剤のステント後再狭窄予防効果が期待される。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	成山 仁
論文審査担当者		主 査 教授 花 房 俊 昭 副 査 教授 宮 崎 瑞 夫 副 査 教授 北 浦 泰 副 査 教授 勝 間 田 敬 弘 副 査 教授 黒 岩 敏 彦	
主論文題名 ステント植込みによる内膜肥厚に対するセリバスタチンの抑制効果 (HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, inhibits stent-induced intimal hyperplasia of rabbit carotid artery)			
論文審査結果の要旨			
<p>HMG-CoA 阻害薬(スタチン)はコレステロール低下作用以外に、コレステロール低下を介さない“pleiotropic effect”も有している。申請者は、普通食で飼育した日本家兎の頸動脈を用い、バルーン傷害により新生内膜を形成させた後にステント留置を行い、ステント留置後の内膜肥厚機序を明らかにするとともに、セリバスタチンがステント埋え込み後の内膜肥厚に与える影響について検討し、以下の結果を得ている。</p> <p>セリバスタチンはステント留置後の新生内膜の形成を抑制した。機序のひとつとして、培養血管平滑筋を使った検討においてその増殖、遊走をセリバスタチンが抑制したことより、セリバスタチンの直接作用が考えられた。また、Real-time RT-PCR においてセリバスタチン投与群で MCP-1/mRNA の発現が抑制されていたことより、セリバスタチンによる MCP-1 の発現抑制が、マクロファージの侵入抑制を介して、内膜増殖を抑制した可能性も示唆された。</p> <p>本研究により得られた成果は、スタチンの“pleiotropic effect”の機序の解明に貢献するものであり、ステント留置後の再狭窄を予防する上で臨床的意義が大きいと考えられる。</p> <p>以上より、本論文は本学学位規程第3条第2項に定める所の博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) 大阪医科大学雑誌 65(3): 24-33, 2006</p>			